

ВПЛИВ ФУНГІЦИДІВ НА ФОРМУВАННЯ, ФУНКЦІОНУВАННЯ ТА ПЕРОКСИДАЗНУ АКТИВНІСТЬ КОРЕНЕВИХ БУЛЬБОЧОК СОЇ ЗА ІНОКУЛЯЦІЇ РИЗОБІЯМИ, ІНКУБОВАНИМИ З ЛЕКТИНОМ

А.В. Павлице, Т.П. Маменко, Л.І. Рибаченко, С.Я. Коць

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна,
t_tamenko@ukr.net*

Мета. Вивчити вплив препаратів із фунгіцидною дією на формування та функціонування симбіотичного апарату та реакцію захисних ферментів із пероксидазною активністю (гваякол- і аскорбатпероксидази) у кореневих бульбочках сої за інокуляції *Bradyrhizobium japonicum*, інкубованих із лектином. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні, біохімічні, газова хроматографія, спектрофотометрія. **Результати.** Обробка насіння сої фунгіцидами (Февер, Максим XL) спільно з інокулянтом (штам *B. japonicum* 6346) індукує підвищення рівня ферментів із пероксидазною активністю та сприяє збереженню ефективності роботи симбіотичного апарату. Інокуляція сої суспензією ризобій, інкубованих із лектином, та обробка насіння фунгіцидами, чинила негативний вплив на формування та функціонування соєво-ризобіального симбіозу. **Висновок.** Гомологічний лектин насіння сої як компонент інокуляційної суспензії в концентрації 100 мкг/мл підвищує ефективність симбіотичних систем соя – *Bradyrhizobium japonicum* (штам стандарт 6346), однак не може розглядатися як антидот токсичної дії фунгіцидів (Февер, Максим XL, Стандак Топ) на симбіотичний апарат у суворо контрольованих умовах модельного вегетаційного досліджу та потребує подальших досліджень у ґрунтовій культурі.

Ключові слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, симбіоз, фунгіцид, лектин.

На сьогоднішній день все більшу увагу дослідників привертає вирішення питання порушення рівноваги в системі «рослина – патоген – доквілля» [1]. Видовий склад збудників хвороб та інтенсивність їх розвитку пов'язаний не тільки з генетичними особливостями сортів, а й з еколого-географічними умовами, в яких вирощуються рослини [2]. Вважають, що слід розробити і впровадити науково обґрунтовану систему захисту від шкочочинних мікроорганізмів, що дасть змогу контролювати значну кількість захворювань і, відповідно, повною мірою реалізувати генетичний потенціал сучасних сортів сої [3]. Однією з основних проблем захисту рослин є не стільки використання хімічних засобів захисту, скільки пошук шляхів зниження рівня їх шкочочинності для оточуючого середовища [4].

Одним із важливих факторів захисту рослин сої від хвороб і шкідників є обробка насіння протруйниками у комплексі із застосуванням інокулянтів на основі мікросимбіонтів *B. japonicum*, які у свою чергу сприяють

піввищенню стресостійкості та продуктивності рослин [5]. Досліджено, що рослини сої з активним симбіотичним апаратом більш стійкі до ураження широкого спектру комплексу хвороб, а чітке поєднання усіх заходів, направлених на оптимізацію процесу симбіозу, сприяє формуванню потужного симбіотичного апарату, покращенню фітосанітарного стану посівів, підвищенню родючості ґрунту та отриманню високих врожаїв сої з найкращими якісними показниками [5].

Не менш важливим шляхом оптимізації азотного живлення рослин та підвищення їх продуктивності є використання речовин із рістрегулюючою дією передусім природного походження – метаболітів рослин і мікроорганізмів [6]. У цьому аспекті важливу роль приділяють фітолектинам як продуктам рослинного метаболізму, що проявляють багатогранну дію на компоненти системи «рослина – ґрунт – мікроорганізми» [6]. Це поліфункціональні білки, які, зокрема, беруть участь у міжклітинному розпізнаванні рослинами фітопатогенів [7, 8]. Така властивість лектинів зумовлена їх здатністю зворотно і неспецифічно зв'язувати вуглеводні залишки різної хімічної природи, що забезпечує зв'язування бактерій і призводить до несумісної взаємодії партнерів, індукуючи захисні механізми рослин на ураження патогеном [9, 10, 11]. Це є першим і необхідним етапом запуску реакції надчутливості рослини на інфікування патогеном. Нездатність вірулентних клітин аглютинувати за наявності лектину пов'язана з продукуванням бактеріями екстрацелюлярного полісахариду, який екранує ліпополісахарид на зовнішній мембрані бактеріальної клітини і тим самим запобігає його взаємодії з лектином. Вірулентні штами продукують розчинні екзополісахариди – слиз, що маскує ліпополісахаридні рецептори лектинів. Подібні результати отримані й для лектинів бобів, які взаємодіяли з компонентом пептидогліканів клітинних стінок бактерій – N-ацетилмураміновою кислотою [7]. Вважають, що цей слиз зв'язується з лектином рослини-хазяїна й інгібує аглютинацію бактерій [9, 10]. У складі рослинних ексудатів лектини слугують сигналами для бульбочкових бактерій, що сприяє агрегації бактерій у ризосфері рослин і, як наслідок, утворенню бульбочок, в яких відновлюється атмосферний азот [7, 11]. Тому лектини відіграють важливу роль у формуванні бобово-ризобіального симбіозу [6, 12].

Фізіологічна роль лектинів не обмежується лише лектин – вуглеводною взаємодією, їх розглядають як сигнальні молекули, які здатні індукувати складний ланцюг внутрішніх перетворень у клітині та її відповідь на дію стресових чинників біотичної та абіотичної природи [9, 11, 13]. Вважають, що перспективним напрямком є дослідження щодо застосування лектинів як природних регуляторів росту рослин і мікроорганізмів, а також як біологічно активних агентів при розробці екологічних методів захисту рослин [6].

Враховуючи унікальні властивості лектинів та поліфункціональність їх дії, нами зроблено припущення щодо можливості використання цих протеїнів як антидотів для пом'якшення токсичної дії фунгіцидів на процеси формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було вивчити вплив препаратів із фунгіцидною дією на формування та функціонування симбіотичного

апарату та реакцію захисних ферментів із пероксидазною активністю (гваякол- і аскорбатпероксидази) у кореневих бульбочках сої за інокуляції *Bradyrhizobium japonicum*, інкубованих із лектином.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були симбіотичні системи, утворені за участі сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Алмаз, стандартного штаму *B. japonicum* 634б, інкубованого з лектином. Як протруювачі насіння сої використовували препарати з фунгіцидною активністю Февер (Baeyr CropScience AG, Німеччина), Максим XL (Syngenta, Швейцарія), Стандак Топ (BASF, Німеччина). Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на твердому манітно-дріжджовому середовищі протягом 7 діб при 26 – 28°C.

Перед посівом насіння стерилізували 70 %-им розчином етанолу і промивали проточною водою. Потім насіння сої обробляли розчинами фунгіцидів – Максим XL 035 PS (флудіоксоніл, 25 г/л, металаксил, 10 г/л), Февер (протіокназол, 300 г/л), Стандак Топ (фіпроніл, 250 г/л, тіофанат-метил, 225 г/л, піраклостробін, 25 г/л) з розрахунку однієї норми витрат діючої речовини кожного препарату, вказаної виробником. Одну частину обробленого фунгіцидами насіння інокулювали чистою культурою суспензії ризобій протягом 1 год (титр клітин у суспензії становив 10^8 кл/мл). Іншу частину обробленого фунгіцидами насіння інокулювали суспензією ризобій, яка попередньо була інкубована з розчином комерційного лектину сої («Лектинотест», м. Львів) у концентрації 100 мкг/мл. Тривалість інкубації з лектином становила 20 год при температурі 28 °С.

Рослини вирощували у 4-кілограмових посудинах в піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту за природного освітлення та оптимального водозабезпечення [14]. Контролем досліду слугував варіант з інокуляцією насіння ризобіями без використання лектину та без обробки фунгіцидами.

Нодуляційну здатність бульбочкових бактерій оцінювали за кількістю та масою корневих бульбочок. Азотфіксувальну активність (АФА) – ацетиленовим методом [15] на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полуменево-іонізаційним детектором. Розділення газів проводили на колонці (Supelco Porapak N) за температури термостата 55°C і детектора – 150 °С. Газом-носієм був гелій (20 мл за 1 хвилину). Об'єм аналізованої проби газової суміші становив 1 см³. Як стандарт використовували чистий етилен (Sigma-Aldrich, № 536164, США). Вимірювання показників АФА та нодуляції проводили у 6-кратній повторності.

Для отримання ензимного екстракту наважку рослинного матеріалу (0,2 г) гомогенізували у фарфоровій ступці з 4 мл охолодженого до -4 °С 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,5), який містив 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), 1 мМ фенілметилсульфонілфториду, 5 мМ β-меркаптоетанолу і 1% (в/о) полівінілпіролідону. Гомогенат центрифугували при 10 000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Супернатант використовували для визначення активності ензимів за допомогою спектрофотометра «Smart Spec Plus» (США). Активність аскорбатпероксидази (АПО) (КФ 1.11.1.11) визначали за зменшенням оптичної густини при довжині

хвилі 290 нм протягом хвилини у результаті окиснення аскорбату ($\epsilon = 2,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) [16]. Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 0,2 мМ аскорбат, 0,1 мМ H_2O_2 . Реакцію ініціювали додаванням 150 мкл супернатанта. Активність гваяколпероксидази (ГПО) (КФ 1.11.1.7) – за збільшенням оптичної густини при 470 нм протягом хвилини у результаті окиснення гваяколу ($\epsilon = 26,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) [17]. Реакційна суміш містила 50 мМ калій - фосфатний буфер (рН 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 0,5 % гваякол, 10 мМ H_2O_2 . Реакцію ініціювали додаванням 50 мкл супернатанта. Вміст загального розчинного протеїну у ферментному екстракті визначали за Бредфорд [18]. Активність ферментів визначали у 5-кратній повторності. Одержані дані оброблені статистично з використанням критерію Стьюдента. Значення $P \leq 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. У табл. 1, 2 та на рис. 1, 2 результати представлені у вигляді середніх значень зі вказівкою на середні квадратичні відхилення ($M \pm m$, $n = 5$). У роботі використовувались реактиви іноземних виробників: Reanal (Угорщина), Merck (Німеччина), Calbiochem (Німеччина), Fluka (Німеччина).

Результати. Досліджено, що інокуляція насіння сої ризобіями, інкубованими з лектином, сприяла підвищенню ефективності роботи симбіотичного апарату. Це проявлялось у стимуляції нодуляційної здатності бульбочкових бактерій і приводило до зростання кількості та маси бульбочок на коренях рослин майже удвічі порівняно із контрольними. При цьому АФА кореневих бульбочок зростала за дії лектину на 20 % у порівнянні з контролем у фазі трьох справжніх листків та масового цвітіння (табл. 1, 2). Разом із тим у фазу бутонізації не зафіксовано істотної різниці у АФА між варіантами із використанням лектину та без його участі. На нашу думку, це було пов'язано саме зі змінами у роботі симбіотичного апарату рослин контрольного варіанту досліджу, на коренях яких зафіксовано нехарактерне зниження кількості та маси бульбочок на фоні підвищення АФА (табл. 1, 2). Можливо, такий ефект був викликаний погодними умовами, які характеризувались дуже високими температурами повітря, що припадали саме на дану фазу онтогенезу сої. Очевидно, що екзогенна дія лектину дозволила рослинам уникнути негативного впливу зовнішнього чинника та сприяла стабілізації роботи симбіотичної системи. Такі дані узгоджуються з літературними щодо формування захисних реакцій рослин за екзогенної дії лектину, що сприяло ефективному функціонуванню бобово-ризобіального симбіозу за дії несприятливих чинників довкілля, зокрема посухи [13].

Встановлено, що попередня обробка насіння сої фунгіцидами по-різному впливала на процеси формування та функціонування симбіотичного апарату у рослин на фоні бактеризації ризобіями. Виявлено, що серед усіх досліджуваних препаратів із фунгіцидною активністю у варіанті з обробкою насіння фунгіцидом Стандак Топ зафіксовано найбільше пригнічення роботи симбіотичного апарату – зниження бульбочкоутворення та АФА кореневих бульбочок, особливо у фазі трьох справжніх листків, на 60 % у порівнянні із контрольними рослинами (табл. 1, 2).

Таблиця 1
Вплив препаратів із фунгіцидною дією на формування симбіотичного апарату сої, інокульованої *B. japonicum* 634б, інкубованими з лектином

Варіант	Фаза онтогенезу											
	Трьох справжніх листків					бутонізації					масового цвітіння	
	Кількість, шт./рослину	Маса, г/рослину	Кількість, шт./рослину	Маса, г/рослину	Кількість, шт./рослину	Маса, г/рослину	Кількість, шт./рослину	Маса, г/рослину	Кількість, шт./рослину	Маса, г/рослину		
ризобії (контроль)	31,75 ± 2,46	0,24 ± 0,02	26,75 ± 1,93	0,14 ± 0,01	27,0 ± 0,91	0,31 ± 0,02	47,25 ± 1,11	0,25 ± 0,02	41,50 ± 3,01	0,22 ± 0,02	41,0 ± 3,72	0,38 ± 0,03
(ризобії + лектин) ₁	36,75 ± 1,25	0,30 ± 0,02	28,75 ± 1,65	0,16 ± 0,01	40,25 ± 3,25	0,37 ± 0,02	ризобії + Февер	0,30 ± 0,02	28,75 ± 1,65	0,16 ± 0,01	40,25 ± 3,25	0,37 ± 0,02
ризобії + Максимум XL	41,50 ± 2,53	0,17 ± 0,01	46,0 ± 2,94	0,34 ± 0,31	31,0 ± 1,78	0,28 ± 0,02	ризобії + Максимум XL	0,17 ± 0,01	46,0 ± 2,94	0,34 ± 0,31	31,0 ± 1,78	0,28 ± 0,02
ризобії + Стандак Топ	19,50 ± 0,96	0,09 ± 0,01	34,55 ± 0,93	0,16 ± 0,02	24,75 ± 2,06	0,24 ± 0,22	ризобії + Стандак Топ	0,09 ± 0,01	34,55 ± 0,93	0,16 ± 0,02	24,75 ± 2,06	0,24 ± 0,22
(ризобії + лектин) ₁ + Февер	32,75 ± 1,44	0,16 ± 0,01	33,0 ± 2,35	0,18 ± 0,02	38,75 ± 2,98	0,35 ± 0,03	(ризобії + лектин) ₁ + Февер	0,16 ± 0,01	33,0 ± 2,35	0,18 ± 0,02	38,75 ± 2,98	0,35 ± 0,03
(ризобії + лектин) ₁ + Максимум XL	32,75 ± 1,18	0,11 ± 0,01	32,50 ± 0,65	0,16 ± 0,01	25,0 ± 1,58	0,35 ± 0,03	(ризобії + лектин) ₁ + Максимум XL	0,11 ± 0,01	32,50 ± 0,65	0,16 ± 0,01	25,0 ± 1,58	0,35 ± 0,03
(ризобії + лектин) ₁ + Стандак Топ	17,0 ± 1,29	0,11 ± 0,01	41,50 ± 2,87	0,11 ± 0,01	26,25 ± 1,31	0,24 ± 0,02	(ризобії + лектин) ₁ + Стандак Топ	0,11 ± 0,01	41,50 ± 2,87	0,11 ± 0,01	26,25 ± 1,31	0,24 ± 0,02

Примітка. Тут і в табл. 2: 1 – інкубація компонентів протягом 20 годин при 28 °С. (M ± m, n = 5), дані порівняно з контролем вірогідні за P ≤ 0,05.

Таблиця 2

Вплив препаратів із фунгіцидною дією на азотфіксувальну активність корневих бульбочок сої за інокуляції *B. japonicum* 634б, інкубованими з лектином, мкмоль C_2H_4 / (рослину · год)

Варіант	Фаза онтогенезу		
	трьох справжніх листків	бутонізації	масового цвітіння
ризобії (контроль)	1,30 ± 0,06	1,70 ± 0,07	1,48 ± 0,12
(ризобії + лектин) ₁	1,58 ± 0,14	1,78 ± 0,10	1,80 ± 0,08
ризобії + Февер	1,43 ± 0,10	1,59 ± 0,10	1,50 ± 0,09
ризобії + Максим XL	1,55 ± 0,06	1,53 ± 0,10	1,30 ± 0,08
ризобії + Стандак Топ	0,48 ± 0,03	0,89 ± 0,07	0,98 ± 0,08
(ризобії + лектин) ₁ + Февер	0,82 ± 0,08	1,0 ± 0,09	1,11 ± 0,09
(ризобії + лектин) ₁ + Максим XL	0,55 ± 0,05	0,89 ± 0,08	1,07 ± 0,10
(ризобії + лектин) ₁ + Стандак Топ	0,39 ± 0,03	0,47 ± 0,04	0,49 ± 0,02

Передпосівна обробка насіння фунгіцидами – Февер і Максим XL – приводила до стимуляції нодуляційної здатності ризобій та проявляла меншу токсичну дію на АФА корневих бульбочок. Зокрема, у фазі трьох справжніх листків у варіантах із обробкою даними препаратами спостерігали незначне підвищення АФА, показники якої у наступних фазах онтогенезу дещо знижувались у порівнянні із контрольним варіантом (за дії Максиму XL), або були у межах похибки досліду (за дії Февера). У фазі трьох справжніх листків у варіанті із обробкою насіння Февером зафіксовано збільшення кількості бульбочок (на 16 %) та їх маси (на 25 %), тоді як у фазі масового цвітіння на 49 і 19 % відповідно. Обробка насіння Максимом сприяла формуванню на коренях більшої кількості бульбочок (на 31 %), однак їх маса була меншою (на 29 %) у фазі трьох справжніх листків. У фазі бутонізації процеси бульбочкоутворення активізувались на коренях рослин варіанта з обробкою насіння Максимом XL, що проявлялось у зростанні кількості (на 72 %) та маси (на 135 %) бульбочок відносно контролю.

Попередня обробка насіння сої досліджуваними фунгіцидами на фоні бактеризації *B. japonicum*, інкубованих із лектином, призводила до пригнічення ефективності роботи симбіотичного апарату, про що свідчить суттєве зниження процесів нодуляції та азотфіксації корневих бульбочок у порівнянні із рослинами контрольного варіанта (табл. 1, 2). Зокрема, у варіанті з обробкою насіння Стандак Топом та ризобіями, інкубованими з лектином, виявлено найбільше зниження показників нодуляції (до 50 %) та АФА (до 70 %) корневих бульбочок впродовж онтогенезу. Водночас обробка насіння сої фунгіцидами Февер і Максим XL спільно з інокуляцією ризобіями, інкубованими із лектином, чинила менш виражений токсичний вплив на симбіотичний апарат. Динаміка бульбочкоутворення у даних варіантах досліду характеризувалась незначним зниженням їх маси у фазі трьох справжніх листків, збільшенням їх кількості й маси у фазі бутонізації та наближенням до рівня контрольних рослин у фазі масового цвітіння. У фазі трьох справжніх листків і бутонізації АФА корневих бульбочок знижувалась у порівнянні із контролем на 40 % (Февер) та 47 % (Максим), тоді як у фазі цвітіння – на 25 і 27 % відповідно.

Встановлено, що інокуляція сої ризобіями, інкубованими з лектином, приводила до підвищення активності АПО у корневих бульбочках порівняно із контролем у фазах трьох справжніх листків та масового цвітіння. При цьому нами не зафіксовано суттєвих змін активності ГПО (у межах похибки досліду) (рис. 1, 2). Активація антиоксидантного ферменту АПО та незначно виражена активність ГПО у корневих бульбочках сої за дії лектину може свідчити про включення захисних реакцій рослин у симбіозі та розвиток адаптаційних перебудов їх метаболізму за певних умов вирощування.

Попередня обробка насіння сої препаратами із фунгіцидною дією на фоні бактеризації ризобіями індукувала підвищення активності АПО та різке пригнічення активності ГПО у корневих бульбочках у порівнянні із контрольними рослинами у фазі трьох справжніх листків (рис. 1, 2). У фазі масового цвітіння відбувалась інтенсифікація активності АПО та наближення рівня активності ГПО до контрольного.

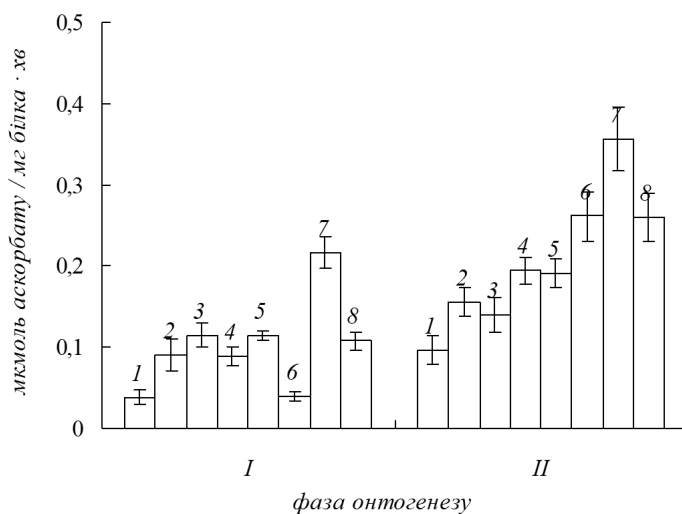


Рис. 1. Вплив препаратів із фунгіцидною дією на активність аскорбатпероксидази у корневих бульбочках сої за інокуляції *V. japonicum* 6346, інкубованими з лектином

Тут і на рис. 2: 1 – ризобії (контроль), 2 – (ризобії + лектин)_i, 3 – ризобії + Максим XL; 4 – (ризобії + лектин)_i + Максим XL; 5 – ризобії + Февер; 6 – (ризобії + лектин)_i + Февер; 7 – ризобії + Стандак Топ; 8 – (ризобії + лектин)_i + Стандак Топ. I – фаза трьох справжніх листків, II – фаза масового цвітіння.

Тут і на рис. 2: _i – інкубація компонентів протягом 20 годин при 28 °С. (M ± m, n = 5), дані порівняно з контролем вірогідні за P ≤ 0,05

Досліджено, що обробка насіння сої фунгіцидами – Максим XL і Стандак Топ – спільно з ризобіями, інкубованими із лектином, приводила до підвищення активності АПО у корневих бульбочках порівняно з рослинами контрольного варіанту у фазі трьох справжніх листків (рис. 1). У варіанті з подібним комплексом обробки за використання фунгіциду Февер активність АПО у корневих бульбочках сої була на рівні контрольних рослин. У фазі масового цвітіння в усіх варіантах з обробкою насіння досліджуваними фунгіцидами та інокуляцією *V. japonicum*, інкубованими з лектином, активність АПО у корневих бульбочках сої зростала.

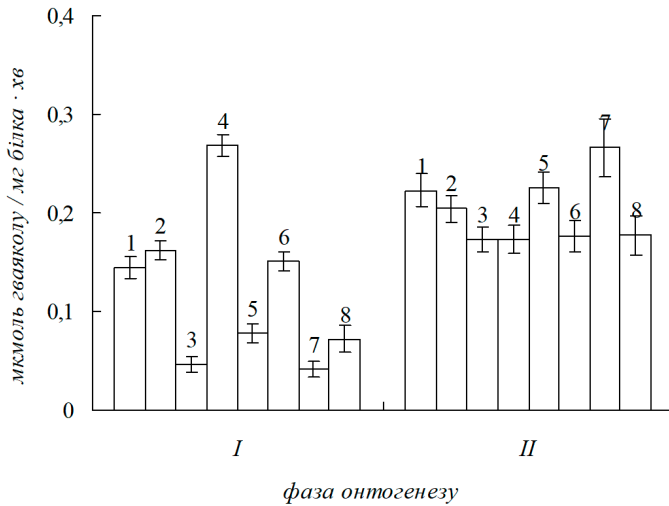


Рис. 2. Вплив препаратів із фунгіцидною дією на активність гваяколпероксидази у корневих бульбочках сої за інокуляції *B. japonicum* 6346, інкубованими з лектином.

Показано, що обробка насіння сої фунгіцидами спільно з інокуляцією ризобіями, інкубованими із лектином, індукувала підвищення активності ГПО у корневих бульбочках сої у фазі трьох справжніх листків порівнянно із подібним комплексом обробки насіння без лектину (рис. 2). Особливо різко інтенсивність ГПО зростала відносно усіх варіантів дослідження за використання комплексної обробки насіння ризобіями, інкубованими з лектином, та фунгіцидом Максим XL. За дії фунгіциду Февер активність ГПО була на рівні контрольних рослин, тоді як за дії Стандак Топу його активність знижувалась. У фазі масового цвітіння в усіх варіантах із обробкою насіння досліджуваними фунгіцидами спільно з ризобіями, інкубованими із лектином, активність ГПО у корневих бульбочках сої була нижчою у порівнянні з контролем.

Обговорення. Отримані нами дані у контрольованих умовах модельного вегетаційного дослідження показують, що використання гомологічного лектину сої у концентрації 100 мкг/мл як компонента інокуляційної суспензії для пом'якшення токсичної дії досліджуваних фунгіцидів на функціонування соєво-ризобіального симбіозу не виправдало очікуваних результатів.

Дослідженнями останніх років показано, що негативний вплив препаратів із фунгіцидною активністю на ефективність бобово - ризобіального симбіозу пов'язаний із порушенням регуляторної системи сигналіну між макро- і мікросимбіонтами, блокуванням активності генів нодуляції та зменшенням рівня ризобіального *Nod*-фактора [19, 20]. Крім того, виявлено, що кожна з досліджуваних хімічних речовин конкурентно обмежувала активацію генного *Nod*-фактора залежно від її концентрації та інгібує дію. Вченими показано, що пестициди можуть впливати через інгібування флавоноїдного *Nod*-рецептора, індукуючи пригнічення синтезу та секреції флавоноїдних речовин, що виробляються рослиною, тим самим порушуючи бобово-ризобіальний сигналінг [19, 20].

Виявлений нами різний ступінь впливу досліджуваних препаратів із фунгіцидною дією на ефективність формування та функціонування симбіотичного апарату залежить від характеру впливу діючих речовин, що входять до їх складу, та здатності утворених симбіотичних систем реалізувати свої симбіотичні властивості за певних умов вирощування.

Діючі речовини (фіпроніл, тіофанат-метил, піраклостробін), що входять до складу Стандак Топу поєднують фунгіцидну та інсектицидну дію. Кожна з цих речовин має особливий механізм дії, а також тривалість захисної дії. Зокрема, дія фіпронілу полягає у блокуванні гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК), яка регулює проходження нервового імпульсу через хлоріонні канали в мембранах нервових клітин, викликаючи порушення функції нервової системи комах. Термін дії препаратів на основі фіпронілу становить 28 діб [21]. Піраклостробін перешкоджає мітохондріальному диханню, блокуючи перенесення електронів, та порушує обмін енергії в клітині гриба. Період напіврозпаду ($T_{0,5}$) даної речовини у ґрунті 2 – 37 днів. Тіофанат-метил пригнічує утворення ергостеролу, а також біосинтез нуклеїнових кислот у клітинах грибів. Важливо відзначити, що тіофанат-метил відноситься до класу фунгіцидів бензimidазолів, які відрізняються дуже низькою хімічною стабільністю та при попаданні у ґрунт швидко (протягом декількох годин або навіть хвилин) гідролізуються до більш стійкої сполуки карбендазиму з $T_{0,5}$ у ґрунті від 3-х до 6-ти місяців [22]. Карбендазим характеризується терагенними, ембріотоксичними і канцерогенними властивостями. Як зазначають літературні джерела, тіофанат-метил потрапляє через коріння і переміщується по рослині в акропетальному напрямку по ксилемі, точніше його метаболіт карбендазим [22]. Очевидно, поєднання такого комплексу сполук є надто фізіологічно активним, що спричинило негативну дію на метаболічні процеси сої у симбіозі з ризобіями. При цьому найбільш негативний вплив на соєво - ризобіальний симбіоз, на нашу думку, спричинений саме наявністю у складі препарату речовини тіофанат-метилу. Попередньо проведені нами дослідження у контрольованих умовах показали, що використання у день посіву сої обробки насіння ризобіями спільно із фунгіцидом Бенорад, який відноситься до класу бензimidазолів, спричиняє повне пригнічення АФА корневих бульбочок [23]. Завчасна обробка (14 діб) насіння сої Бенорадом індукувала зміщення нодуляційної здатності ризобій та АФА корневих бульбочок на більш пізні фази онтогенезу – утворення бобів [23]. Такий ефект може бути зумовлений тим, що діюча речовина – беноміл, яка входить до складу препаратів Бенорад і Стандак Топ, є досить персистентною, й отже, тривалий час діє на фізіологічні процеси рослин.

Вплив діючої речовини (протіоконазолу, клас триазоли), що входить до складу препарату Февер, полягає в інгібуванні диметилази – ферменту, який відповідає за біосинтез стеролів (будівельний матеріал клітин патогену) і призводить до порушення цілісності клітинних стінок грибів та їх загибелі [1]. Проникаючи у рослини, триазоли можуть порушувати синтез гіберелінів у рослині і діяти як регулятори росту, спричиняючи ретардантний ефект. Тривалість $T_{0,5}$ даної речовини залежить від рН оточуючого середовища: у лужному – більше року, у кислому – до 120 днів, у водних фотолітичних умовах – до 48 год [22]. У наших дослідженнях використо-

вувалась обробка насіння чистою культурою *V. japonicum* 6346 (рН 7,2) спільно із водним розчином препарату Февер з наступним вирощуванням рослин у піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля, тобто були створені контрольовані умови з підтриманням нейтрального рН ґрунту, що могло бути причиною для нетривалого періоду дії препарату та його менш шкодочинного впливу на соєво - ризобіальний симбіоз у порівнянні з іншими досліджуваними фунгіцидами.

До складу препарату Максим ХЛ входять дві діючі речовини (флудіоксоніл і металаксил), одна з яких, флудіоксоніл, являє собою аналог природного антибіотика, що виділяється ґрунтовими бактеріями *Pseudomonas pyrocinia*, які пригнічують ріст патогенних грибів [22]. Вплив речовин підкласу триазолінтіонів на ріст і розмноження патогена пов'язують із порушенням функції клітинних мембран. Однак, вбиваючи збудників хвороб, даний препарат є абсолютно безпечним і не пригнічує корисну мікрофлору ґрунту. Тривалість $T_{0,5}$ в ґрунті від 10 до 25 днів [21]. Тому фунгіцидна дія Максиму не проявляла значного токсичного впливу на реалізацію симбіотичних властивостей сої у симбіозі з бульбочковими бактеріями.

Відомо, що саме на початкових етапах захисної відповіді рослини виділяються низькомолекулярні флавоноїди, так звані фітоалексини, синтез яких ініціюється елісаторами, більшістю з яких є олігосахаради, які утворюються при руйнуванні компонентів клітинної стінки рослини чи патогена [24]. Рецепторами для таких олігосахаридних сигналів, як і для симбіотичних взаємодій, як вважають, є рослинні лектини [6, 12]. Тому фітолектини, окрім активної участі у фізіологічних процесах, які супроводжують симбіотичні взаємовідносини макро- і мікросимбіонтів, задіяні в сигнальній системі захисних реакцій рослин.

Припускають, що наявність центрів гідрофобного зв'язування – характерна особливість структури рослинних лектинів, яка вказує на наявність у них самостійних сайтів, що відповідають за гідрофобну взаємодію з молекулами неуглеводної природи, зокрема фітогормонами, внаслідок чого вони можуть активно включатися в систему гормональної регуляції процесів росту і розвитку рослин [6, 25]. Очевидно, що отримані нами дані щодо пригнічення ефективності соєво - ризобіального симбіозу за обробки насіння *V. japonicum*, інкубованими з лектином, у поєднанні із фунгіцидами, могло бути пов'язане саме із блокуванням останніми гідрофобних сайтів зв'язування у молекулі білка, чим створювалась своєрідна конкуренція за сайти зв'язування з іншими хімічними сполуками, що спричинило зміни у процесах формування і функціонування соєво - ризобіального симбіозу. Як один із наслідків такої дії є порушення регуляторної функції ендогенних лектинів.

Вважають, що маючи два центри зв'язування, лектин одним із них може вибірково взаємодіяти з кислотними ізоформами пероксидази, а другим – із хітином. У відповідь на інфікування патогенами в рослинах активуються кислотні ізоформи пероксидази (аніонні), які у комплексі з лектином виконують захисну функцію [6, 11]. У літературі пероксидазну реакцію розглядають, як відповідь на проникнення ризобій у рослинну клітину [26]. Водночас, вважають, що пероксидази можуть нести достатньо інформації про фізіологічний стан рослини і слугувати критерієм стійкості до дії

стресових чинників біотичної й абіотичної природи [26, 27]. Інтенсифікація активності АПО та пригнічення активності ГПО у корневих бульбочках сої за дії фунгіцидів у фазі трьох справжніх листків і підвищення активності обох ферментів у фазі масового цвітіння вказують на суттєвий розвиток стрес-захисних реакцій у відповідь на обробку та здатність симбіотичних систем адаптуватись до певних умов вирощування. Використання лектину як компонента інокуляційної суспензії та обробки насіння сої фунгіцидами приводить до підвищення активності ГПО у корневих бульбочках у фазі трьох справжніх листків та зростання активності АПО у фазі масового цвітіння у порівнянні із подібним комплексом обробки без участі лектину. Це, з одного боку, могло б свідчити про активацію захисних реакцій рослин на рівні роботи ферментів із пероксидазною активністю. З іншого – вони не супроводжувались низкою адаптаційних перебудов метаболізму рослин у симбіозі з *V. jaronicum*, про що вказує пригнічення їх симбіотичних властивостей.

На підставі отриманих результатів можна зробити наступні висновки:

Використання комплексної обробки насіння сої фунгіцидами (Февер і Максим XL) та інокулянтном (штам *V. jaronicum* 6346) індукує підвищення рівня активності ферментів із пероксидазною активністю та сприяє збереженню ефективності роботи симбіотичного апарату.

Інокуляція сої суспензією ризобій, інкубованих із лектином, у комплексі з обробкою насіння фунгіцидами чинила негативний вплив на формування та функціонування соєво - ризобіального симбіозу. При цьому зафіксоване підвищення активності ГПО і АПО у корневих бульбочках, що свідчить про розвиток типової пероксидазної реакції у відповідь на комплексну обробку.

Гомологічний лектин насіння сої як компонент інокуляційної суспензії в концентрації 100 мкг/мл підвищує ефективність симбіотичних систем соя - *V. jaronicum* (штам стандарт 6346), однак не може розглядатися в якості антитоду токсичної дії фунгіцидів (Февер, Максим XL, Стандак Топ) на симбіотичний апарат у суворо контрольованих умовах модельного вегетаційного дослідження та потребує подальших досліджень у ґрунтовій культурі.

ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ И ПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ СОИ ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ РИЗОБИЯМИ, ИНКУБИРОВАННЫМИ С ЛЕКТИНОМ

А.В. Павлице, Т.П. Маменко, Л.И. Рыбаченко, С.Я. Коць

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина*

Резюме

Цель. Изучить влияние препаратов с фунгицидным действием на формирование и функционирование симбиотического аппарата и реакцию защитных ферментов с пероксидазной активностью (гваякол- и аскорбатпероксидазы) в корневых клу-

беньках сои при инокуляции *Bradyrhizobium japonicum*, инкубированных с лектином. **Методы.** Микробиологические, физиологические, биохимические, газовая хроматография, спектрофотометрия. **Результаты.** Использование обработки семян сои фунгицидами (Февер, Максим XL) совместно с инокулянт (штамм *B. japonicum* 634б) индуцирует повышение уровня ферментов с пероксидазной активностью и способствует сохранению эффективности работы симбиотического аппарата. Инокуляция сои суспензией ризобий, инкубированных с лектином, при обработке семян фунгицидами оказывала негативное влияние на формирование и функционирование соево - ризобиального симбиоза. **Выводы.** Гомологический лектин семян сои как компонент инокуляционной суспензии в концентрации 100 мкг/мл повышает эффективность симбиотических систем соя – *Bradyrhizobium japonicum* (штамм стандарт 634б), однако не может применяться в качестве антидота токсического действия фунгицидов (Февер, Максим XL, Стандак Топ) на симбиотический аппарат в строго контролируемых условиях вегетационного опыта и требует дальнейших испытаний в грунтовой культуре.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, гваяколпероксидаза, аскорбатпероксидаза, симбиоз, фунгицид, лектин.

INFLUENCE OF FUNGICIDES ON THE FORMATION, FUNCTIONING AND PEROXIDASE ACTIVITY OF ROOT SOYBEAN NODULES AT INOCULATION BY RHIZOBIA, INCUBATED WITH LECTIN

A.V. PAVLYSHCHE, T.P. MAMENKO, L.I. RYBACHENKO, S.Ya. KOTS

*Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine,
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine*

Summary

Aim. To study the influence of preparations with fungicidal action on the formation and functioning of a symbiotic apparatus and the reaction of protective enzymes with peroxidase activity (guaiacol- and ascorbate peroxidase) in root soybean nodules when inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*, incubated of lectin. **Methods.** Microbiological, physiological, biochemical, gas chromatography, spectrophotometry. **Results.** The use of complex treatment of soybean seeds with fungicides (Fever, Maxime XL) and inoculant (*B. japonicum* 634b strain) induces an increase in the level of enzymes with peroxidase activity and contributes to the preservation of the effectiveness of the robots of the symbiotic apparatus. Soybean inoculation with a suspension of rhizobia incubated with lectin, with treatment of seeds with fungicides, had a negative effect on the formation and functioning of soybean - rhizobial symbiosis. **Conclusion.** Homologous lectin of soybean seeds, as a component of inoculation suppression, at a concentration of 100 µg / ml, raises the effectiveness of soybean symbiotic systems - *Bradyrhizobium japonicum* (strain standard 634b), however, can not be considered as an antidote for toxic effects of fungicides (Fever, Maxim XL, Standak Top) on a symbiotic apparatus in strictly controlled conditions of a model vegetation experiment and requires further research in soil culture.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, symbiosis, fungicide, lectin.

1. Kobak SYa, Kolisnik SI, Serevetnyk OV. [The most common diseases of soybean and the effectiveness of BASF products for their control]. *Agrobusiness today*. 2016; 10(329):46-47. Ukrainian.
2. Sergienko V. [Diseases of soybeans and measures of its limitation]. *Agrobusiness today*. 2012; 11 (234):28-30. Ukrainian.
3. Trybel SO, Strigoon OO. [Phytopathological state of soybean agrocenoses and integrated plant protection]. *Plant protection and quarantine*. 2011; 57:224-247. Ukrainian.
4. Petrichenko VF, Kots SYa. [Symbiotic systems in modern agricultural production]. *Bulletin of NAS of Ukraine*. 2014; 3:57-66. Ukrainian.
5. Nikolaevsky V, Sirenko V, Titova L. [Effect of pre-seed bacterialization of seeds on disease development and yield of soya]. *Stiinta Agricola*. 2017; 1:55-59. Ukrainian.
6. Kirichenko OV. [Phytolectins and diazotrophs - polyfunctional components of complex biological compositions]. *Biotechnologia acta*. 2014; 7(1):40-53. Ukrainian.
7. Ayoub A, Causse H, van Damme EJM. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem. Syst. Ecol*. 1994; 22:488-495.
8. Rudiger H, Gabius HJ. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjug. J*. 2001; 18:589-613.
9. Belaeva VN, Panyuta OO, Taran NYu. The role of lectins in protective reactions of plants to the action of fventopathogens. *Physiology and biochemistry of the cult. Plants*. 2009; 41(3):221-223.
10. Babosha AV. [Inducible lectins and resistance of plants to pathogenic organisms and abiotic stresses]. *Biochemistry*. 2008; 73(7):1007-1022. Russia.
11. Hoff PLD, Brill LM, Hirsch AM. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol. Genet. Genomic*. 2009; 282 (1):1-15.
12. Kots SY, Morgun VV, Patyka VF et al. [Biological fixation of nitrogen: bean-rhizobial symbiosis]. Kiev: Logos; 2010. 508 p. Ukrainian.
13. Veselovskaya LI., Mikhalkov LM., Kots SYa. [Effect of exogenous lectin on the effectiveness of *Glycine max* - *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis under drought conditions]. *Plant physiology and genetics*. 2013; 45(4):319-326. Ukrainian.
14. Grodzinsky AM, Grodzinsky DM. [Brief Directory of Plant Physiology]. Kiev: Science thought, 1964. 388 pp. Ukrainian.
15. Hardy RWF., Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol*. 1968; 43(8):1185-1207.
16. Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 1981; 22(5):867-880.
17. Egley GH, Paul RN, Vaughn KC, Duke SO. Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida sprinosa* L. *Planta*. 1983; 157 (1):224-232.
18. Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; (72):248-254.
19. Fox JE, Gullledge J, Engelhaupt E, Burow ME, McLachlan JA. Pesticides reduce-symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *PNAS*. 2007; 104 (24):10282-10287.
20. Bikrol A, Saxena N, Singh K. Response of *Glycine max* in relation to nitrogen fixation as influenced by fungicide seed treatment. *African J. Biotechnol*. 2005; 4 (7):667-671.

21. Plant protection products - Bayer, Basf, Syngenta, Dupont, Avgust. Product catalog. URL: [http:// www.demetra-agra.com.ua](http://www.demetra-agra.com.ua).
22. Evtushenko MD, Marutin FM, Turenko VP et al. Phytopharmacologia - К .: Higher Education, 2004. 432 pp. Ukrainian.
23. Pavlyshe AV, Kirizy DA, Kots SYa. [Reaction of symbiotic soybean systems on the action of fungicides in different methods of processing]. Plant physiology and genetics. 2017; 49 (3):237-247. Ukrainian.
24. Etzler ME. From structure to activity: new insights into the functions of legume lectins. Trends Glycosci. Glycotechnol. 1998; 10 (53):247-255.
25. Owens RA, Blecburn M, Ding B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance varied movement. Mol. Plant-Micr. Int. 2001; 14 (7):905-909.
26. Zhiznovskaya GYa, Troitskaya GN, Borodenko LI, Izmaylov SF. Peroxidase and catalase in root nodules of fodder beans at effective and ineffective symbiosis with rhizobia. Physiology and Biochemistry of the cult. Plants. 2001; 33 (6):285-290. Ukrainian.
27. Kartashova ER., Rudenskaya GN, Yurina EV. Polyfunctionality of plant peroxidases and their practical use. S.- h. Biology. 2000; 5: 63-70.

Отримано 01.03.2018