

НІТРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ СОЄВО-РИЗОБІАЛЬНИХ СИМБІОЗІВ ЗА КОМПЛЕКСНОЇ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ

О. В. Кириченко

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна
e-mail: azoleki@ukr.net*

Мета. Оцінити нітрогеназну активність симбіотичних систем соя – *Bradyrhizobium japonicum* 6346 при моно- і комплексній (додаткові біоагенти – *Azotobacter chroococcum* T79 та фітолектини: лектин насіння сої і аглютинін зародків пшениці) інокуляції насіння у вегетаційних умовах з піщаною і ґрунтовою культурами **методом** ацетиленредукції. **Результати.** Встановлено, що симбіози, утворені соєю з комплексними інокулянтами, характеризувались суттєво підвищеним, порівняно до ризобіального моноінокулянту, рівнем нітрогеназної активності симбіотичних систем і морфо-структурної симбіотичної одиниці (кореневої бульбочки), а також азотфіксувальної здатності ризосферної мікробіоти на початкових етапах розвитку рослин за відсутності корневих бульбочок. Виявлено різну динаміку нітрогеназної активності соєво-ризобіальних симбіозів за комплексної інокуляції насіння. **Висновки.** Висока нітрогеназна активність даних симбіозів є передумовою більш високого рівня забезпечення рослин біологічним азотом. За інтенсивністю нітрогеназної активності як максимально перспективний відзначений поліінокулянт ризобії + (азотобактер + лектин пшениці)^{інкубація}. Пропонується використовувати комплексні композиції для бактеризації насіння сої як один із екологічно безпечних біотехнологічних шляхів підвищення рівня нітрогеназної активності симбіотичних систем.

Ключові слова: нітрогеназна активність, соєво-ризобіальні симбіози, ризобії, азотобактер, фітолектини, інокулянти, інтенсивність, динаміка.

У бобово-ризобіальних симбіозах відбувається взаємовигідна кооперація [1], в якій бактерії здійснюють зв'язування азоту за рахунок функціонування нітрогеназного комплексу і переводять його у доступну для рослин форму, тоді як продукти фотосинтетичної діяльності рослин є енергетичними субстратами для живлення й росту бактерій та перебігу процесу фіксації азоту. Не дивлячись на велике різноманіття діазотрофних (азотфіксувальних) мікроорганізмів [2, 3], всі вони мають одну ензимну систему – нітрогеназу (КФ 1.18.6.1), яка здійснює процес відновлення молекулярного азоту до аміаку. Нітрогеназа складається з двох білкових компонентів – Fe-білка (азоферредоксину) і MoFe-білка (молібдоферредоксину) [4]. Для функціонування нітрогенази потрібно наявність іонів металів (зазвичай Mg^{2+}), джерела енергії у вигляді АТФ, а також постійного притоку електронів, які надходять у ході процесів бродіння, дихання або фотосинтезу. Витрати енергії на один цикл перетворення інертної молекули N_2 в іон амонію NH_4^+ становлять 16 молекул АТФ. За функціонування азотфіксувальних мікроорганізмів на планеті Земля був сформований і нині підтримується азотний статус усіх екосистем [2, 3].

В агрофітоценозах, створених людиною, застосовується штучна бактеризація насіння сільськогосподарських культур активними за азотфіксацією штамми мікроорганізмів. Розробка біотехнологічних способів підвищення нітрогеназної активності фіто-бактеріальних систем, прикладом чого є комплексна бактеризація насіння [5-7], актуальна для вирішення питання більш високого рівня забезпечення культурних рослин екологічно чистим біологічним азотом як основним елементом живлення, а також нагромадження азоту в ґрунті при зниженні витрат мінеральних азотних добрив.

Високоактивні за азотфіксацією та ефективні у симбіозі з рослиною-хазяїном бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* є базовим елементом бактеріальних інокулянтів під сою [7]. Перспективними біологічними агентами, які можуть розширити спектр дії ризобіальних моноінокулянтів або ж стабілізувати їхню дію у стресових умовах, є фітотоксианти – лектини – протеїни з широким спектром біологічної активності відносно рослин, ґрунтових азотфіксувальних мікроорганізмів і фітопатогенних грибів [8-10], а також бактерії роду *Azotobacter* [2, 8, 11–13]. Отже, розробка наукового підґрунтя для створення та визначення азотфіксувальної активності нових біологічних композицій, які б характеризувалися більш високим рівнем здатності до засвоєння біологічного азоту та ефективністю утворених симбіотичних систем, зокрема, із рослинами сої – стратегічної зернобобової культури України, є актуальним завданням сьогодення.

Метою роботи була комплексна оцінка інтенсивності та динаміки нітрогеназної активності симбіотичних систем соя – *B. japonicum* 634б протягом вегетації рослин (симбіотичного апарату рослини й морфо-структурної симбіотичної одиниці – кореневої бульбочки) за інтродукції на насіння бактерій роду *Azotobacter* у складі комплексних інокулянтів під впливом фітолектинів (лектину насіння сої й аглютиніну зародків пшениці), а також азотфіксувальної здатності ризосферних діазототрофів за відсутності процесу фіксації азоту симбіотичними бульбочками.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були симбіотичні системи, утворені рослинами сої *Glycine max* L. Мерг. сорту Аннушка, бульбочковими бактеріями *B. japonicum* 634б і ризосферними діазототрофами *Azotobacter chroococcum* T79 (колекція штамів симбіотичних та асоціативних азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, ІФРГ НАН України, м. Київ) під впливом фітолектинів – лектину насіння сої (ЛНС), аглютиніну зародків пшениці (АЗП, «Лектинотест», м. Львів). Сорт Аннушка є ранньостиглим (національний стандарт України), віднесений до Реєстру сортів, поширених до використання в Україні з 2007 року. Оригіна́тор сорту – наукова селекційно-насінницька фірма «Соевий вік» (м. Кропивницький).

Культури мікроорганізмів *B. japonicum* 634б і *A. chroococcum* T79 вирощували на твердих живильних середовищах – манітно-дріжджовому агарі та Ешбі [14] протягом 10 і 3 діб відповідно, після чого робили змиви стерильною водою і визначали кількість бактерій у суспензіях методом серійних розведень із наступним висівом на живильні середовища і підрахунком колоній, що виростили [14]. Титр бактерій у суспензіях становив відповідно 10^9 і 10^8 кл/мл. Мікробні композиції готували шляхом

змішування й інкубації (i) компонентів протягом доби. Співвідношення компонентів композицій (v:v). вказані у схемі дослідів. Обробку насіння інокуляційними суспензіями проводили за годину до висіву.

Оцінку функціональної (нітрогеназної) активності симбіозів здійснювали в умовах вегетаційних дослідів із піщаною (промийтий річковий пісок: відсутність аборигенних ризобій сої) і ґрунтовою (ґрунт світло-сірий лісовий опідзолений супіщаний із вмістом на 100 г: гумусу 1,6%, рухомого фосфору 3–6 мг, калію 8–12 мг, легко гідролізованого азоту 10–12 мг, рН 5,5: може бути наявність аборигенних ризобій сої) культурами. Досліди проводили на вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України за природного освітлення та температури повітря у 5-кратній повторності по варіантам. У субстрат росту рослин вносили живильну суміш Гельригеля з 0,25 норми мінерального азоту [2]. Досліди проводили за наступною схемою:

- | № варіанту | Обробка насіння |
|------------|---|
| 1. | Без інокуляції (абсолютний контроль, обробка насіння водою). |
| 2. | <i>B. japonicum</i> 6346 + вода, 1:1(штам-контроль, моноінокулянт). |

Бінарні інокулянти:

- | | |
|----|---|
| 3. | (<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>Azotobacter chroococcum</i> T79)i, (1:1). |
| 4. | (<i>B. japonicum</i> 6346 + ЛНС)i, (1:1). |

Поліінокулянти:

- | | |
|----|---|
| 5. | <i>B. japonicum</i> 6346 + (<i>A. chroococcum</i> + АЗП)i, (1:1). |
| 6. | (<i>B. japonicum</i> 6346 + ЛНС)i + <i>A. chroococcum</i> T79, (1:1):1. |
| 7. | (<i>B. japonicum</i> 6346 + ЛНС)i + (<i>A. chroococcum</i> + АЗП)i, (1:1):1. |

Примітка: і – сумісна інкубація компонентів.

До схеми дослідів з піщаною культурою включено варіанти №1–4 і 6, з ґрунтовою культурою – №1–7.

Протягом вегетації рослин (фази розвитку примордіального й одного справжнього листка, трьох трійчастих листків, цвітіння, активного плодоутворення) оцінювали показники нітрогеназної активності (НГА) кореневих бульбочок сої та ризосферної мікробіоти методом ацетиленредукції [15]. Ензимна нітрогеназна система здатна відновлювати широкий спектр сполук із потрійними зв'язками, в тому числі й ацетилен, тобто даний ензим має низьку субстратну специфічність і йому не характерна чітка специфічність щодо відновлювальних субстратів. На відновленні ацетилену заснований метод визначення активності нітрогенази [15]. Ацетиленвідновлювальна активність представляє собою інтенсивність нітрогеназної реакції відновлення ацетилену до етилену, кількісний вміст якого визначається за використання газової хроматографії.

Для визначення нітрогеназної активності відмиті корені рослин (активність симбіотичних бульбочок) або корені з ґрунтом (активність ризосферної мікробіоти) розміщували у герметичних флаконах, з яких відбирали по 5 мл газової фази і вводили по 5 мл ацетилену (до 10% газової фази). Вміст флакону збовтували й інкубували протягом 1 год за температури 22° С. Після завершення інкубації 1 мл газової суміші, яка містить етилен, що утворився в результаті редукції ацетилену нітрогеназою, аналізували на газовому хроматографі «Chromatograf 504» («Mera Elwro», Польща) у режимі полум'яно-іонізаційного детектування. Розділення газів відбу-

валосся на колонці (0,40 × 130 см), заповненій Paropak T за температури 80° С. Як газ-носії використовували азот (40 см³/хв), як стандарт – чистий етилен. Робочу калібровочну суміш готували шляхом послідовного розбавлення етилену повітрям і аналізували хроматографічно. При кінцевому розрахунку враховували калібровочний коефіцієнт. Після завершення аналізу вимірювали газову фазу кожного флакону з коренем рослини та масу кореневих бульбочок даної рослини – параметри, необхідні для розрахунку ацетиленвідновлювальної активності. Кількість етилену, утвореного з ацетилену за час інкубування зразка (1 або 2 год) під дією нітрогенази виражали в молярних одиницях (мкмоль або наномоль C₂H₄). Нітрогеназну активність симбіотичного апарату сої виражали в мкмоль C₂H₄ / (рослину • год) – загальна активність, мкмоль C₂H₄ / (г бульбочок • год) – питома активність. Нітрогеназну активність однієї морфо-структурної симбіотичної одиниці (бульбочки) виражали в мкмоль або наномоль C₂H₄ / (бульбочку • год) та мкмоль або наномоль C₂H₄ / (масу бульбочки • год). Азотфіксувальну здатність ризосферної мікробіоти оцінювали на ранній стадії розвитку сої (примордіального й одного справжнього листка) за відсутності симбіотичних бульбочок на коренях рослин і виражали в наномолях C₂H₄ / (рослину • 2 год інкубації).

Вимірювання ацетиленвідновлювальної активності здійснювали у 4–9-кратній повторності на варіант. Статистична обробка результатів проведена у програмі Statgraphics Plus (V. 3.0). У таблицях наведено середні арифметичні значення та стандартні похибки (M ±m).

Результати. Встановлено (табл. 1), що в умовах ґрунтової культури комплексні інокулянти (№ 4–7) суттєво підвищували азотфіксувальну здатність ризосферної мікробіоти сої на початку вегетації рослин за відсутності симбіотичних структур на коренях (табл. 1), що збільшувало рівень азотного живлення рослин при однаковому вихідному рівні мінерального азотного живлення (0,25 норми азоту в субстраті росту) за рахунок біологічного азоту ризосферних діазотрофів. Максимальну здатність до фіксації азоту виявлено у варіантах № 5 і 6, дещо меншу – № 4 і 7. Рослини, інокульовані бінарною бактеріальною композицією (№ 3) характеризувалися здатністю до біологічного перетворення молекулярного азоту на рівні варіанту № 2 (штам-контроль).

В умовах піщаної культури (табл. 1) нітрогеназна активність ризосферних мікроорганізмів у варіантах із лектиновими композиціями (№ 4, 6) в 1,5 рази переважала показник абсолютного контролю (а. к.) і в 1,2 рази – штаму-контролю, що може вказувати на краще забезпечення рослин даних варіантів азотом при однаковому вихідному рівні азотного живлення. Інокуляція насіння сої ризобіями (№ 2) та бінарною композицією (ризобії+ азотобактері) (№ 3) забезпечила підвищення рівня фіксації азоту ризосферною мікробіотою в 1,2 рази вище контролю (№ 1).

У другу половину вегетації рослин сої в умовах піщаної культури (фази цвітіння, активного формування бобів) за наявності високих показників нітрогеназної активності корневих бульбочок (табл. 2) азотфіксувальна здатність ризосферних діазотрофів суттєво послаблювалася

(вже у фазі цвітіння рослин сої відсутні піки виходу етилену на хроматограмах). При цьому встановлена суттєва різниця за показником нітрогеназної активності симбіотичного апарату між варіантами з моно- та комплексною інокуляцією насіння сої (табл. 2). За інокуляції насіння композицією № 4 (ризобії + ЛНС) і загальна нітрогеназна активність кореневих бульбочок (на рослину) у фазі цвітіння підвищувалася вдвічі порівняно до моноінокуляції ризобіями. Питома нітрогеназна активність (на г бульбочок) у варіантах № 4, 6, що містять лектиновий компонент, також достовірно відрізнялася від контролю (в 2,6 і 1,5 рази більше за контроль). Нітрогеназна активність морфо-структурної симбіотичної одиниці – кореневої бульбочки (на 1 бульбочку), а також (на масу 1 бульбочки) у даних варіантах позитивно достовірно відрізнялася від контролю (в 2,6 і 1,5 рази та в 2,7 і 3,1 рази відповідно). На відміну від лектинових композицій, бактеріальна композиція (ризобії + азотобактер) і у період цвітіння сої в піщаній культурі проявила ефективність на рівні ризобіального моноінокулянту за всіма показниками нітрогеназної активності (табл. 2). Однак у наступній фазі вегетації саме дана композиція характеризувалася максимальною ефективністю відносно показників нітрогеназної активності симбіотичного апарату: НГА кореневих бульбочок перевищувала контрольні значення в 1,5 і 3,1 рази (табл. 2). Симбіотична система, утворена ризобіями, модифікованими лектином (№ 4), у даній фазі розвитку рослин характеризувалася високими показниками нітрогеназної активності, які перевищували контрольні в 2,3 і 1,2 рази. Поліінокулянт № 6 ((ризобії + ЛНС) і + азотобактер) утворив симбіоз із загальною функціональною активністю в 2,3 рази більшою за контроль (табл. 2). Слід відмітити, що як в умовах піщаної культури (табл. 2), так і ґрунтової (рис. 2) у варіанті без інокуляції насіння не було відмічено утворення кореневих бульбочок, отже, контролем за нітрогеназною активністю симбіозів виступав варіант із інокуляцією насіння монокультурою ризобій сої (№ 2).

Таблиця 1

Азотфіксувальна активність ризосферної мікробіоти сої на ранніх етапах онтогенезу (фаза 1 справжнього листка для піщаної культури, примордіального листка для ґрунтової культури)

№	Варіант (передпосівна обробка насіння)	Піщана культура	Ґрунтова культура
		Нітрогеназна активність, наномоль C ₂ H ₄ / (рослину • 2 год)	
1	Вода (абсолютний контроль)	1,479±0,160	1,583±1,613
2	Ризобії (штам-контроль)	1,829±0,253	5,592±0,732
3	(Ризобії+азотобактер)і	1,797±0,213	7,359±1,609
4	(Ризобії + ЛНС)і	2,192±0,163*	104,730±7,322*
5	Ризобії+(азотобактер+АЗП)і	-	165,103±27,615*
6	(Ризобії + ЛНС)і + азотобактер	2,271±0,189*	161,625±19,156*
7	(Ризобії + ЛНС)і + (азотобактер+АЗП)і	-	110,465±13,128*

Примітка: дивись тут і надалі. 1. № – варіанти, аналогічні для всіх таблиць. 2. ЛНС – лектин насіння сої, АЗП – аглютинін зародків пшениці (лектин пшениці). 3. «-» – не визначали. 4. * – достовірно (p≤0,05) до штаму-контролю (варіант № 2).

Таблиця 2
Нітрогеназна активність соєво-ризобіальних симбіозів за комплексної інокуляції насіння (пшана культура)

№	Варіант (передпосівна обробка насіння)	НГА симбіотичного апарату		НГА морфо-структурної симбіотичної одиниці (бульбочки)	
		мкмоль C_2H_4 / (рослину • год)	мкмоль C_2H_4 / (г бульбочок • год)	нано моль C_2H_4 / (бульбочку • год)	нано моль C_2H_4 / (масу бульбочки • год)
цвітіння – початок утворення бобів, 50-денні рослини					
2	Ризобії (штам-контроль)	0,788±0,122	6,984±0,957	81,595±16,349	85,898±15,922
3	(Ризобії+азотобактер)і	0,554±0,386	6,779±1,437	101,197±13,483	102,993±12,794
4	(Ризобії + ЛНС)і	1,554±0,257*	17,978±2,608*	236,560±55,883*	232,279±52,102*
6	(Ризобії + ЛНС)і + азотобактер	0,852±0,199	10,431±3,505*	268,098±59,115*	268,098±59,115*
активне утворення бобів, 58-денні рослини					
№	Варіант	мкмоль C_2H_4 / (рослину • год)	мкмоль C_2H_4 / (г бульбочок • год)	мкмоль C_2H_4 / (бульбочку • год)	мкмоль C_2H_4 / (масу бульбочки • год)
2	Ризобії (штам-контроль)	1,564±0,354	27,946±3,906	0,889±0,179	0,049±0,012
3	(Ризобії+азотобактер)і	4,854±1,238*	42,777±3,923*	1,824±0,325*	0,125±0,026*
4	(Ризобії + ЛНС)і	3,536±0,692*	34,401±2,796	1,428±0,238*	0,111±0,029*
6	(Ризобії + ЛНС)і + азотобактер	3,515±0,274*	29,241±1,799	0,851±0,067	0,136±0,007*

Сумарна нітрогеназна активність симбіотичних систем сої за другу половину вегетації в умовах піщаної культури засвідчила більш високу ефективність комплексних інокулянтів порівняно до моноінокуляції насіння бульбочковими бактеріями (рис. 1, А). Приріст за нітрогеназною активністю симбіозів при комплексній інокуляції насіння композиціями (ризобії + азотобактер)і, (ризобії + ЛНС)і, (ризобії + ЛНС)і + азотобактер становив відповідно 42–130 %, 50–154 %, 14–199 %. При цьому лектиновмісні композиції суттєво підвищували азотфіксувальну активність (на масу бульбочки), тоді як композиції з азотобактером – загальну нітрогеназну активність (на рослину).

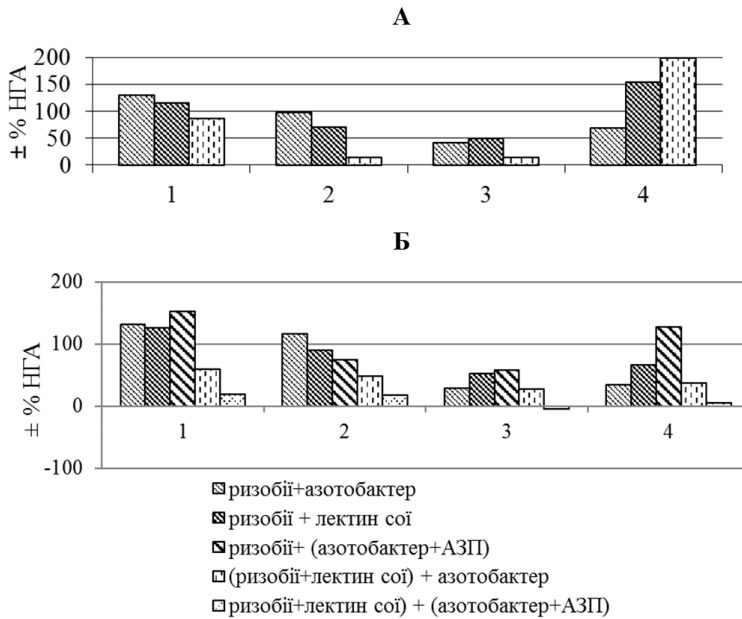
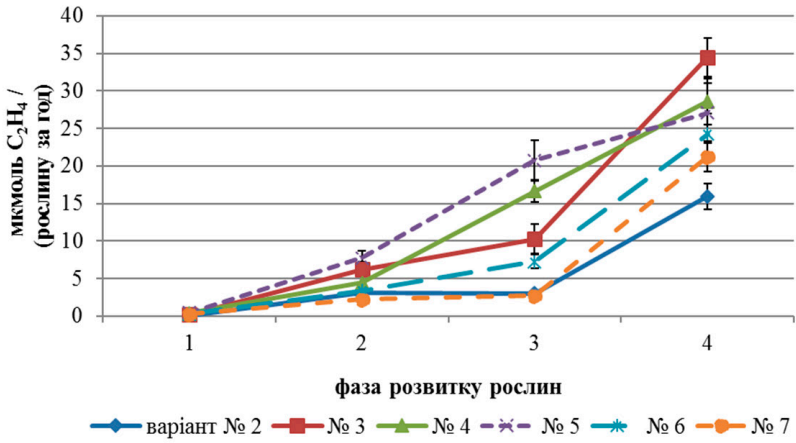


Рис. 1. Приріст за нітрогеназною активністю (% до штам-контролю) симбіотичних систем сої за комплексної інокуляції насіння (А – піщана культура, Б – ґрунтова культура)

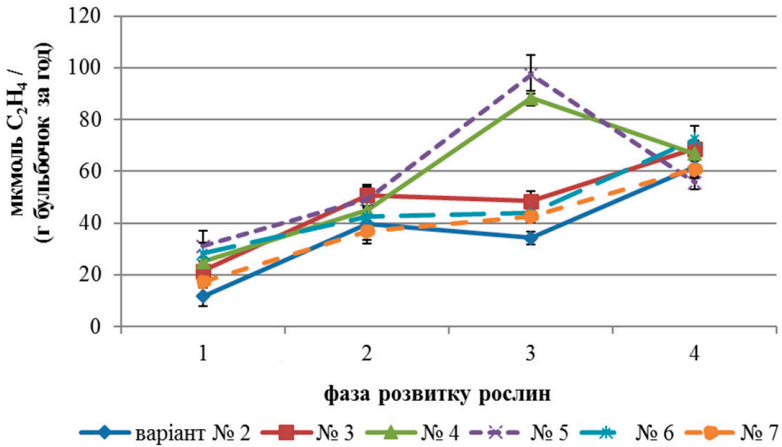
На осі ординат: приріст за сумарною НГА у % відносно штам-контролю.
 На осі абсцис: 1 – (НГА / рослину • год), 2 – (НГА / бульбочку • год),
 3 – (НГА / г бульбочок • год), 4 – (НГА / масу бульбочки • год)

В умовах ґрунтової культури (рис. 2) у рослин сої в фазі розвитку одного справжнього листка, на відміну від піщаної культури (табл. 1), відмічена здатність до фіксації молекулярного азоту кореневими бульбочками. Комплексні інокулянти (№ 3–7) утворили симбіози з рівнем нітрогеназної активності (на рослину за годину) в 1,9–4,1 рази більше, ніж ризобії (рис. 2А). Максимальна ефективність за даним показником встановлена для варіантів № 4, 5 (активність переважала дію ризобій в 3,5 і 4,1 рази). Нітрогеназна активність бульбочок у варіантах № 6 і 7 була більшою за варіант № 2 в 2,4 і 2,6 рази. Бінарний бактеріальний інокулянт (ризобії + азотобактер)і утворив симбіоз із вдвічі більшою активністю азотфіксації, ніж бульбочкові бактерії сої.

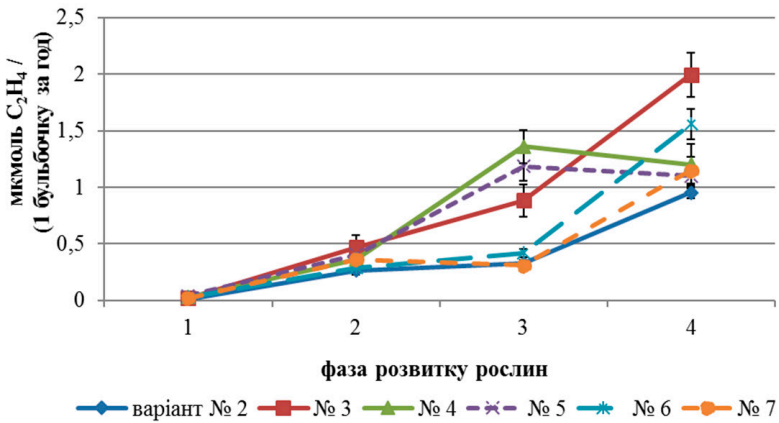
А



Б



В



Г

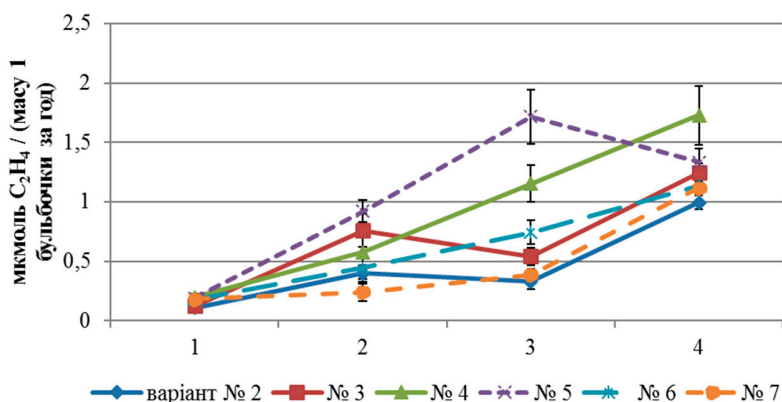


Рис. 2. Нітрогеназна активність сосво-ризобіальних симбіозів протягом вегетації рослин за комплексної бактеризації насіння (грунтова культура)

А – мкмоль C_2H_4 / (рослину • год) – загальна активність, Б – мкмоль C_2H_4 / (г бульбочок • год) – питома активність, В – мкмоль C_2H_4 / (бульбочку • год), Г – мкмоль C_2H_4 / (масу бульбочки • год)

Фаза розвитку рослин: 1 – одного справжнього листка, 2 – трьох трійчастих листків, 3 – цвітіння, 4 – активного плодоутворення

Аналогічна ефективність дії досліджуваних композицій у порівнянні до ризобіального моноінокулянту встановлена й для показника нітрогеназної активності (на бульбочку за годину, рис. 2В): у варіантах № 4–6 – в 3,0 і 4,0 рази більше, варіантах № 7 і 3 – в 2,0 рази більше за штам-контроль. За питоною нітрогеназною активністю (г бульбочок за годину, рис. 2Б) у даній фазі вегетації сої також відзначено варіанти № 4–6, в яких спостерігалася максимальна різниця з варіантом № 2: активність кореневих бульбочок була більшою за штам-контроль відповідно у 2,1; 2,7 та 2,4 рази. Нітрогеназна активність (на масу бульбочки за годину, рис. 2Г) характеризувалася високими показниками у варіантах № 4–7 і переважала штам-контроль у 1,6–1,8 рази. У фазі розвитку трьох трійчастих листків у сої за всіма показниками нітрогеназної активності позитивно відзначено варіанти № 3 і 5 (рис. 2), в яких рівень фіксації азоту переважав штам-контроль відповідно у 2,0 і 2,5 рази (на рослину за год, рис. 2А), в 1,3 і 1,2 рази (на грам бульбочок за год, рис. 2Б), в 1,8 і 1,5 рази (на бульбочку за год, рис. 2В), в 1,9 і 2,3 рази (на масу бульбочки за год, рис. 2Г). У фазі цвітіння сої максимальними рівнями азотфіксувальної здатності характеризувалися симбіози, утворені комплексними інокулянтами № 4 і 5: більше за штам-контроль відповідно в 5,5 і 6,8 рази (на рослину за год, рис. 2А), в 2,6 і 2,9 рази (на грам бульбочок за год, рис. 2Б), в 4,2 і 3,7 рази (на бульбочку за год, рис. 2В), в 6,5 і 5,2 рази (на масу бульбочки за год, рис. 2Г). У фазі активного плодоутворення азотфіксувальна активність симбіозів, сформованих комплексними інокулянтами № 3–5, в 1,7–2,2 рази (на рослину за год, рис. 2А), в 1,3–1,7 (на масу бульбочки за год, рис. 2Г) перевищувала штам-контроль.

Отже, за інтенсивністю нітрогеназної активності соєво-ризобіальні симбіози, утворені комплексними інокулянтами, різняться між собою. Максимальну інтенсивність нітрогеназної активності забезпечив симбіоз варіанту № 5, дещо меншу – симбіози варіантів № 3 і 4, що обумовило більш високий рівень забезпечення рослин біологічним азотом протягом усіх досліджуваних фаз вегетації сої.

Динаміка нітрогеназної активності кореневих бульбочок за комплексної інокуляції насіння також різнилася (рис. 2). Зміни нітрогеназної активності бульбочок (на рослину за год, рис. 2А і на 1 бульбочку за год, рис. 2В) у варіантах № 2, 3, 6, 7 описувалися гіперболою з максимальними значеннями у фазі активного плодоутворення, тоді як у варіантах № 4, 5 – наближалися до лінійної залежності. Динаміка питомої нітрогеназної активності (рис. 2Б) була аналогічною у варіантах № 2, 3, 6, 7 із двома піками (у фазі 3 трійчастих листків і активного плодоутворення) та у варіантах № 4, 5 – з одним піком у фазі цвітіння. Зміни нітрогеназної активності на масу бульбочки за год (рис. 2Г) мали двопікову динаміку у варіантах № 2, 3 (фази 3 трійчастих листків і активного плодоутворення); однопікову (фаза цвітіння) – у варіанті № 5, лінійну (або наближену до лінійної) – у варіантах № 4, 6, 7.

Комплексні інокулянти № 3–5 в умовах ґрунтової культури порівняно до ризобіального моноінокулянту № 2 сформували з рослинами сої симбіози з високою здатністю до фіксації азоту протягом усього вегетаційного періоду (рис. 1, Б), починаючи з самих ранніх етапів його функціонування, що є передумовою більш кращого забезпечення рослин даним елементом живлення: для НГА / (рослину за год) – в 2,3–2,5 рази, для НГА / (г бульбочок за год) – в 1,3–1,6 рази більше за ризобіальний моноінокулянт. Симбіотична система, утворена поліінокулянтом №6 характеризувалася нітрогеназною активністю (сумарною за вегетацію), яка в 1,3–1,6 рази перевищувала таку в контрольному варіанті. Поліінокулянт № 7 сформував симбіотичну систему з самим низьким рівнем нітрогеназної активності (рис. 1, Б). За інтенсивністю нітрогеназної активності (сумарна за вегетацію, рис. 1, Б) морфо-структурної симбіотичної одиниці (кореневої бульбочки) позитивно відзначено варіанти № 3 і 4, у меншій мірі – № 5 і 6.

Обговорення. Симбіотичні бобово-ризобіальні системи здатні за вегетаційний період нагромаджувати до 500 кг азоту /га, зокрема, соєво-ризобіальні симбіози залежно від географічних поясів, агрокліматичних умов, сортів і штамів макро- й мікросимбіонтів – від 80 до 180 кг/га біологічного азоту. Так, сорт Аннушка за інокуляції насіння специфічними бульбочковими бактеріями штаму 634а в умовах Підмосков'я за максимальної маси активних бульбочок 200 кг/га та вмісту леггемоглобіну в бульбочках 5,4 мг/г накопичив біологічного азоту 97 кг/га і сформував урожай 2,6 т/га [16]. У ризосферній зоні сої присутні мікроорганізми, які здатні до фіксації молекулярного азоту, хоча і значно меншій, ніж у ризобій сої, за відсутності корневих бульбочок на коренях рослин, що підтверджено нашими результатами, представленими у табл. 1. Дослідження різноманіття гена *nifH* – молекулярного маркеру азотфіксації при оцінюванні складу діазотрофних угруповань ризосферного ґрунту сої, яку вирощували як

без інокуляції, так і з обробкою насіння бактеріальними інокулянтами на основі ризобій, бацил та флавоноїду генистеїну дозволило встановити домінування діазотрофних мікроорганізмів, які віднесені до *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Spirochaeta* [17]. Методом аналізу *nifH* ґрунтових зразків бактерії роду *Azotobacter* у популяції ґрунтових діазотрофів визначені як максимально активні за азотфіксацією мікроорганізми [11].

Отже, як бульбочкові бактерії у симбіозі з рослинами сої протягом вегетації (табл. 2, рис. 2), так і діазотрофні мікроорганізми ризосфери сої на початкових етапах онтогенезу рослин за відсутності симбіотичних структур на коренях (табл. 1) фіксують азот за рахунок наявності у них ензиму нітрогенази [3, 4], забезпечуючи рослини сої біологічним азотом. Згідно з отриманими нами результатами (табл. 2, рис. 2) рівень забезпечення рослин біологічним азотом як базовим елементом формування їх продуктивності [18] можна підвищити за рахунок інокуляції насіння комплексними композиціями, в яких відбувається синергізм за нітрогеназною активністю двох діазотрофних бактерій *B. japonicum* 634б та *A. chroococcum* T79 порівняно до моноінокулянту ризобій, а також активування функціонування нітрогеназного ферментного комплексу біологічно активними речовинами протеїнової природи – лектином насіння сої й аглютиніном зародків пшениці. Саме за рахунок наявності додаткових агентів у композиціях – азотфіксувальних бактерій роду *Azotobacter* та фітолектинів і забезпечується перевага комплексних композицій відносно ризобіального моноінокулянту щодо нітрогеназної активності соєво-ризобіальних симбіозів. Ризобактерії роду *Azotobacter* характеризуються комплексом позитивних ефектів щодо рослин і ґрунту [2, 8], серед яких визначальними є здатність до фіксації молекулярного азоту [2, 11, 19], синтезу речовин рістрегуляторної дії [12, 20, 21], біоремедіації ґрунтів [13]. Раніше нами показано, що азотобактер підвищував азотфіксувальну здатність симбіотичних (до 1,6 рази [2, 19]) та асоціативних (до 2,5 рази [2, 8]) систем в умовах *in situ*. Біологічно активні речовини (гормони ауксинової та цитокінінової природи, амінокислоти, вітаміни), які синтезують дані бактерії [12, 20, 21], безпосередньо впливають на розвиток кореневої системи рослин – середовища існування агрономічно корисних ризобактерій, в тому числі й діазотрофних, а також гормональний статус і функціонування фотосинтетичного апарату рослин, в результаті чого підвищується надходження фотоасимілятів до коренів, які забезпечують енергетичну складову перебігу процесу фіксації азоту. Фітолектини – біологічно активні речовини, які за екзогенної дії на діазотрофні бактерії (ризобії, ризобактерії) стимулюють ріст і розвиток популяції азотфіксувальних мікроорганізмів в умовах *in vitro* та *in situ* [8, 10], підвищують ступінь реалізації азотфіксувального потенціалу фітобактеріальних симбіозів і асоціацій [2, 8-10, 22, 23], фотосинтетичну активність [8, 9, 22] та вміст гормонів цитокінінової й ауксинової природи в листках вегетуючих рослин [23]. Вважають, що одним із можливих напрямів дії фітолектинів на рослини є координація даними протеїнами двох основних фізіологічних процесів – фотосинтезу й азотфіксації, які визначають реалізацію продуктивного потенціалу фітобактеріальних систем [8, 22], а також пряма гормональна регуляція росту й розвитку рослин за рахунок впливу на їх гормональний баланс [8, 23].

Таким чином, оцінка інтенсивності та динаміки нітрогеназної активності соєво-ризобіальних симбіозів (симбіотичного апарату й морфо-структурної симбіотичної одиниці – кореневої бульбочки) за інтродукції бактерій роду *Azotobacter* у складі комплексних інокулянтів під впливом фітолектинів (лектину насіння сої й аглютиніну зародків пшениці) на культури мікроорганізмів засвідчила більш високу здатність до фіксації молекулярного азоту симбіотичних систем, утворених за комплексної бактеризації насіння, порівняно до традиційної інокуляції монокультурою ризобій, в тому числі й за рахунок азотфіксувальної здатності ризосферних діазотрофів при відсутності процесу фіксації азоту симбіотичними бульбочками, починаючи з самих ранніх етапів розвитку рослин. При цьому визначено поліінокулянт на основі бульбочкових бактерій сої та азотобактеру, активованого аглютиніном зародків пшениці, як такий, що забезпечує найвищий рівень азотфіксації протягом вегетації рослин сої, що вказує на перспективність його подальших досліджень із метою розробки нових комплексних бактеріальних препаратів для інокуляції сої.

НИТРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНЫХ СИМБИОЗОВ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН

Е. В. Кириченко

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

Резюме

Цель. Оценить нитрогеназную активность симбиотических систем соя – *Bradyrhizobium japonicum* 6346 при моно- и комплексной (дополнительные биоагенты – *Azotobacter chroococcum* T79 и фитолектины: лектин семян сои, аглютинин зародышей пшеницы) инокуляции семян в вегетационных условиях с песчаной и почвенной культурами **методом** ацетиленредукции. **Результаты.** Установлено, что симбиозы, образованные соей с комплексными инокулянтами, характеризовались повышенной по сравнению с ризобийным моноинокулянтом нитрогеназной активностью симбиотических систем и одной морфо-структурной симбиотической единицы (корневого клубенька), а также азотфиксирующей способностью ризосферной микробиоты в ранние фазы развития сои при отсутствии корневых клубеньков. Выявлена разная динамика нитрогеназной активности соєво-ризобіальних симбіозів при комплексной инокуляції семян. **Выводы.** Высокая нитрогеназная активность данных симбиозов является предпосылкой более высокого уровня обеспечения растений азотом. По уровню интенсивности нитрогеназной активности как максимально перспективный отмечен полиинокулянт ризобии + (азотобактер + лектин пшеницы)_{инокуляция}. Предлагается использовать комплексные композиции для бактеризации семян сои как один из экологически безопасных биотехнологических путей повышения уровня нитрогеназной активности симбиотических систем.

Ключевые слова: нитрогеназная активность, соєво-ризобіальні симбіозы, ризобии, азотобактер, фитолектины, инокулянты, интенсивность, динамика.

NITROGEN-FIXING ACTIVITY OF SOYBEAN-RHIZOBIUM SYMBIOSES AT THE COMPLEX SEED INOCULATION

O. V. Kyrychenko

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

Summary

Aims. Nitrogen-fixing activity of soybean-rhizobium symbioses at the mono- (*Bradyrhizobium japonicum* 634b) and complex (additional bioagents – *Azotobacter chroococcum* T79, phytolectins: lectin of soybean seed, wheat germ agglutinin) seed inoculation was studied in the greenhouse experiments with sandy and soil cultures at the using of acetylene reduction **method. Results.** It was shown that symbioses of soybean plants and complex inoculants characterized by increasing nitrogen-fixing activity of the symbiotic systems, functional activity of the one morpho-structural symbiotic unit (root nodule) as well as the nitrogen fixing ability of the rhizospheric microbiota in the early soybean development phases in the absence of root nodules by comparison to rhizobium monoinoculant. The different dynamics of the soybean-rhizobium symbioses nitrogen-fixing activity at the complex seed inoculation was studied. **Conclusion.** Higher nitrogen-fixing activity of its symbioses is a condition for ensuring a higher level of the plants nitrogen nutrition. As maximally perspective on the level of nitrogen-fixing activity intensity was marked the polyinoculant – rhizobium + (azotobacter + wheat lectin)_{incubation}. It was suggested to use the complex compositions for the soybean seed bacterization as one of the environmentally sound (biotechnological) ways of the increase of the symbiotic systems nitrogen-fixing activity.

Keywords: nitrogen-fixing activity, soybean-rhizobium symbioses, rhizobium, azotobacter, phytolectins, inoculants, intensity, dynamic.

1. Provorov NA, Shtark OY, Zhukov VA, Borisov AY, Tikhonovich IA. Developmental Genetics of Plant-Microbe Symbioses. New York: NOVA Science Publishers Inc.; 2010.
2. Kots SYa, Morgun VV, Patyka VPh, Petrichenko VPh, Nadkernichnaia EV, Kirichenko EV. [Biological Nitrogen Fixation. Associative Nitrogen Fixation]. Kiev: Logos; 2014. Russian.
3. Isobe K, Ohte N. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-cycling. *Microbes Environ.* 2014; 29(1):4–16.
4. Seefeldt L, Dance I, Dean D. Substrate Interactions with Nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry.* 2004; 43(6):1401–1409.
5. Garipova SR. [The Ecological Role of Endophytic Bacteria in Symbiosis with Legumes and Their Use in Plant Breeding]. *Advances in Current Biology.* 2012; 132(5):493–505. Russian.
6. Trivedi P, Pandey A, Palni LMS. Bacterial Inoculants for Field Applications under Mountain Ecosystem: Present Initiatives and Future Prospects. In: Maheshwari DK, editors. *Bacteria in Agrobiolgy, Plant Probiotics.* Berlin Heidelberg: Springer; 2012. p. 15–44.
7. Kyrychenko OV. [Microbiological Aspects of the Regulation of Cultivated Plants Productivity and Protection]. Mykolaiv: Ilion; 2018. Russian.

8. Kyrychenko OV. [Phytolectins and Diazotrophs are the Polyfunctional Components of the Complex Biological Compositions]. *Biotechnologia Acta*. 2014; 7(1):40–53. Ukrainian.
9. Kandelinskaya OL, Grischenko ER, Ripinskaya KJu, Aleschenkova ZM, Kartizhova LE, Kuptsov VN, Kuptsov NS. [Role of Lectins in Regulation of Legume-Rhizobium Symbiosis Efficiency in Lupin]. *Botanika (issledovaniya)*. 2015; (44):283–290. Russian.
10. Pavlovskaya NE, Gagarina IN. [The Physiological Properties of Plant Lectins and Prerequisite for Their Application in Biotechnology]. *Khimiya rastitelnogo syriya*. 2017; (1):21–35. Russian.
11. Bürgmann H, Meier S, Bunge M, Widmer F, Zeyer J. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ Microbiol*. 2005; 7(11):1711–1724.
12. Dragovoz IV, Leonova NO, Biliavska LO, Yavorska VK, Iutynska GO. [Phytohormone Production by Some Free-living and Symbiotic Soil Microorganisms]. *Dop NAS Ukr*. 2010; (12):154–159. Ukrainian.
13. Kao CM, Li SH, Chen YL, Chen SS. Utilization of the metano-cyan- complex tetracyanonickelate by *Azotobacter vinelandii*. *Lett Appl Microbiol*. 2005; 41(2):216–220.
14. Antypchuk AF, Pilyashenko-Novokhatniy AI, Evdokimenko TM. [Practicum on Microbiology]. Kyiv: Manual University “Ukraine”, 2011. Ukrainian.
15. Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD. Application of the Acetylene-Ethylene Assay for Measurement of Nitrogen Fixation. *Soil Biol Biochem*. 1973; 5(1):41–83.
16. Krikunova TP. [Photosinteziruyuschaya Aktivnost Soyi v Zavisimosti ot Aktivnosti ee Rizobialnogo Kompleksa]. *Elektronniy resurs: Nauchnie konferencii, nauchnie zhurnaly: sayt URL: http://www.rusnauka.com/18_ADEN_2013/Biologia/9_141693.doc.htm*. Russian.
17. Kizilova AK, Titova LV, Kravchenko IK, Iutinskaya GA. [Evaluation of the Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria in Soybean Rhizosphere by nifH Gene Analysis]. *Microbiology*. 2012; 81(5):621–629. Russian.
18. Morgun VV, Kots SYa. [The Role of Biological Nitrogen in Nitrogen Nutrition of Plants]. *Visnyk NAS Ukraine*. 2018; (1):62–74. Ukrainian.
19. Pat UA № 62820 A, C05F11/08, C12N1/20 [Strain Bacteria of *Azotobacter chroococcum* T79 is for the Receipt of Bacterial Fertilizer under Soybean Plants]. Kots SYa, Tyrova LV, Kyrychenko OV, Omelchuk SV, Zhemoyda AV. Opubl. 15.12.2003, Byul. N 12. Ukrainian.
20. Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. [Microbial producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review]. *Rus J Appl Biochem Microbiol*. 2006; 42(2):117–126. Russian.
21. Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. [Hormones and Hormone-Like Substances of Microorganisms: A Review]. *Rus J Appl Biochem Microbiol*. 2006; 42(3):229–235. Russian.

22. Sytnikov DM, Kots SYa, Malichenko SM, Kiriziy DA. [Photosynthetic Rate and Lectin Activity of Soybean Leaves after Inoculation with Rhizobia Together with Homologous Lectin]. *Rus J Plant Physiology*. 2006; 53(2):169–175. Russian.
23. Kyrychenko OV, Volkogon MV. [Effect of Wheat Germ Agglutinin at the Presowing Treatment of Seeds on the Level of Cytokinins and Auxins in Leaves]. *Dop NAS Ukr*. 2010; (6):144–151. Ukrainian.

Отримано 13.12.2017