УДК 581.1

С. Я. Коць, Д. А. Кірізій, Л. І. Веселовська

Інтенсивність фотосинтезу симбіотичних систем соя — *Bradyrhizobium japonicum* за дії екзогенного лектину

(Представлено академіком НАН України В. В. Моргуном)

Досліджено вплив різних варіантів застосування екзогенного лектину насіння сої на інтенсивність фотосинтезу та зернову продуктивність сої. Відзначено тісну кореляцію зернової продуктивності рослин із інтенсивністю фотосинтезу та азотфіксації. Виявлено стимуляцію інтенсивності фотосинтезу рослин сої при інокуляції ризобіями, попередньо проінкубованими з гомологічним лектином. Висунуто припущення, що отриманий ефект обумовлений сигнальним впливом на ризобії лектину, який підвищує їх нодуляційну активність і пов'язану із цим здатність продукувати фізіологічно активні сполуки.

За сучасними уявленнями лектини відіграють важливу роль у формуванні симбіозу між бобовими рослинами та бульбочковими бактеріями. У складі рослинних ексудатів вони виступають як сигнали для бульбочкових бактерій, що колонізують ризосферу та ризоплану. За їх допомогою відбувається зв'язування ризобій, що сприяє агрегації бактерій у ризосфері рослин і, як наслідок, утворенню бульбочок, у яких відновлюється азот [1, 2].

Дія лектину може бути пов'язана як із посиленням симбіотичних властивостей бульбочкових бактерій, так і з прямим впливом його на ростові процеси рослин [3]. Відомо, що в бактеріальних клітинах лектини здатні посилювати синтез білків (у тому числі й нітрогенази) і продукування індолілоцтової кислоти (ІОК) [4], стимулювати дихання [5], а також впливати на внутрішньоклітинні процеси репарації та реплікації [6]. Наявні в літературі дані свідчать про специфічність і неоднозначність модулюючого впливу лектину на бульбочкові бактерії. Це дає підгрунтя розглядати гомологічний лектин не тільки як рецепторну або сигнальну молекулу на початкових етапах формування симбіозу, але й як молекулярний сигнал, який змінює метаболізм ризобій, що істотно відображається на їх симбіотичних властивостях, а відтак і на фізіологічному стані рослини.

Мета нашого дослідження полягала у з'ясуванні впливу екзогенного гомологічного лектину за умов передпосівної обробки насіння або ризобій на інтенсивність фотосинтезу і продуктивність рослин сої, інокульованої бульбочковими бактеріями.

Матеріали та методи. Об'єктами дослідження були симбіотичні системи, створені за участю рослин сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська та бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* штаму 643б (активний, виробничий штам-стандарт) і штаму 604к (неактивний, проте здатний утворювати бульбочки) із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Перед посівом насіння стерилізували 70%-м розчином етанолу і промивали проточною водою. За контроль брали варіант із інокуляцією насіння ризобіями, без використання лектину. Тривалість інокуляції насіння бактеріальною суспензією (10^8 кл/мл) становила 1 год. Було досліджено два способи використання лектину: обробка насіння та обробка ризобій.

© С. Я. Коць, Д. А. Кірізій, Л. І. Веселовська, 2013

Насіння або ризобії (у відповідних варіантах) перед інокуляцією інкубували з розчином комерційного лектину насіння сої (“Лектинотест”, Львів) у концентрації 100 мкг/мл протягом 20 год (у контрольних варіантах замість лектину використовували воду). Культуру повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на твердому манітно-дріжджовому середовищі протягом 7 діб при 26–28 °С до початку стаціонарної фази росту.

Рослини вирощували у 16-кілограмових посудинах Вагнера в піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту за умов природного освітлення, оптимального (60% ПВ) та недостатнього (30% ПВ) водозабезпечення. Вологість субстрату підтримували гравіметричним методом. Посуху створювали протягом двох тижнів, починаючи з фази трьох справжніх листків, після чого полив відновлювали до 60% ПВ. Усього було досліджено вісім варіантів: 1 — інокуляція насіння штамом 634б без обробки лектином, 60% ПВ; 2 — те саме, 30% ПВ; 3 — те саме зі штамом 604к, 30% ПВ; 4 — інкубація насіння з лектином, а потім інокуляція штамом 634б, 60% ПВ; 5 — те саме, 30% ПВ; 6 — інокуляція насіння ризобіями штаму 634б, попередньо проінкубованими з лектином, 60% ПВ; 7 — те саме, 30% ПВ; 8 — те саме зі штамом 604к, 30% ПВ.

Відбір зразків проводили у фази трьох справжніх листків та цвітіння. Нітрогеназну активність бульбочок визначали ацетиленовим методом [7] на газовому хроматографі “Agilent GC system 6850” (США), нодуляційну активність ризобій — за кількістю бульбочок на коренях рослини. Наприкінці вегетації визначали насіннєву продуктивність рослин сої.

Інтенсивність фотосинтезу визначали у контрольованих умовах за допомогою оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5 М (Росія), включеного за диференціальною схемою. Для вимірювань використовували середню частку невідокремленого від рослини третього зверху листка, яку розміщували в термостатованій камері. Листок освітлювали лампою КГ-2000 через водяний фільтр. Щільність потоку фотосинтетично активної радіації у камері становила 400 Вт/м^2, температура — 25 °С. Через камеру продували повітря із природною концентрацією CO_2 зі швидкістю 1 л/хв. Інтенсивність поглинання CO_2 на світлі вимірювали через 30–40 хв після розміщення листка у камері, при досягненні стаціонарного рівня. Розрахунки проводили за загальноприйнятою методикою [8].

Результати та їх обговорення. Застосована схема проведення дослідів, а саме — використання для інокуляції штамів ризобій, контрастних за активністю, а також вплив стресора у вигляді посухи, дала змогу отримати досить широкий діапазон варіювання показників інтенсивності фотосинтезу листків. Як було показано раніше, ці чинники істотно впливають на активність фотосинтетичного апарату сої [9], яка в першу чергу залежить від забезпеченості рослин азотом, а також від їх водного режиму. Результати наших дослідів підтвердили цю закономірність. Для всього масиву отриманих даних встановлено досить тісний позитивний зв’язок між інтенсивністю азотфіксації та фотосинтезом листків сої як у фазу трьох справжніх листків ($R^2 = 0{,}66$), так і цвітіння ($R^2 = 0{,}82$) (рис. 1, суцільна лінія). Разом із тим детальніший аналіз отриманих залежностей виявив, що через сукупність всіх експериментальних точок можна провести ще дві лінії тренду, показники достовірності апроксимації для яких більші за загальний (див. рис. 1). Розташована нижче від загальної лінія апроксимує точки, що відповідають контрольним варіантам та тим, коли лектином обробляли насіння ($R^2 = 0{,}96$ для обох досліджених фаз розвитку). Розташована вище від загальної лінія апроксимує варіанти, коли з лектином попередньо інкубували ризобії ($R^2 = 0{,}78$ і $R^2 = 0{,}88$ відповідно для фази трьох справжніх листків і цвітіння).

Така диференціація варіантів свідчить про те, що інтенсивність фотосинтезу листків залежала не тільки від нітрогеназної активності бульбочок, але й від способу застосування

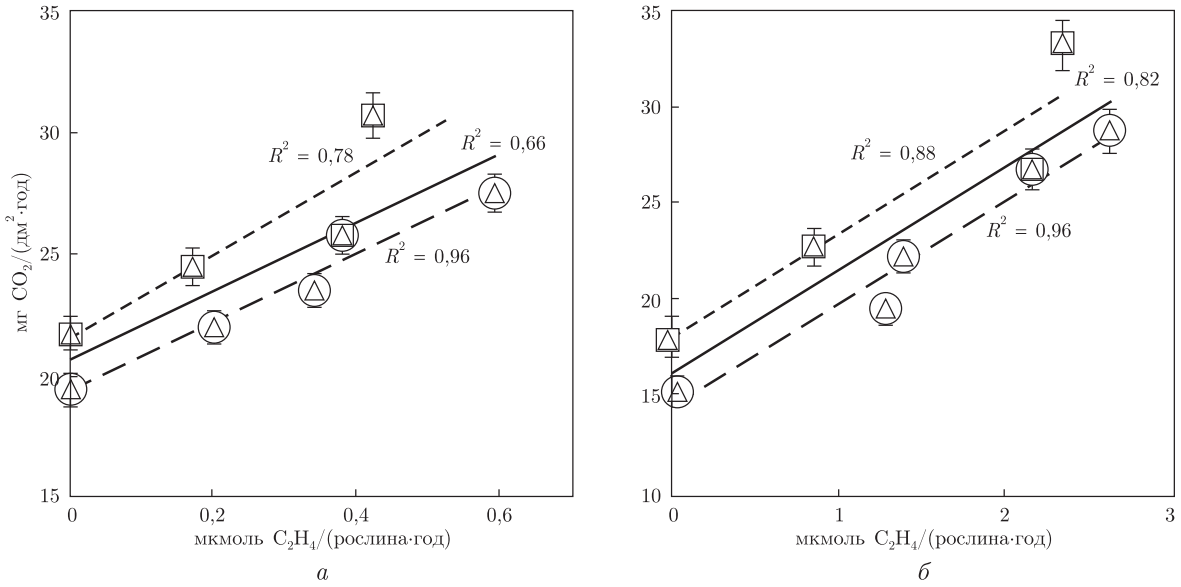

Рис. 1. Залежність між нітрогеназною активністю бульбочок та інтенсивністю фотосинтезу листків сої у фазу трьох справжніх листків (*а*) і цвітіння (*б*). Прямокутниками позначено варіанти з інокуляцією насіння ризобіями, попередньо проінкубованими з лектином

лектину. При цьому попередня інкубація ризобій із лектином чинила додатковий стимулювальний ефект на інтенсивність фотосинтетичної асиміляції CO_2 порівняно з підвищенням власне нітрогеназної активності. Це добре видно з рис. 1: якщо взяти будь-яке фіксоване значення нітрогеназної активності, то відповідна для нього точка перетину з лінією тренду, що апроксимує варіанти з обробкою лектином ризобій, буде знаходитись у середньому на 15% вище, ніж для лінії, що апроксимує варіанти з обробкою лектином насіння. Стимуляція інтенсивності фотосинтезу спостерігалася навіть у варіанті з інокуляцією неактивним штамом, але попередньо проінкубованим із лектином (нульове значення нітрогеназної активності). Тобто природа цього ефекту інша, ніж поліпшення забезпечення фотосинтетичного апарату азотом.

Аналогічний ефект стимуляції інтенсивності фотосинтезу листків рослин сої, інокульованих попередньо проінкубованими з гомологічним лектином ризобіями, порівняно зі звичайною інокуляцією необробленими бактеріями, спостерігався і в дослідах, проведених раніше [9]. Тоді ми пояснили це явище підвищенням нітрогеназної активності (яке дійсно відбувалося в цих варіантах), але зазначили, що ризобії чинять додатковий вплив на фотосинтетичний апарат рослини крім прямого забезпечення його азотом, оскільки інтенсивність фотосинтезу інокульованих рослин на стартовій дозі (0,25 норми) мінерального азоту була вищою, ніж у неінокульованих, що росли за умов повної норми мінерального азоту. Але в тих дослідах не було варіанта із обробкою лектином насіння, що, як виявилося, стимулює нітрогеназну активність ще сильніше, ніж обробка лектином ризобій. До того ж раніше застосована для обробки ризобій концентрація лектину була значно нижчою.

Отже, підвищення інтенсивності фотосинтезу у варіантах обробки лектином ризобій не можна пояснити збільшенням нітрогеназної активності. Очевидно, тут проявляється інший аспект стимулювального впливу ризобій на життєдіяльність рослинного організму. Відомо, що азотфіксувальні бактерії, як вільноіснуючі, так і симбіотрофні, здатні продукувати фі-

зіологічно активні речовини фітогормональної природи, зокрема цитокініни [10, 11]. Останні відіграють важливу роль при становленні симбіотичних взаємовідносин між мікро- та макросимбіонтами. Цитокініни беруть участь у процесі утворення і росту кореневих бульбочок через активацію поділу корових клітин кореня, а також регуляцію експресії низки генів ранньої нодуляції [12]. Показано, що інокуляція насіння сої азотфіксувальними бактеріями супроводжується збільшенням вмісту цитокінінів як у коренях, так і в кореневих бульбочках на початкових етапах формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу [13]. Проте у бульбочках, що вже сформувалися, виявлено негативний зв'язок між вмістом зеатинрибозиду та азотфіксувальною активністю, що й не дивно, оскільки вони вже не потребують стимуляції поділу клітин та експресії Nod-факторів.

Рослинні лектини, як зазначено вище, також відіграють важливу роль у формуванні симбіозу. Вони виступають як сигнальні молекули для бульбочкових бактерій, активують нодуляційні процеси [3]. Результати наших дослідів свідчать про те, що інкубація ризобій із лектином стимулювала їх нодуляційну активність. Так, найбільша кількість бульбочок утворювалася саме у варіанті з попередньою інкубацією ризобій при нормальному водозабезпеченні порівняно з контрольним варіантом та обробкою лектином насіння. Наприклад, у фазу формування бобів середня кількість бульбочок на рослині при інокуляції штамом 634б становила відповідно 67, 56 і 33 шт., при інокуляції штамом 604к — 397 і 244 шт.

Спираючись на ці факти, можна припустити, що інкубація ризобій із лектином стимулювала утворення ними фізіологічно активних речовин із цитокініновою активністю як при формуванні симбіотичного апарату, так і в процесі його подальшого функціонування. Утворені в коренях і бульбочках цитокініни, як це звичайно відбувається у рослині, транспортувалися в надземну частину, в тому числі і до листків. Ну а стимулювальний вплив цитокінінів на фотосинтез добре відомий, зокрема і за стресових умов [14]. Разом із тим нітрогеназна активність симбіотичного апарату при інкубації ризобій із лектином була меншою, ніж при обробці ним насіння, що добре узгоджується із згаданим негативним зв'язком між вмістом цитокінінів та інтенсивністю фіксації атмосферного азоту [13].

Зернова продуктивність рослин тісно корелювала як із нітрогеназною активністю, так і з інтенсивністю фотосинтезу (рис. 2). Найвищим цей показник був у варіанті з інокуляцією насіння ризобіями штаму 634б, попередньо проінкубованими з лектином, при оптимальному водозабезпеченні, найнижчим — у варіантах з інокуляцією неактивним штамом 604к. Слід відзначити, що в останньому випадку, незважаючи на повну відсутність можливості фіксувати атмосферний азот, рослинам вистачило стартової дози мінерального азоту, щоб утворити певну кількість насінин, хоча їх маса була на порядок меншою, ніж при інокуляції активним штамом.

Водночас лінія тренду залежності зернової продуктивності від інтенсивності фотосинтезу перетинає вісь абсцис досить далеко від нульової позначки. Тобто при інтенсивності фотосинтезу, нижчій за певну межу, забезпеченість рослини асимілятами падає настільки, що вона не в змозі утворити насіння. У наших дослідах ця межа становила близько 15 мг $CO_2/(\text{дм}^2 \cdot \text{год})$ у фазу цвітіння, однак насправді асиміляція CO_2 цілою рослиною була ще меншою. За умов нестачі азоту площа асиміляційної поверхні рослини різко скорочується внаслідок прискореного відмирання листків нижніх ярусів, що супроводжується реутилізацією азоту до верхніх, більш молодих листків. Оскільки вимірювання інтенсивності фотосинтезу ми проводили на третьому зверху листку, його забезпеченість азотом була вища за середню, але це не вирішувало проблему нестачі асимілятів для цілої рослини.

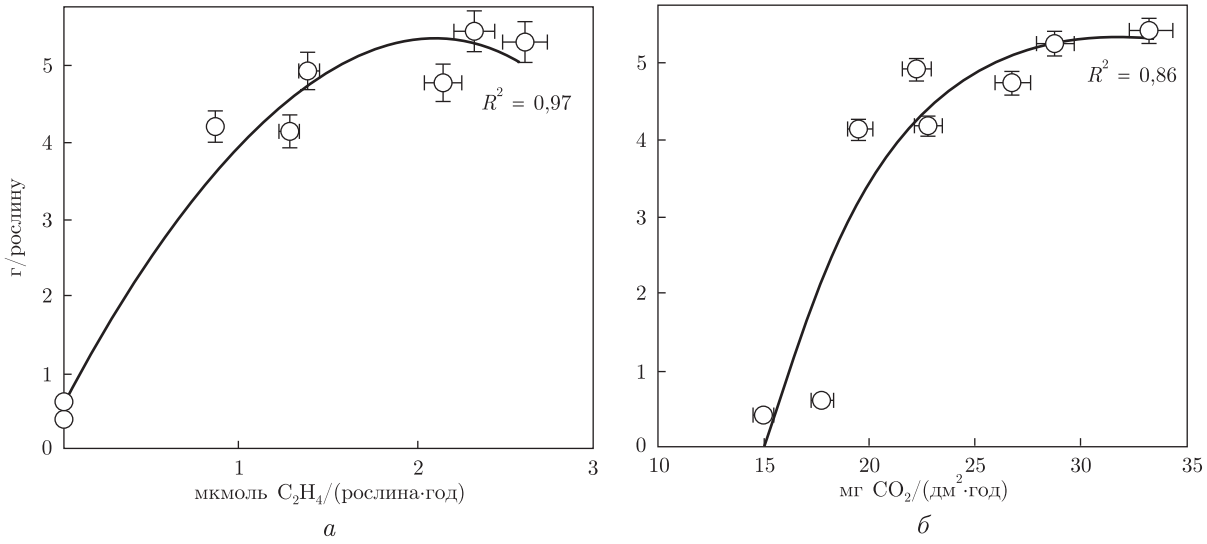

Рис. 2. Зв'язок нітрогеназної активності бульбочок (*а*) та інтенсивності фотосинтезу листків (*б*) із зерновою продуктивністю рослин сої

Таким чином, нами вперше виявлено ефект стимуляції інтенсивності фотосинтезу рослин сої при інокуляції ризобіями, попередньо проінкубованими з гомологічним лектином, порівняно з просто інокуляцією або обробкою лектином насіння. Очевидно цей ефект зумовлений сигнальним впливом лектину на ризобії, який підвищує їх нодуляційну активність і пов'язану із цим здатність продукувати фізіологічно активні сполуки, що стимулюють поділ клітин, зокрема цитокініни. Останні транспортуються до листків і чинять позитивний вплив на функціонування фотосинтетичного апарату.

1. *Мельникова Н. Н., Ковальчук Н. В., Коць С. Я., Мусатенко Л. И.* Влияние лектинов семян сои на формирование и функционирование бобово-ризобиального симбиоза // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – **41**, № 5. – С. 439–446.
2. *Lodeiro A. R., Lopez-Garsia S. L., Vazquez T. E. E., Favelukes G.* Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – **188**. – P. 177–184.
3. *Коць С. Я., Маменко П. М., Маліченко С. М.* Структурні особливості та біологічні функції лектинів бобових // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – **40**, № 2. – С. 111–125.
4. *Антонюк Л. П., Игнатов В. В.* О роли агглютинина зародыша пшеницы в растительно-бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку // Физиология растений. – 2001. – **48**, № 3. – С. 427–433.
5. *Martinez C. R., Albertini A. V. P., Figueiredo M. B. V. et al.* Respiratory stimulus in *Rhizobium* sp. by legume lectins // World J. Microbiol. and Biotechnol. – 2004. – **20**, No 1. – P. 77–83.
6. *Kijne J. W., Bauchrowitz M. A., Diaz C. L.* Root lectins and *Rhizobia* // Plant Physiol. – 1997. – **45**. – P. 868–873.
7. *Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C.* The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – **43**. – P. 185–1207.
8. *Фотосинтез* и биопродуктивность: методы определения / Под ред. А. Т. Мокроносова, А. Г. Ковалева. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 460 с.
9. *Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф. и др.* Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобиальный симбиоз. Т. 2. – Киев: Логос, 2011. – 523 с.
10. *Волкогон В. В., Волкогон М. В., Дімова С. Б.* Рістстимулювальні мікроорганізми / Експериментальна грунтова мікробіологія. – Київ: Аграрна наука, 2010. – С. 383–416.

11. *Boiero L., Perrig D., Masciarelli O. et al.* Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – **74**, No 4. – P. 874–880.
12. *Bauer P., Ratet P., Crespi M. D. et al.* Nod-factors and cytokinins induce similar cortical cell divisions, amiloplast deposition and MsENOD12A expression patterns in alfalfa roots // Plant J. – 1996. – **10**. – P. 91–105.
13. *Грищук О. О., Коць С. Я., Волкогон М. В.* Динаміка вмісту фітогормонів цитокінінової природи у коренях і бульбочках сої на ранніх етапах формування бобово-ризобіального симбіозу // Физиология и биохимия культ. растений. – 2013. – **45**, № 1. – С. 20–28.
14. *Кулаева О. Н., Кузнецов В. В.* Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиология растений. – 2002. – **49**, № 4. – С. 626–640.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

Надійшло до редакції 26.04.2013

С. Я. Коць, Д. А. Киризий, Л. И. Веселовская

Интенсивность фотосинтеза симбиотических систем соя — *Bradyrhizobium japonicum* при действии экзогенного лектина

Исследовано влияние различных вариантов применения экзогенного лектина семян сои на интенсивность фотосинтеза и зерновую продуктивность сои. Отмечена тесная корреляция зерновой продуктивности растений с интенсивностью фотосинтеза и азотфиксации. Обнаружена стимуляция интенсивности фотосинтеза растений сои при инокуляции ризобиями, предварительно проинкубированными с гомологическим лектином. Выдвинуто предположение, что полученный эффект обусловлен сигнальным воздействием на ризобии лектина, который повышает их нодуляционную активность и связанную с этим способность продуцировать физиологически активные соединения.

S. Ya. Kots, D. A. Kiriziy, L. I. Veselovska

The intensity of photosynthesis of the soybean — *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic systems under exogenous lectin influence

The influence of different ways of exogenous soybean seed lectin application on the intensity of photosynthesis and the grain productivity of soybean is investigated. The close correlation of the grain productivity of plants with the intensity of photosynthesis and nitrogen fixation is found. It is shown that the inoculation of soybean plants by rhizobia incubated with homologous lectin leads to an increase of the photosynthesis intensity. These results allow suggesting that the given effect is due to the signal influence of lectin on rhizobia, which increases their nodulation activity and the production of physiologically active compounds.