

**ЛЕКТИНОВА АКТИВНІСТЬ У РІЗНИХ ОРГАНАХ  
ЛЮЦЕРНИ ПРИ ФОРМУВАННІ СИМБІОЗУ  
ІЗ *SINORHIZOBIUM MELILOTI* ЗА РІЗНОГО  
ВОДОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ**

**Михалків Л.М.**

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,  
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ, 03022, Україна  
e-mail: mykhalkiv@mail.ru

*Досліджено вплив недостатнього водозабезпечення на лектинову активність у різних органах люцерни, інокульованої штамами *Sinorhizobium meliloti* 441 (активний) та СХМ1-48 (неактивний), на початкових етапах формування симбіозу та у період його активного функціонування. Показано залежність змін лектинової активності у рослинах люцерни, які відбуваються під впливом різного водозабезпечення, від властивостей штаму-інокулянта, ступеня розвитку рослин та сформованості симбіозу.*

Ключові слова: *лектинова активність, люцерна, *Sinorhizobium meliloti*, водозабезпечення.*

Впровадження у сучасну аграрну практику наукових розробок з питань біологічної азотфіксації дозволяє зменшити витрати енергії та сировини на виробництво мінеральних азотних добрив і дає змогу отримати екологічно чисту продукцію. При залученні азотфіксуючих рослинно-мікробних систем в агроценози слід враховувати вплив екологічних факторів на їх формування, функціонування і продуктивність. Тому важливим питанням залишається дослідження механізмів стійкості симбіотичних систем до зовнішніх стресів та пошук шляхів їх адаптації до несприятливих умов довкілля. У цьому аспекті недостатньо вивченими, але перспективними, є лектини рослин.

Зовнішні фактори абіотичної природи (посуха, засолення, температурні коливання, дія важких металів та ін.) можуть спричиняти посилення експресії генів, відповідальних за синтез лектинів, підвищення вмісту цих білків у рослинах та зміни їхніх

властивостей [1–4]. Очевидно, накопичення лектинів є загальною відповіддю рослин на різні види стресу, однак залишаються нез'ясованими шляхи їх залучення у процеси адаптації. У результаті досліджень О. Тимофєєвої з співавт. [5] було представлено докази участі лектинів клітинної стінки у неспецифічних механізмах захисту рослин, показано, що початковим етапом формування неспецифічної захисної відповіді рослин є швидка зміна активності та складу лектинів клітинної стінки, яка залежить від функціонування кальцієвої сигнальної системи і може бути пов'язана з участю лектинів у проведенні сигналу в клітину або ж у апопластному просторі. Виявлено прямий зв'язок між активністю лектину клітинної стінки і ступенем стійкості рослин пшениці озимої до стресорів біотичної та абіотичної природи, а також генетично детермінована і органоспецифічна залежність між рівнем активності лектинів клітини і структурним станом цитоскелету. Запропоновано схему участі  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальної системи і цитоскелетних структур у механізмі регуляції активності лектинів при формуванні адаптивних реакцій рослин. Цікавими є дані про можливі механізми кріопротекторного ефекту галактозоспецифічних лектинів на ізольовані тилакоїдні мембрани хлоропластів [6]. Завдяки відносній гідрофобності ці лектини можуть зв'язуватися з гліколіпідами мембран і т.ч. сприяти зміцненню мембранних тилакоїдних структур і зниженню їх текучості, викликаній пошкодженнями при проморожуванні. Також показано [7], що індукція неспецифічної стійкості бобових культур може забезпечуватися регуляцією стадії захисного гальмування у загальному адаптаційному синдромі за рахунок активації білків–інгібіторів протеїназ і білків лектинового типу, що приводить до зниження токсичної дії стресорів на азотфіксувальну систему і продуктивність рослин. Розглядається можливість дії розчинних лектинів як елісаторів [8], припускається участь лектинів у регуляції експресії генів у рослинах, які зазнали стресу, за рахунок модулювання O-GlcNAc–заліжних сигналів трансдукції шляхом специфічних білок–вуглеводних взаємодій з регуляторними цитоплазматичними і ядерними глікопротеїнами [9].

Зважаючи на роль лектинів як важливого фактора ефектив-

ного симбіозу [10], а також як компонента неспецифічної реакції рослин на дію стресових чинників [11], метою представлених досліджень було визначення лектинової активності в рослинах люцерни на фоні інокуляції ризобіями різної активності за оптимального та недостатнього водозабезпечення.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили у вегетаційних умовах на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини люцерни сорту Надєжда вирощували у піщаній культурі (10 рослин/посудину) у 4-кілограмових посудинах Вагнера (на промитому річковому піску вологістю 60 % ПВ) за природних освітлення, температури та вологості повітря. Джерелом мінерального живлення була суміш Гельрігеля, що містила 0,25 норми азоту з додаванням мікроелементів В, Мо і Fe. Перед посівом насіння стерилізували концентрованою сірчаною кислотою, промивали у проточній водопровідній воді та інокулювали бульбочковими бактеріями *Sinorhizobium meliloti* штамів 441 (активний) і СХМ1-48 (неактивний). Культуру мікроорганізмів вирощували на твердому манітно-дріжджовому середовищі при температурі 28 °С упродовж 4 діб. Тривалість інокуляції насіння – 1 година, титр інокуляційної суспензії –  $10^9$  кл/мл.

У віці 7 (*дослід 1*, поява трійчастого листка) чи 20 (*дослід 2*, стеблуння) діб для рослин відповідних варіантів створювали режим посухи (30 % ПВ) за допомогою контрольованого поливу. Відбір зразків для аналізу проводили: у *досліді 1* – через 3 та 10 діб після впливу посухи, а у *досліді 2* – через 3, 7 та 11 діб посухи.

Азотфіксувальну активність корневих бульбочок визначали ацетиленовим методом [12]. Газову суміш аналізували на хроматографі «Agilent 6850». Визначення проводили у 5-кратній біологічній повторності. Масу надземної частини рослин (г сухої речовини/рослину) вимірювали в 10–15-кратній біологічній повторності.

Для виділення фітогемаглютининів (лектинів) із коренів, стебел і листків рослин використовували метод елюювання етанолом [13], дещо модифікувавши його. Рослинний матеріал подрібнювали та розтирали у фарфоровій ступці з додаванням 0,5 М фосфатного буфера (рН 5,0), який використовували як екстрагуючий розчин.

Екстрагування проводили упродовж 20 годин у прохолодному темному місці. Після цього суміш центрифугували при 3000 об./хв протягом 10 хв. Надосадову рідину зливали і додавали до неї 96 %-ний етиловий спирт так, щоб вміст спирту в утвореній суміші становив 76 %. Одержаний розчин центрифугували при 6000 об./хв протягом 15 хв. Супернатант зливали, а утворений осад білка розчиняли в фізіологічному розчині. Визначення лектинової активності в отриманому розчині білка проводили за допомогою реакції гемаглютинації в імунологічних планшетах із U-подібними лунками [14]. Після інкубації зразків із розчином еритроцитів крові людини I групи протягом 2 годин при кімнатній температурі визначали активність лектину. Вона відповідала його найбільшому розведенню, при якому ще спостерігалася гемаглютинація.

Результати усіх дослідів обраховували статистично за загальноприйнятою методикою [15], на рисунку представлені середні арифметичні та їх стандартні похибки.

**Результати та обговорення.** На третю добу вирощування в умовах різного водозабезпечення (10-добові рослини) бульбочки на коренях люцерни не візуалізувалися, не було виявлено також фіксації молекулярного азоту, хоча, як відомо [16], у цей період вже активно відбуваються внутрішні зміни у структурі кореня та функціонуванні рослин, спричинені інфікуванням бактеріями. Нами відмічено гальмування осідання еритроцитів за недостатнього водозабезпечення при дослідженні лектинової активності в рослинах люцерни, інокульованої активним штамом 441, тоді як на фоні застосування неактивного штаму мікроорганізмів змін лектинової активності не спостерігали. В умовах оптимального водозабезпечення також не було виявлено різниці за даним показником між рослинами, інокульованими різними штамми (441 та СХМ1-48).

Через 10 діб вирощування рослин за різного водозабезпечення на коренях люцерни у варіантах з 60 % ПВ відмічено сформовані бульбочки, при цьому за інокуляції *S. meliloti* 441 на окремих рослинах вони мали гронаподібну форму. Зазначимо, що штам *S. meliloti* СХМ1-48 формував на коренях рослин приблизно в 2–2,5 рази більше бульбочок, ніж штам 441.

При дослідженні активності азотфіксації виявлено незначні етиленові піки у варіанті з інокуляцією *S. meliloti* 441 на фоні оптимального водозабезпечення. У цей період спостерігали суттєве зниження сухої маси рослин внаслідок дії посухи, але між рослинами, інокульованими різними штамми, на фоні однакового водозабезпечення суттєвої різниці не виявлено (рис.).

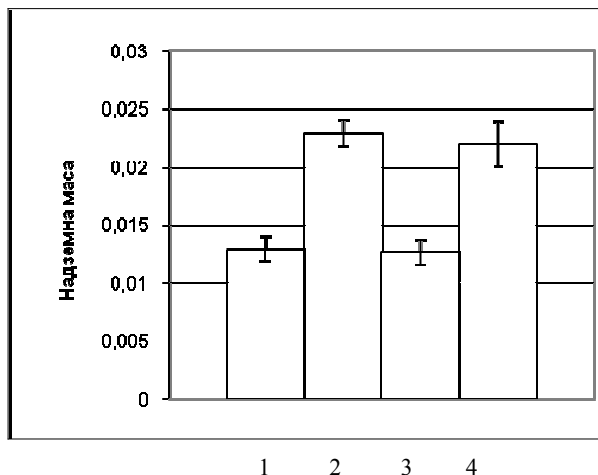


Рис. Надземна маса (г сухої речовини/рослину) 17-добових рослин люцерни, інокульованих різними штамми *Sinorhizobium meliloti* на фоні оптимального та недостатнього (10-добова посуха) водозабезпечення (дослід 1): 1 – інокуляція *S. meliloti* CXM1-48, 30 % ПВ; 2 – інокуляція *S. meliloti* CXM1-48, 60 % ПВ; 3 – інокуляція *S. meliloti* 441, 30 % ПВ; 4 – інокуляція *S. meliloti* 441, 60 % ПВ.

Результати визначення лектинової активності у коренях і надземній частині рослин у цей період представлені у табл. 1.

Виявлено, що у коренях рослин на даний показник не вплинули ні різні рівні забезпечення вологою, ні азотфіксувальна активність симбіозу. Водночас у надземній масі спостерігали збільшення лектинової активності на фоні інокуляції штамом CXM1-48 за обох рівнів водозабезпечення у порівнянні з інокуляцією штамом 441.

**Таблиця 1. Лектинова активність (ОА/50 мкл) у 17-добових рослинах люцерни за різного водозабезпечення (10-добова посуха) та інокуляції *Sinorhizobium meliloti* (дослід 1)**

Варіанти досліджу	Корінь	Надземна частина
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 30 % ПВ	2	4
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 60 % ПВ	2	4
<i>S. meliloti</i> 441, 30 % ПВ	2	2
<i>S. meliloti</i> 441, 60 % ПВ	2	2

Зважаючи на те, що лектинова активність прямо пов'язана з азотфіксувальною активністю [17], слід було б очікувати протилежного ефекту від інокуляції даними штамми. Очевидно, в даному випадку визначальним виявився вплив якогось іншого фактора, наприклад, нодуляційної активності штаму, яка у *S. meliloti* СХМ1-48 є вищою, ніж у *S. meliloti* 441, а також особливості культури чи фізіологічної специфіки раннього етапу симбіозу.

При дослідженні впливу нестачі вологи на лектинову активність у рослинах люцерни на пізніших етапах розвитку (початок посухи – фаза стеблуння, 20-добові рослини) було виявлено (табл. 2) зниження лектинової активності у листках рослин на 3, 7 та 11 добу посухи на фоні інокуляції неактивним штамом СХМ1-48. На фоні інокуляції штамом 441 через 3 доби дії посухи лектинова активність збільшилась у листках рослин за недостатнього водозабезпечення у порівнянні з 60 % ПВ, а через 11 діб – навпаки, знизилась.

У коренях рослин виявлено зростання лектинової активності за нестачі вологи незалежно від інокулянта.

У стеблах рослин вплив 3-добової нестачі вологи проявився на фоні інокуляції обома штамми – відмічено зростання лектинової активності у 2 рази. Через 7 діб впливу посухи виявлено, що у рослин, інокульованих неактивним штамом, лектинова активність у стеблах більша, незалежно від водозабезпечення. А вже через 11 діб відмінностей між усіма досліджуваними варіантами не спостерігали. Таким чином, було відзначено, що лектинова активність у листках і стеблах рослин у результаті дії

посухи змінюється по-різному в залежності від штаму–інокулянта.

**Таблиця 2. Лектинова активність (ОА/50 мкл) у різних органах люцерни за різного водозабезпечення та інокуляції *Sinorhizobium meliloti* (дослід 2)**

Варіанти дослідів	Фаза розвитку рослин		
	стеблування, 3 доба посухи	стеблування, 7 доба посухи	початок бутонізації, 11 доба посухи
<i>листки</i>			
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 30 % ПВ	8	2	2
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 60 % ПВ	16	4	4
<i>S. meliloti</i> 441, 30 % ПВ	16	2	2
<i>S. meliloti</i> 441, 60 % ПВ	8	2	4
<i>корені</i>			
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 30 % ПВ	2	4	2
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 60 % ПВ	2	2	0
<i>S. meliloti</i> 441, 30 % ПВ	2	4	2
<i>S. meliloti</i> 441, 60 % ПВ	2	2	0
<i>стебла</i>			
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 30 % ПВ	2	2	2
<i>S. meliloti</i> СХМ1-48, 60 % ПВ	0	2	2
<i>S. meliloti</i> 441, 30 % ПВ	2	0	2
<i>S. meliloti</i> 441, 60 % ПВ	0	0	2

Отже, у результаті проведених досліджень виявлено, що під впливом різного водозабезпечення у різних органах люцерни відбуваються зміни лектинової активності, які залежать від властивостей штаму–інокулянта, ступеня розвитку рослин та сформованості симбіозу.

У початковий період формування симбіозу (10-добові рослини) за недостатнього водозабезпечення зростає лектинова активність у рослинах люцерни на фоні інокуляції активним штамом 441, тоді як при використанні неактивного штаму СХМ1-48 вона залишається незмінною. З появою азотфіксувальної активності (17-добові рослини) лектинова активність у надземній масі люцерни, інокульованої неактивним штамом, вища, ніж за використання

активних ризобій, у коренях вона залишається незмінною. При цьому не виявлено відмінностей між даними показниками у варіантах із різним водозабезпеченням.

Внаслідок впливу недостатнього водозабезпечення на сформований симбіоз (стеблуння – початок бутонізації) зміни лектинової активності у листках та стеблах рослин люцерни визначаються активністю штаму–інокулянта, тоді як у коренях вони аналогічні при використанні обох штамів.

1. Комарова Э.Н. Изменение лектиновой активности меристемы узла кушения озимой пшеницы при закаливании к морозу /Комарова Э.Н., Выскребенцева Э.И., Трунова Т.И. //Физиол. раст. – 1995. – Т. 42, № 4. – С. 612–615.

2. Шакирова Ф.М. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений /Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. //Журн. общей биол. – 2007. – Т. 68, № 2. – С. 109–125.

3. Bezverkhova N.V. Involvement of the bacterium *Azospirillum brasilense* in wheat tolerance to cadmium /Bezverkhova N.V., Satronova V.I., Antonyuk L.P., Belimov A.A. //Metal ions in biol. and med. – 2002. – Vol. 7. – P. 268–271.

4. Wang X.-M. Characterization of a jasmonate-regulated wheat protein related to a beta-glucosidase-aggregating factor /Wang X.-M., Ma Q.-H. //Plant Physiol. Biochem. – 2005. – Vol. 43. – P. 185–192.

5. Тимофеева О.А. Лектины клеточной стенки в адаптивных реакциях озимой пшеницы /Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю., Мифтахова И.Г. [и др.] //Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (Москва, 9–12 ноября 2010 г.): тез. докл. – М., 2010. – С. 359–360.

6. Hinch D.K. Galactose-specific lectins protect isolated thylakoids against freeze-thaw damage /Hinch D.K., Bakaltcheva I., Schmitt J.M. //Plant Physiol. – 1993. – Vol. 103. – P. 59–63.

7. Канделинская О.Л. О некоторых аспектах неспецифической устойчивости бобовых культур к неблагоприятным факторам среды /Канделинская О.Л., Грищенко Е.Р., Домаш В.И. [и др.] //Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (Москва, 9–12 ноября 2010 г.): тез. докл. – М., 2010. – С. 174–175.

8. Toyoda K. Plant lectins induce the production of a phytoalexin in *Pisum sativum* /Toyoda K., Miki K., Ichinose Y. //Plant Cell Physiol. – 1995. – Vol. 36. – P. 799–807.



9. Chen Y. Jasmonate methylester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chitoooligosaccharide-binding lectin in tobacco leaves /Chen Y., Peumans W.J., Hause B. [et al] //FASEB J. Express Article. – 2002. – DOI:10.1096/fj.01-0598fje. <http://www.fasebj.org/cgi/reprint/01-0598fjev1>

10. Коць С.Я. Лектины бобовых растений как фактор эффективности симбиоза /Коць С.Я., Сытников Д.М. //Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 6. – С. 463–475.

11. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция /Ф.М. Шакирова. – Уфа : Изд-во «Гилем», 2001. – 160 с.

12. Hardy R.W.F. The acetylene – ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation /Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. //Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, N 8. – P. 1185–1207.

13. Маличенко С.М. Выделение лектинов из семян и корней люпина (*Lupinus luteus* L.) и изучение их свойств /Маличенко С.М., Назаренко Н.И. Кириченко Е.В., Заец В.Н. //Физиол. и биохим. культ. раст. – 1994. – Т. 26, № 3. – С. 252–256.

14. Методы исследования углеводной специфичности лектинов /[М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, В.А. Антонюк и др.]. – Львов: Атлас, 1983. – 24 с.

15. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов. – М. : Агропромиздат, 1985. – 352 с.

16. Soto M.J. First indications for the involvement of strigolactones on nodule formation in alfalfa (*Medicago sativa*) /Soto M.J., Fernández-Aparicio M., Castellanos-Morales V. [et al] //Soil Biol. and Biochem. – 2010. – Vol. 42. – P. 383–385.

17. Маменко П.М. Лектины бобових і їх фізіологічна роль у формуванні і функціонуванні симбіозу. Автореф. ... канд. біол. наук зі спец-ті 03.00.12 – фізіологія рослин. – К., 2005. – 21 с.

## **ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ ЛЮЦЕРНЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СИМБИОЗА С *SINORHIZOBIUM MELILOTI* ПРИ РАЗНОМ ВОДООБЕСПЕЧЕНИИ**

**Михалкив Л.М.**

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

*Исследовано влияние недостаточного водообеспечения на лектиновую активность в разных органах люцерны, инокулированной штаммами *Sinorhizobium meliloti* 441 (активный) и СХМ1-48 (неактивный), на начальных этапах формирования симбиоза и в период его активного функционирования. Показана зависимость изменений лектиновой активности в растениях люцерны, которые происходят под влиянием разного водообеспечения, от свойств штамма-инокулянта, степени развития растений и сформированности симбиоза.*

Ключевые слова: лектиновая активность, люцерна, *Sinorhizobium meliloti*, водообеспечение.

## **LECTIN ACTIVITY IN PLANT ORGANS AT SYMBIOSIS FORMATION OF ALFALFA WITH *SINORHIZOBIUM MELILOTI* UNDER DIFFERENT WATER CONDITIONS**

**Mykhalkiv L.M.**

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv

*The paper covers study of insufficient water supply effect on lectin activity in different organs of alfalfa plants inoculated with *Sinorhizobium meliloti* 441 (active strain) and SHM1-48 (inactive strain) during the early stages of symbiosis formation and its active functioning. The correlations between the changes of lectin activity in alfalfa plants influenced by different water supply and strain characteristics, extent of plant development and stage of symbiosis formation.*

Keywords: lectin activity, alfalfa, *Sinorhizobium meliloti*, water supply.