

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА СОИ НА МЕТАБОЛИЗМ И СИМБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *Bradyrhizobium japonicum*

Д. М. Сытников¹Е. Д. Кругова¹Н. М. Мандровская²¹Институт ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: sytnikov@list.ru

Получено 02.09.2011

В условиях лабораторных и вегетационных опытов изучено влияние лектина из семян сои (SBA) на рост, метаболизм и проявление симбиотических свойств различающихся по активности штаммов (6346, 646, 21110, 604к) клубеньковых бактерий сои (*Bradyrhizobium japonicum*). Показано, что предварительная инкубация ризобий с лектином растения-хозяина стимулирует их размножение и повышает активность пероксидазы независимо от потенциальной симбиотической активности штамма. При этом лектин сои вызывает появление новых протеннов в бактериальной клетке активного штамма ризобий 646. Установлено, что в условиях симбиоза «соя — клубеньковые бактерии» специфический растительный лектин способен стимулировать или ингибировать клубенькообразование и азотфиксацию у штаммов с различной активностью. Таким образом, воздействуя на метаболизм и характер проявления симбиотических свойств ризобий, гомологичный лектин оказывает разнонаправленное действие на генетически детерминированный симбиотический потенциал микросимбионта.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, лектин сои, соево-ризобиальный симбиоз, нитро-геназная активность, антиоксидантные ферменты.

Лектины растений обладают широкой биологической активностью и способны оказывать разнонаправленное действие на ход различных физиологических процессов [1]. В растительно-микробных ассоциациях и бобово-ризобиальном симбиозе лектины растения-хозяина играют роль молекулярных сигналов межорганизменного взаимодействия [2–4]. Для *Azospirillum brasilense*, например, агглютинин зародышей пшеницы (АЗП) служит сигналом, изменяющим метаболизм бактерии в направлении, благоприятном для роста и развития растения-хозяина. При этом установлено, что АЗП усиливает продукцию индолилуксусной кислоты — ИУК, азотфиксацию и экскрецию аммония, стимулирует биосинтетические процессы и увеличение размеров бактерии [5, 6]. Уровень АЗП в растении зависит от ряда условий и является фактором, ответственным за вариабельность результатов инокуляции пшеницы [7]. Фитолектины рассматривают также в качестве одного из важных факторов, контролирующих формирование и определяющих эффективность бобово-ризобиального симбиоза, в связи с чем предложено

использовать их при разработке и внедрении новых подходов к управлению продукционным процессом у бобовых растений [8]. Так, лектин гороха способен влиять на метаболизм микросимбионта гороха — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 250a, изменяя активность его ростовых процессов и связанный с ними биосинтез внеклеточных углеводов [9]. Однако накопленный материал не дает нам исчерпывающего ответа на вопрос о биохимических механизмах действия лектина на клубеньковые бактерии и об индуцируемых изменениях в их метаболизме, которые, очевидно, и обуславливают эффективность дальнейшего симбиотического взаимодействия ризобий с растением-хозяином.

Антиоксидантная система клетки участвует в поддержании ее гомеостаза, обеспечиваемого балансом сложных метаболических превращений, протекающих в различных оргanelлах. Координация этих процессов может быть нарушена под влиянием внешних воздействий, в том числе стрессов, что сопровождается повышением уровня активных форм кислорода [10]. В последние годы в литературе активно обсуждается вопрос

о возможности участия антиоксидантных энзимов в регуляторных процессах, в частности в передаче сигналов, обеспечивающих формирование ответа клетки на действие биотических и абиотических факторов [11, 12].

Изменение активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7) и каталазы (КФ 1.11.1.6) свидетельствует об активизации в клетке ряда биохимических реакций, связанных с окислением пероксидом водорода различных органических соединений [10, 13]. Антиоксидантные энзимы широко распространены среди бактерий, при этом особенности их функционирования у клубеньковых бактерий изучены недостаточно [13–15]. Поскольку антиоксидантная система одной из первых реагирует на изменения условий внешней среды, изменение активности пероксидазы и каталазы клубеньковых бактерий может характеризовать уровень метаболических реакций ризобий под влиянием лектина растения-хозяина.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния лектина сои на рост и метаболизм (активность антиоксидантных энзимов, биосинтез протеинов) клубеньковых бактерий сои различной активности в чистой культуре, а также проявление их симбиотических свойств (вирулентность, нитрогеназная активность) при функционировании симбиоза.

Материалы и методы

Бактерии и условия их культивирования. В работе использовали клубеньковые бактерии сои *Bradyrhizobium japonicum* из музейной коллекции азотфиксирующих микроорганизмов Института физиологии растений и генетики НАН Украины: активный штамм 646, производственный штамм 6346 (штамм-стандарт), а также неактивный штамм 604к [16]. Малоактивный штамм *B. japonicum* 21110 был предоставлен сотрудниками Института микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины. После хранения в условиях музея при температуре 4 °С физиологическую активность бактерий восстанавливали в реактационной среде. Культуру клубеньковых бактерий выращивали на маннитно-дрожжевом агаре (МДА) [17] при 28 °С в течение 7–8 сут. Затем массу клеток смывали физиологическим раствором (0,9% NaCl), переносили в жидкую маннитно-дрожжевую среду [17] или среду CS7 [18] и выдерживали при постоянной аэрации и 28 °С на качалке (220 об/мин) до 7 сут.

Жизнеспособность и количественную оценку интенсивности роста (размножения) клубеньковых бактерий проводили по общепринятым методам — серийным предельным разведениям и подсчета колоний. Используемые методы [19] отражают число живых клеток, способных развиваться в определенных условиях. Подсчет колоний, образовавшихся на чашках Петри с МДА (трехкратная повторность), производили на 7-й день инкубирования в термостате при температуре 28 °С.

Лектин. Гомологичный клубеньковым бактериям лектин из семян сои (SBA) был приобретен в НИК «Лектиноест» (Львов, Украина). Суспензии исследуемых штаммов клубеньковых бактерий инкубировали в термостате в течение 24 ч с водными растворами лектина в соотношении 1 : 1 при температуре 28 °С. Конечная концентрация использованного протеина в бактериальной суспензии составляла 0 (контроль), 2 или 20 мкг/мл.

Активность антиоксидантных энзимов определяли в клетках ризобий, осажденных из бактериальной суспензии ($1 \cdot 10^8$ клеток/мл). Для этого 200 мл жидкой культуры клубеньковых бактерий центрифугировали на центрифуге ОПН-8 (Россия) при 7 000 об/мин в течение 30 мин, надосадочную жидкость сливали, после чего клетки ризобий суспендировали в калийфосфатном буфере (pH 7,4) и повторно центрифугировали в течение 20 мин. Осадок, содержащий клетки ризобий, разрушали в 4 цикла (40 с, перерыв 20 с) ультразвуком на приборе УЗДН-1 (Россия) при 4 °С. Разрушенные бактериальные клетки суспендировали в 5 мл калий-фосфатного буфера и повторно центрифугировали при 7 000 об/мин в течение 30 мин. Активность энзимов определяли в надосадочной жидкости.

Для определения активности каталазы [20] использовали 5 мл надосадочной жидкости, к которой добавляли 5 мл 0,1 и раствора H_2O_2 . Для разрушения каталазой пероксида водорода полученную смесь инкубировали 5 мин, после чего реакцию ингибировали внесением в реакционную смесь 5 мл водного раствора серной кислоты в объеме соотношении $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 9$. В контрольном варианте опыта с целью полного ингибирования разложения пероксида водорода к надосадочной жидкости, полученной после разрушения и центрифугирования бактериальных клеток, перед определением активности энзима вносили этот же раствор серной кислоты. Количество H_2O_2 в реакционной среде определяли йодомет-

рическим методом. Для этого после остановки реакции в среду вносили 25%-й раствор йодистого калия и несколько капель 10%-го раствора молибдата аммония. Выделившийся йод вследствие взаимодействия H_2O_2 с KJ титровали 0,2%-м раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала. Активность энзима выражали в микромолях H_2O_2 за 1 мин на 1 г белка клеток ризобий, содержащихся в 1 мл бактериальной суспензии.

Пероксидазную активность определяли с гваяколом по Починку [20] в модификациях [21]. К 1 мл надосадочной жидкости, полученной после разрушения бактериальных клеток, добавляли 60 мкмоль H_2O_2 и 7 мкмоль гваякола (Sigma, США). Смесь инкубировали при 20 °С. Интенсивность появившейся окраски измеряли через 15 мин на спектрофотометре Smart Spec Plus (Biorad, США) при 440 нм. Калибровочную кривую строили на основании результатов каталитического действия стандартного раствора азотнокислого серебра (1 мл раствора содержал 0,5 мг серебра) при окислении 0,3%-го раствора гваякола в присутствии 3%-го раствора персульфата аммония. Активность пероксидазы выражали в микромолях окисленного гваякола за 1 мин на 1 г белка клеток ризобий, содержащихся в 1 мл бактериальной суспензии, с учетом молярного коэффициента экстинкции — 2,53 (значение, соответствующее количеству гваякола, окисленного за 15 мин в присутствии 1 мг нитрата серебра при 20 °С).

Выделение протеина из бактерий. Для освобождения клеток ризобий от слизи перед выделением протеина [22] суспензию бактерий ($3 \cdot 10^8$ клеток/мл) помещали на микроразмельчитель тканей РТ-2 (Одесский завод медтехники, СССР) на 10 мин при 3 000 об/мин, после чего центрифугировали в течение 10 мин на центрифуге К-24 (Zentrifugenbau, ГДР) при 15 000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, бактерии суспендировали в буфере, содержащем 20 мМ трис- HCl (рН 7,0–7,5), 5 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), затем снова помещали на размельчитель тканей и повторно центрифугировали. Осадок суспендировали в буфере, содержащем 20 мМ трис- HCl (рН 7,5), 5 мМ ЭДТА, 0,2 М сахарозу и центрифугировали в течение 5 мин на центрифуге Mini Spin (Eppendorf AG, ФРГ) при 13 000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, процедуру повторяли дважды.

Для выделения протеина осажденные бактериальные клетки суспендировали в экстракционном буфере [23, 24], содержащем 75 мМ трис- HCl , рН 8,0, 10 мМ ЭДТА,

1 мМ ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид), ДДСН (додецилсульфат натрия) и 0,3%-й 2-меркаптоэтанол, после чего центрифугировали в течение 5 мин на центрифуге Mini Spin при 13 000 об/мин. К осадку добавляли ацетон с трихлоруксусной кислотой и инкубировали 2 ч при –18 °С. После повторного центрифугирования к осадку протеина дважды добавляли ацетон с последующим центрифугированием. Количество протеина, выделенного из бактериальных клеток, определяли по методу Бредфорда [25].

Электрофорез. Протеины, выделенные из ризобий, окрашивали в буфере с бромфеноловым синим, 2-меркаптоэтанолом и глицеролом. ДДСН–ПААГ электрофорез протеинов производили в градиентном (10–20%) полиакриламидном геле по стандартной методике Лаemmli [26]. Образцы наносили из расчета 40 мкл на трек. Использовали вертикальные пластинки размером 150×150×3 мм. В концентрирующем геле применяли ток силой 25 мА, в разделяющем — 80 мА.

Симбиотические системы создавали при участии клубеньковых бактерий и растений сои *Glycine max* (L.) Merr., сорта Марьяна. Исследования проводили в условиях модельных опытов на вегетационной площадке ИФРГ при влажности субстрата 60% и естественном освещении (фото 1). В опытах использовали сосуды Вагнера, которые предварительно стерилизовали 20%-м раствором H_2O_2 . В качестве субстрата использовали промытый речной песок с добавлением питательной минеральной смеси по Гельригелю, содержащей «стартовое» количество азота — 0,25 нормы (1 норма соответствует 708 мг $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ на 1 кг песка). Перед высевом семена стерилизовали 70%-м этанолом в течение 15 мин, а затем многократно промывали стерильной водой, после чего инокулировали подготовленными суспензиями исследуемых штаммов ризобий ($3 \cdot 10^8$ кл/мл), содержащими лектин в концентрации 20 мкг/мл. Контролем служили растения, инокулированные бактериальными суспензиями без добавления протеина. Растения (10-кратная повторность) для определения показателей эффективности симбиоза отбирали в фазе начала цветения.

Активность нитрогеназы (КФ 1.7.99.2) определяли по уровню ацетиленовосстанавливающей активности клубеньков, образовавшихся на корнях растений, ацетиленовым методом [27] и выражали в микромолях этилена, восстановленного за 1 ч клубеньками одного растения (общая нитрогеназная активность). Азотфиксацию пересчитывали

также на 1 г клубеньков (удельная нитрогеназная активность). Газовую смесь анализировали на газовом хроматографе Chromatograf-504 (Mera Elwto, Польша) с пламенно-ионизационным детектором. Определения проводили в 4-кратной биологической повторности.

Все результаты обрабатывали статистически, в таблицах представлены средние арифметические и их стандартные ошибки.



Рис. 1. Общий вид растений сои на вегетационной площадке (фаза 1-го настоящего листа)

Результаты и обсуждение

В настоящей работе исследовали влияние лектина растения-хозяина на рост клубеньковых бактерий сои в чистой культуре. Лектин вносили в бактериальные суспензии штаммов, различающихся по своим симбиотическим свойствам. Из результатов, представленных в табл. 1, следует, что присутствие лектина сои в концентрации 2 и/или 20 мкг/мл в бактериальной суспензии исследуемых штаммов через 24 ч приводило к увеличению количества колониеобразующих единиц (КОЕ). Например, в суспензии активного штамма 646 при использовании

различных концентраций лектина показатель КОЕ увеличивался на 55 и 95%, а в суспензии неактивного штамма 604к — соответственно на 24 и 12%.

Из литературы известно, что лектины растения способны изменять активность ростовых процессов почвенных микроорганизмов, имеющих разную таксономическую принадлежность [9, 28, 29]. Направленность подобных эффектов может зависеть от концентрации лектина, его специфичности и времени экспозиции бактерий с протеином. Полученные нами результаты свидетельствуют о стимулирующем влиянии использованных концентраций лектина сои на рост различных штаммов клубеньковых бактерий в условиях чистой культуры независимо от их потенциальной симбиотической активности.

Для выяснения вопроса о влиянии лектина на метаболизм клубеньковых бактерий была изучена активность антиоксидантных энзимов бактерий. Из данных табл. 2 следует, что изменение показателей активности каталазы в клетках активного штамма 6346 и малоактивного штамма 21110 после 24 ч их инкубации с гомологичным растительным лектином было незначительным и находилось в пределах ошибки опыта. Уровень активности пероксидазы (табл. 2) в клетках исследуемых штаммов рисовых в целом был невысок, однако под влиянием гомологичного лектина этот показатель возрастал на 35% в вариантах активного штамма 6346 и на 45% в вариантах малоактивного штамма 21110. Антиоксидантная система клетки одной из первых реагирует на любые изменения внешней среды, поэтому уровень активности пероксидазы свидетельствует об изменении метаболизма микросимбионта и характеризует степень его реакции на влияние лектина растения-хозяина. Изменение активности гваякол-пероксидазы в клетках клубеньковых бактерий сои указывает на

Таблица 1. Изменение количества колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) различных штаммов *Bradyrhizobium japonicum*, инкубированных с лектином растения-хозяина (SBA)

Концентрация SBA в бактериальной суспензии, мкг/мл	Штамм клубеньковых бактерий							
	6346 (штамм-стандарт)		646 (активный)		21110 (малоактивный)		604к (неактивный)	
	КОЕ, $\cdot 10^9$	%	КОЕ, $\cdot 10^{10}$	%	КОЕ, $\cdot 10^8$	%	КОЕ, $\cdot 10^{10}$	%
0 (контроль)	17,7 $\pm$ 1,8	100	15,4 $\pm$ 1,6	100	14,3 $\pm$ 1,1	100	20,5 $\pm$ 1,6	100
2	—	—	23,9 $\pm$ 1,4	155	—	—	25,4 $\pm$ 1,9	124
20	24,0 $\pm$ 2,5	136	30,1 $\pm$ 2,7	195	17,4 $\pm$ 1,9	122	22,9 $\pm$ 1,8	112

Примечание: «—» — показатель не определяли.

индукцию лектином растения-хозяина состояния окислительного стресса. Аналогичные данные были получены нами в серии опытов по изучению влияния синтетического полисахарида МОД-19 на активность пероксидазы клеток клубеньковых бактерий гороха, выращиваемых на жидких и твердых средах [30]. Добавленный в питательную среду полисахарид более чем в 2 раза усиливал активность энзима пероксидазы. Ответ биологической системы на стрессовый фактор, как известно, сопровождается генерацией активных форм кислорода, в связи с этим полученный эффект мы принимали в качестве ответной реакции системы на появление нового фактора, рассматривая его до некоторой степени как стрессовый.

Известно, что сигнальные молекулы способны индуцировать биосинтетические программы в клетке. Например, показано, что добавление АЗП к культуре ассоциативного азотфиксатора *A. brasilense* индуцирует биосинтез протеинов и вызывает усиление биосинтеза нитрогеназы [5, 6]. Очевидно, по мере набухания семян и развития проростков сои концентрация лектина в среде культивирования повышается, в результате клубеньковые бактерии начинают активно размножаться, в связи с чем у них могут смещаться и акценты метаболизма. Однако в условиях чистой культуры в клетках ризобий, так же как и в бактероидах клубенька, должны произойти определенные физиолого-биохимические изменения, прежде чем у них синтезируется нитрогеназа и будут индуцированы специальные биосинтетические программы [31]. Поэтому для выяснения вопроса о влиянии лектина на метаболизм клубеньковых бактерий активный штамм 646 мы также выращивали на среде CS7 [18], содержащей специфические углеводы, микроэлементы и витамины. Условия этой среды приближают клубеньковые

бактерии к условиям питания в клубеньке растения-хозяина и позволяют бактериям индуцировать активность их нитрогеназного комплекса. В результате нами показано, что добавление гомологичного лектина к бактериальной суспензии ризобий в концентрации 2 и 20 мкг/мл приводило к изменениям в качественном составе их протеинового профиля (рис. 2). Регистрация отдельных новых полос на протеиновых профилях ризобий, проинкубированных в течение 24 ч с гомологичным лектином, может свидетельствовать об индукции синтеза протеинов в исследуемых бактериальных клетках.

В условиях вегетационных опытов были созданы симбиотические системы «соя — клубеньковые бактерии» для изучения проявления симбиотических свойств различными штаммами ризобий после их инкубации с гомологичным растительным лектином (рис. 3). Количество клубеньков, образовав-

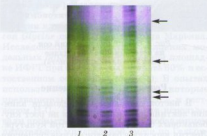


Рис. 2. Электрофорез протеинов, выделенных из бактериальных клеток *Bradyrhizobium japonicum* 646, выращенных на среде CS7: 1 — клетки выделены из бактериальной суспензии, не содержащей SBA; 2 — клетки выделены из бактериальной суспензии, инкубированной с SBA в концентрации 2 мкг/мл; 3 — клетки выделены из бактериальной суспензии, инкубированной с SBA в концентрации 20 мкг/мл

Таблица 2. Активность антиоксидантных энзимов бактериальных клеток *Bradyrhizobium japonicum*, инкубированных с лектином растения-хозяина (SBA) в концентрации 20 мкг/мл бактериальной суспензии

Штамм клубеньковых бактерий	Каталаза, мкмоль H_2O_2 / (1 мг протеина 1 мин)		Пероксидаза, мкмоль гваякола / (1 мг протеина 1 мин)	
	контроль (без SBA)	инкубация с SBA	контроль (без SBA)	инкубация с SBA
6346 (штамм-стандарт)	3,76 ± 0,23	3,46 ± 0,23	0,90 ± 0,05	1,22 ± 0,07
646 (активный)	3,4 ± 0,39	—	0,94 ± 0,09	—
21110 (малоактивный)	3,14 ± 0,17	2,90 ± 0,18	0,84 ± 0,04	1,21 ± 0,08
604к (неактивный)	2,9 ± 0,21	—	0,57 ± 0,06	—

шихся на корнях растений (рис. 4) — один из критериев эффективности комплементарного взаимодействия партнеров симбиоза, характеризующий такое важное свойство штамма-инокулянта, как его вирулентность. Результаты опытов показали, что количество клубеньков на корнях растений сои, инокулированных активными (6346 и 646), малоактивным (21110) и неактивным (604к) штаммами увеличивалось в онтогенезе. Клубеньки, образованные активными штаммами 6346 и 646, в основном одинакового размера, были сосредоточены преимущественно на главном корне в верхней его трети. Штамм 21110 по всей корневой системе образовывал как крупные, так и мелкие клубеньки. Мелкие клубеньки неактивного штамма 604к, образовавшего их максимальное количество, были рассредоточены по всей корневой системе. Внесение в бактериальную суспензию активных штаммов (6346 и 646) гомологичного лектина усиливало их вирулентность, в то время как прединкубация неактивного штамма 604к и малоактивного штамма 21110 с гомологичным лектином оказывала ингибирующий эффект на клубенькообразование (табл. 3).

Азотфиксирующая активность клубеньков в значительной степени определяется симбиотическими свойствами микросимбионта и является одним из основных критериев эффективности симбиотической системы. Из данных табл. 3 следует, что, как и в случае с вирулентностью, прединкубация ризо-



Рис. 4. Клубеньки, образовавшиеся на корнях растений сои, инокулированной активным штаммом *Bradyrhizobium japonicum* 6346 (начало плодообразования)

бий с лектином растения-хозяина приводила к увеличению общей нитрогеназной активности клубеньков, индуцированных активными штаммами ризобий (646 и 6346). Показатели удельной нитрогеназной активности клубеньков при внесении лектина в суспензии активных штаммов находились в пределах ошибки опыта или характеризовались тенденцией к снижению. Это указывает на то, что в условиях эффективного взаимодействия партнеров симбиоза увеличение общей нитрогеназной активности под влиянием лектина растения-хозяина происходит прежде всего за счет увеличения количества азотфиксирующих клубеньков (т. е. вирулентности ризобий), а не вследствие увеличения активности их нитрогеназного комплекса. Внесение лектина в суспензию малоактивного штамма 21110 и неактивного штамма 604к оказывало противоположный эффект и проявлялось тенденцией к снижению как клубенькообразования, так и азотфиксации.

Таким образом, лектин сои положительно влияет на метаболизм различных штаммов ризобий в чистой культуре. С поступлением в бактериальные клетки сигнала (лектин растения-хозяина) активируется их деление, сопровождающееся повышением активности пероксидазы и появлением новых полос в протеиновом профиле. Предварительная инкубация клубеньковых бактерий с лектином оказывает также существенное влияние на показатели эффективности их симбиоза с растением-хозяином.

Известно, что после 10 мин совместной инкубации культуры ризобий с гомологичным лектином агглютинирующая активность протеина в суспензии уменьшается и остается постоянной в течение 20 ч независимо от вида лектина и штамма ризобий [29]. Следовательно, в первые минуты инкубации происходит частичное связывание лектина ризобиями, оказывающее влияние на метаболизм бактериальной клетки.



Рис. 3. Влияние инокуляции различными по активности штаммами *Bradyrhizobium japonicum*, проинкубированными с гомологичным лектином (SBA), на развитие растений сои (фаза бутонизации):

- 9 — активный штамм 6346;
- 61 — неактивный штамм 604к;
- 35 — активный штамм 6346 + SBA;
- 85 — неактивный штамм 604к + SBA

Таблица 3. Вирулентность различных штаммов *Bradyrhizobium japonicum* и нитрогеназная активность инцидированных на корнях сои клубеньков при внесении в бактериальную культуру лектина растения-хозяина (SBA)

Штамм клубеньковых бактерий	Вирулентность	Нитрогеназная активность клубеньков	
	количество клубеньков, шт./растение	общая, мМ C_2H_4 / (растение/ч)	удельная, мМ C_2H_4 / (1 г клубенька/ч)
Вегетационный опыт 2008 г.*			
646 (активный)	113,0 ± 6,0	7,2 ± 0,8	7,3 ± 0,6
646 + SBA	149,8 ± 13,4	10,9 ± 0,1	6,5 ± 0,9
604к (неактивный)	615,0 ± 14,5	0,0013 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001
604к + SBA	463,2 ± 47,5	0,0011 ± 0,0001	0,0008 ± 0,0001
Вегетационный опыт 2009 г.*			
6346 (штамм-стандарт)	93,7 ± 9,1	15,3 ± 0,2	10,0 ± 0,4
6346 + SBA	146,0 ± 15,7	17,9 ± 0,4	9,6 ± 0,7
21110 (малоактивный)	148,7 ± 10,2	11,6 ± 0,8	6,4 ± 0,7
21110 + SBA	108,2 ± 9,2	7,2 ± 0,4	4,7 ± 0,3

* — Фаза начала цветения (2008 г. — 51-е сут; 2009 г. — 45-е сут от появления всходов).

Экзогенная обработка семян лектином без инокуляции клубеньковыми бактериями также способна стимулировать и координировать рост и развитие растений сои, повышая показатели ее продуктивности [32]. Поскольку процесс образования клубеньков в значительной степени регулируется растением-хозяином [33], а часть лектина в бактериальной суспензии, оставшаяся несвязанной, сохраняет свои свойства [29], можно предположить, что непосредственное влияние на растение, его клубенькообразование и связанную с ним общую нитрогеназную активность оказывает не связанный ризобиями лектин, вносимый в бактериальную суспензию. Однако, результаты наших вегетационных опытов демонстрируют разнонаправленность действия гомологичного лектина на проявление генетически детерминированного симбиотического потен-

циала микросимбионта. Специфический растительный лектин, стимулируя или ингибируя нодуляцию и азотфиксацию у штаммов ризобий с различной активностью, влияет на характер проявления их симбиотических свойств. Под влиянием растительного лектина клубеньковые бактерии более выражено проявляют свои симбиотические свойства, в связи с чем применение совместной инкубации ризобий с этим протенном может служить методом более полной характеристики отдельно взятых штаммов.

Полученные данные дают основание рассматривать гомологичный лектин как молекулярный сигнал, изменяющий прежде всего метаболизм ризобий, что впоследствии может существенно отражаться на их свойствах и эффективности симбиоза.

ЛИТЕРАТУРА

- Сытников Д. М., Коц С. Я. Участие лектина в различных физиологических процессах растений // Физиол. биохим. культ. раст. — 2009. — Т. 41, № 4. — С. 279–296.
- Hirsh A. M., Lum M. R., Downie J. A. What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special? // Plant Physiol. — 2001. — V. 127. — P. 1484–1492.
- Kryuchenko O. V. Practice of soybean and wheat lectins use for the plant growing // The problems of biogeochemistry and geochemical ecology. — 2008. — V. 1, N 5. — P. 99–105.
- Lodeiro A. R., Lopez-Garcia S. L., Vazquez T. E. E., Favelukes G. Stimulation of adhesiveness, infec-

- tivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 188, N 2. — P. 177–184.
- Антонюк Л. П., Игнатов В. В. О роли агглютинаина зародыша пшеницы в растительно-бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку // Физиол. раст. — 2001. — Т. 48, № 3. — С. 427–433.
- Антонюк Л. П., Фомина О. Р., Игнатов В. В. Влияние лектина пшеницы на метаболизм *Azospirillum brasilense*: индукция биосинтеза белков // Микробиология. — 1997. — Т. 66, № 2. — С. 172–178.

7. Антонюк Л. П., Безверхова Н. В., Есеева Н. В., Лобачев Ю. В. Лектины пшеницы — один из факторов, отвечающих за вариабельность результатов инокуляции пшеницы // Всероссийский симпозиум (с международным участием) «Биотехнология микробов», посвященный 120-летию со дня рождения академика В. Н. Шапошникова, Москва, 20–23 окт., 2004: Тез. докл. — М., 2004. — С. 9.
8. Коць С. Я., Сытников Д. М. Лектины бобовых растений как фактор эффективного симбиоза // Физиол. биохим. культ. раст. — 2007. — Т. 39, № 6. — С. 463–475.
9. Косенко Л. В., Мандровская Н. М. Влияние лектина гороха на рост микросимбионтов гороха и биосинтез ими экзогликанов // Микробиология. — 1998. — Т. 67, № 5. — С. 626–630.
10. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant. Biol. — 2004. — V. 55. — P. 373–399.
11. Verma D. P. S. Signals in root nodules organogenesis and endocytosis of *Rhizobium* // Plant Cell. — 1992. — V. 4, N 4. — P. 373–382.
12. Ramu S. K., Peng H.-M., Cook D. R. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulation zone *rip1* in *Medicago truncatula* // Mol. Plant — Microbe Interact. — 2002. — V. 15, N 6. — P. 522–528.
13. Кротович В. Л. Введение в энзимологию. — М.: Наука, 1977. — 352 с.
14. Dalton D. A., Baird L. M., Langeberg L. et al. Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) root nodules // Plant Physiol. — 1993. — V. 102, N 2. — P. 481–489.
15. Matamoros M. A., Dalton D. A., Ramos J. et al. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the Rhizobia — Legume symbiosis // Ibid. — 2003. — V. 133 (2). — P. 499–509.
16. Сытников Д. М., Коць С. Я. Симбиотические свойства неактивного штамма клубеньковых бактерий сои 604к // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку: У 2 т. / Гол. ред. Моргун В. В. — К.: Лорос, 2009. — Т. 1. — С. 466–470.
17. Child J. J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. association with non-leguminous plant cell cultures // Nature. — 1975. — V. 253. — P. 350–351.
18. Pagan J. D., Child J. J., Scowcroft W. R., Gibson A. H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on defined medium // Ibid. — 1975. — V. 256. — P. 406–407.
19. Фробишер М. Основы микробиологии / Пер. с англ. Шорина В. А. — М.: Мир, 1965. — 678 с.
20. Починок Х. М. Методы биохимического анализа растений. — К.: Наук. думка, 1976. — 334 с.
21. Salzwedel J. L., Dazzo F. B. pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants // Mol. Plant — Microbe Interact. — 1993. — V. 6, N 1. — P. 127–134.
22. Старченко Е. П., Даценко В. К., Яковлева Н. С. Метод отделения клубеньковых бактерий медленнорастущих штаммов от слизи // Прикл. биохим. микробиол. — 1997. — Т. 33, № 2. — С. 321–322.
23. Saravanan R. S., Rose J. K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues // Proteomics. — 2004. — V. 4. — P. 2522–2532.
24. Hurkman W. J., Tanaka C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis // Plant Physiol. — 1986. — V. 81, N 3. — P. 802–806.
25. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms qualities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — V. 72. — P. 248–254.
26. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — V. 227, N 5259. — P. 680–685.
27. 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. — V. 43. — P. 1185–1207.
28. Кириченко Е. В., Титова Л. В. Влияние растительных лектинов на рост культур почвенных микроорганизмов // Агрокол. журн. — 2005. — № 4. — С. 52–56.
29. Кириченко Е. В., Маличенко С. М. Влияние лектинов бобовых растений на проявление симбиотических свойств клубеньковыми бактериями в бобово-ризобийном симбиозе // Физиол. раст. — 2000. — Т. 47, № 2. — С. 221–225.
30. Кругова Е. Д., Коць С. Я., Мандровская Н. М. Действие синтетического полисахарида МОД-19 на формирование и функционирование симбиотической системы *Pisum sativum* L. — *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Прикл. биохим. микробиол. — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 324–330.
31. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях / Под ред. Старченко Е. П. — К.: Наук. думка, 1984. — 224 с.
32. Кириченко Е. В., Титова Л. В., Коць С. Я. и др. Влияние лектина из семян сои на продуктивность сои // Агрохимия. — 2004. — № 11. — С. 58–62.
33. Тихонович И. А., Борисов А. Ю., Цыганов В. Е. Интеграция генетических систем растений и микроорганизмов при симбиозе // Усп. совр. биол. — 2005. — Т. 125, № 3. — С. 227–238.

**ВПЛИВ ЛЕКТИНУ СОЇ
НА МЕТАБОЛІЗМ
ТА СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ШТАМІВ *Bradyrhizobium japonicum***

Д. М. Ситніков¹
О. Д. Кругова²
Н. М. Мандровська³

¹Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного
НАН України, Київ

²Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ

E-mail: sytnikov@list.ru

**SOYBEAN LECTIN EFFECT
ON METABOLISM
AND SYMBIOTIC PROPERTIES OF
Bradyrhizobium japonicum STRAINS**

D. M. Sytnikov¹
O. D. Krugova²
N. M. Mandrovskaya³

¹Kholodnyi Institute of Botany of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Institute of Plant Physiology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: sytnikov@list.ru

В умовах лабораторних та вегетаційних дослідів досліджено вплив лектину з насіння сої (SBA) на ріст, метаболізм і прояв симбіотичних властивостей різних за активністю штамів (634b, 646, 21110, 604k) бульбочкових бактерій сої (*Bradyrhizobium japonicum*). Показано, що попередня інкубація ризобій з лектином рослини-хазяїна стимулює їх розмноження та підвищує активність пероксидази незалежно від потенційної симбіотичної активності штаму. При цьому лектин сої викликає появу нових протеїнів у бактеріальній клітині активного штаму ризобій 646. Встановлено, що в умовах симбіозу «соє — бульбочкові бактерії» специфічний рослинний лектин здатен стимулювати або інгібувати бульбочкоутворення і азотфіксацію в штамів з різною активністю. Отже, впливаючи на метаболізм і характер прояву симбіотичних властивостей ризобій, гомологічний лектин різноспрямовано діє на генетично детермінований симбіотичний потенціал мікросимбіонта.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, лектин сої, соєво-ризобіальний симбіоз, нітрогеназна активність, антиоксидантні ензими.

The effects of soybean seed lectin (SBA) on growth, metabolism and symbiotic properties expression of soybean nodule bacteria (*Bradyrhizobium japonicum*) strains with different activity (634b, 646, 21110 and 604k) were studied in laboratory and vegetative experiments. It was shown that preliminary incubation of rhizobia with host-plant lectin stimulated their growth and increased the peroxidase activity of strains independently of the potential symbiotic activity. Soybean lectin initiated the appearance of new proteins in bacteria cells of rhizobial active strain 646. It was established that specific plant lectin was able to stimulate or inhibit the nodulation and nitrogen-fixing of strains with different activity under «soybean - nodule bacteria» symbiosis condition. Thus, homologous lectin through metabolism and character of symbiotic properties of rhizobia is multidirectional in its action on the genetically determinated microsymbiont potential.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean lectin, soybean-rhizobial symbiosis, nitrogenase activity, antioxidant enzymes.