НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Наукова робота

**на здобуття щорічної премії Президента України
для молодих вчених**

**Розробка шляхів підвищення стійкості бобово-ризобіального симбіозу сої до дії посухи**

|  |  |
| --- | --- |
| КОНДРАТЮК Юлія Юріївна – | кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |
|  |  |
| ЛЕВІШКО Алла Сергіївна –  | кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |
|  |  |
| ГРИЩУК Олена Олександрівна – | кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |
| ВЕСЕЛОВСЬКА Лілія Ігорівна –  | кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України |

РЕФЕРАТ

2016

Реферат роботи

Кондратюк Ю.Ю., Левішко А.С., Грищук О.О., Веселовської Л.І.

**“Розробка шляхів підвищення стійкості бобово-ризобіального симбіозу сої до дії посухи”,**

висунутої на здобуття премії Президента України для молодих вчених

Висока ефективність використання біологічного азоту визначає велике практичне значення досліджень, спрямованих на зростання його значущості в азотному балансі землеробства. У всіх індустріально розвинених країнах проблема біологічного азоту – одна з найважливіших у біологічних дослідженнях. Екологізація сільськогосподарського виробництва набуває у сучасному світі все більшого значення у зв'язку з глобальними порушеннями процесів кругообігу основних біогенних елементів у штучних агроценозах. Тому все більш актуально широке використання біологічного азоту. Будучи одним з основних ланок екологізації сільськогосподарського виробництва, біологічний азот дозволяє отримувати високі й сталі врожаї, забезпечуючи поліпшення родючості грунту.

Зацікавлення проблемою мікробіологічної фіксації атмосферного азоту обумовлене не тільки важливістю цього процесу в азотному балансі біосфери Землі, але і його перспективою як джерелом зв'язаного азоту для забезпечення зростаючих потреб сільського господарства і промисловості. Основними аргументами при цьому виступають його повна нешкідливість для людини і навколишнього середовища та порівняно невеликі витрати енергії на активізацію мікроорганізмів-азотфіксаторів.

Найбільш відчутне джерело біологічного азоту – бобові культури, серед яких чільне місце в агропромисловому комплексі посідає соя Цінність їх полягає у тому, що вони дають продукцію, багату білками і дефіцитними амінокислотами. Вартість білка бобових культур значно нижча за вартість білка зернових культур.

Включення до сівозміни бобових багаторічних трав, які здатні нагромаджувати у своїй біомасі 200–300 кг/га азоту, а також однорічні бобові культури, які спроможні нагромадити 60–100 кг/га біологічного азоту. Насичення сівозмін культурами-азотфіксаторами до 20–30 % дозволяє на 25–30 % зменшити норми внесення азотних добрив.

При цьому висока активність біологічної (симбіотичної) фіксації азоту атмосфери обумовлена низкою чинників, одним із яких є вологість ґрунту.

Значення цього фактора добре вивчено і відображено в науковій літературі. Зазвичай бульбочки на коренях бобових культур утворюються у межах 40–80 % зволоження ґрунту від повної його вологоємності. Достатньою для цього процесу слід вважати вологість 60–70 % від повної вологоємності. За твердженням вчених, мінімальна вологість грунту, за якої починають розвиватися бульбочкові бактерії, у межах 16–18 % від повної вологоємності.

Проте, глобальні зміни клімату, які останніми десятиріччями спостерігаються на нашій планеті і, зокрема, в Україні, наслідком яких є збільшення частоти і тривалості посух спонукають до розробки якісно нових підходів до вирощування сільськогосподарських культур.

Як відомо, недостатнє водозабезпечення призводить до порушення тонких механізмів кисневого контролю в бульбочках, що спричиняє їх старіння. Зокрема, зменшується проникність бар’єру дифузії кисню в кортексі бульбочок, тим самим знижується доступ кисню в бактероїди.

Тривала посуха викликає ряд істотних, незворотних змін і в самих рослинах сої, в результаті яких відбувається зменшення активної листкової поверхні, послаблення функціонування фотосинтетичного апарату то що. Як наслідок, результатом таких змін є суттєве зниження продуктивності сільськогосподарських культур

Проте, молекулярні механізми впливу недостатнього зволоження ґрунту та адаптації до нього азотфіксувальних систем на сьогоднішній день лишаються не розкритими, чим обумовлюється важливість досліджень різних показників тканин і симбіотичних утворень бобових рослин за дії на них посухи. Не менш вагомими є пошук засобів підвищення стійкості а, відтак, і продуктивності рослин сої в умовах недостатнього водозабезпечення.

На сьогодні одним із шляхів посилення адаптації рослин до посухи і підвищення їхньої продуктивності за несприятливих умов є використання екологічно безпечних біологічно активних речовин, таких як фітогормони природнього чи синтетичного походження, полісахариди та інші. Проте, перспективними в цьому аспекті є лектини. Оскільки цим білкам відводиться важлива роль не лише у процесах формування але й функціонування симбіозу між бобовими рослинами та бульбочковими бактеріями. З їх допомогою відбувається активація адгезивної здатності ризобій, що сприяє агрегації бактерій у ризосфері рослин, і як наслідок, – утворенню бульбочок, у яких відновлюється азот.

Важливою є участь лектинів у захисті рослинного організму від негативних факторів навколишнього середовища. Встановлено, що застосування лектинів стимулює опірність рослин до дії важких металів і засолення, а також сприяє інтенсифікації фізіологічних процесів, у тому числі фіксації молекулярного азоту, у бобових рослин, зокрема, за недостатнього водозабезпечення

У зв’язку з викладеним головною метою представленої роботи було проведення комплексного дослідження особливостей формування і функціонування симбіозу *Glycine max* із *Bradyrhizobium japonicum* в умовах недостатнього водозабезпечення та визначення можливості використання лектину для підвищення продуктивності та стійкості сої до посухи.

У даній науковій роботі показано ефективне застосування сучасних біотехнологічних підходів длякомплексного дослідження потенційних маркерів адаптивних реакцій рослинно-мікробної взаємодії у агроекосистемах за впливу різних стресових факторів навколишнього середовища. Виявлено ряд фізіолого-біохімічних змін у формуванні та функціонуванні симбіотичних систем соя – *B. japonicum* за дії екзогенного гомологічного лектину насіння на фоні різного водозабезпечення.

Наведено експериментальні дані та теоретичні узагальнення стосовно особливостей біологічно активних речовин (білки, метаболіти, фітогормони), які розглядаються як фактори формування і функціонування системи ґрунт-мікроорганізми-рослина за оптимальних та стресових умов навколишнього середовища. Доведено можливість використання гомологічного лектину для підвищення стійкості до посухи та продуктивності сої.

Аналіз результатів досліджень показав зміни активності ключових у процесах формування і функціонування симбіозу антиоксидантних ферментів, під впливом екзогенного лектину. Такі зміни можуть підтверджувати значення лектину в регуляції процесів формування і функціонування симбіозу та в реакції інокульованих рослин сої на посуху. Адже відомо, що зміна активності антиоксидантних ферментів спрямована на послаблення дії оксидативного стресу в тканинах. Практичним наслідком цих досліджень може бути використання лектинів для підвищення стійкості сої до посушливих умов довкілля.

Встановлено що, використання екзогенного лектину приводить до коливання рівня цитокінінів у різних органах сої. Виявлене зростання вмісту фітогормонів цитокінінової природи у рослин є важливою ланкою у механізмі швидкої дистанційної сигналізації про стрес, та може свідчити про підвищення стійкості симбіотичних систем до негативного впливу посухи.

У ході досліджень було оцінено продуктивність рослин, вирощених за недостатнього водозабезпечення при застосуванні екзогенного лектину, для передпосівної обробки насіння та як компонента інокуляційної суспензії, та визначено більш ефективний спосіб використання цього білку для підвищення стійкості бобово-ризобіального симбіозу до посухи та урожайності рослин сої.

Отже, за результатами дослідів 2012–2014 рр. встановлено, що використання екзогенного лектину для обробки насіння, а також як компонента інокуляційної суспензії приводить до зростання насіннєвої продуктивності сої, вирощеної в оптимальних умовах, а також дозволяє частково зняти негативний вплив посухи як на самі рослини сої, так і на симбіотичні системи створені за їх участю, за рахунок чого відбувається збільшення урожаю насіння сої в посушливих умовах. Проте ефективність застосування лектину значною мірою залежить від способу його використання.

Одержані результати вказують на те, що застосування гомологічного лектину може мати протекторний ефект при вирощуванні сої за посушливих умов за рахунок пом’якшення негативної дії стресу на фізіологічні процеси в симбіотичних системах, зокрема на ріст і розвиток рослин і функціонування бульбочок. Таким чином, екзогенний лектин може розглядатися як один із важливих засобів підвищення стійкості рослин сої в умовах недостатнього водозабезпечення.

Дослідження впливу передпосівної інокуляції штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum* із різними симбіотичними властивостями на фітогормональний статус рослин сої показали, що бактеризація насіння сої приводить до підвищення пулу індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) у коренях у порівнянні з контролем у всіх досліджуваних варіантах. При цьому показник вмісту ауксинів у бульбочках на початкових стадіях формування симбіотичного апарату перевищував даний показник у коренях, що свідчить про важливу роль ІОК у закладанні бульбочок. Відмічено чіткі залежності між вмістом ІОК у коренях та бульбочках, утворених високоактивними штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*, та азотфіксувальною активністю на ранніх фазах розвитку рослин сої.

При визначенні вмісту зеатину було показано різке підвищення даного фітогормону у коренях досліджуваних рослин у порівнянні з контролем у фазу бутонізації (активної фіксації азоту). Це свідчить про те, що функціонування симбіотичного апарату та синтез зеатину в дану фазу тісно пов’язані між собою.

Також було відмічено, що саме на початкових стадіях онтогенезу рослин вміст зеатинрибозиду у коренях перевищував вміст зеатину у них.

У той же час було відзначено, що у всіх рослин, бактеризованих високовірулентними штамами, як активними, так і неактивними, показник вмісту цитокінінів у бульбочках коливався приблизно в однакових межах, тоді як у бульбочках сої у варіанті із застосуванням середньовірулентного, високоактивного транспозонового мутанту цей показник більш, ніж у два рази був вищий в порівнянні з іншими варіантами.

В ході досліджень було встановлено, що на початкових етапах формування бобово-ризобіального симбіозу інокуляція рослин сої приводить до підвищення пулу гормонів гіберелінової природи в порівнянні з контролем. Залежності між вмістом гіберелінів у коренях та активністю штамів не було виявлено. Результати досліджень показали, що зміна вмісту гіберелінів у кореневих бульбочках сої пов’язана не лише з активністю, а й із вірулентністю штаму-інокулянту. Відмічено існування тісного взаємозв’язку між вмістом гіберелінів та іншими фітогормонами у різних органах сої, інфікованої контрастними за активністю штамами та Tn5-мутантами *B. japonicum*, що свідчить про комплексність гормональних зв’язків у рослинному організмі та їх важливу роль у регуляції симбіотичних взаємовідносин.

При визначенні пулу рістінгібуючого гормону абсцизової кислоти (АБК) у досліджуваних рослин було показано, що його концентрація у коренях на порядок менша, ніж у бульбочках на початкових етапах формування симбіозу.

Було встановлено, що з початком інтенсифікації азотфіксувальної активності зміна пулу АБК у кореневих бульбочках у всіх дослідних варіантах несе схожий характер, це може вказувати на строго запрограмовану дію АБК у регулюванні формування і функціонування азотфіксувального апарату.

Порівняння показника вмісту АБК у бульбочках сої з іншими фітогормонами дозволило виявити певні взаємозв’язки з показниками вмісту ауксинів, цитокінінів та гіберелінів у фазу двох трійчастих листків. Контроль над цими взаємодіями (зокрема, в дану фазу) може слугувати одним із ефективних заходів інтенсифікації симбіотичних взаємовідносин.

При дослідженні змін білкових профілів симбіотичних систем сої було показано загальну тенденцію для білкових препаратів як бульбочок, так і коренів сої до зниження їх сумарної кількості за недостатньої зволоженості ґрунту незалежно від штаму-інокулянта на фоні зниження сухої маси коренів та бульбочок у стресових умовах. Разом із тим, у дослідах із бульбочками кількість білків знижувалась протягом досліджуваного періоду росту рослин незалежно від водного забезпечення, у той час, як у коренях навпаки спостерігався суттєвий приріст цього показника. Тобто можна зробити висновок про те, що білки, екстраговані з інфікованих та неінфікованих коренів сої, по-різному реагують на водний стрес та, імовірно, залучаються до різних механізмів адаптації до нестачі вологи в ґрунті. У той же час слід відмітити, що у екстрактах бульбочок більш суттєве зниження вмісту загального білка було характерне для варіанту за інокуляції активним штамом, порівняно з інокуляцією неактивним.

При дослідженні якісних змін білкових профілів коренів та бульбочок сої за інокуляції різними за активністю штамами *B. japonicum* та за різного водного забезпечення нами було продемонстровано, що для всіх препаратів коренів та всіх екстрактів бульбочок характерні спільні картини кількісного розподілу поліпептидів. У той же час виявлено велику кількість відмінностей білкового складу всіх зразків залежно від штама-інокулянта, фази росту рослин та наявності стресового чинника.

Показано що, інокуляція як активними, так і неактивними штамами ризобій сприяє синтезу органічних кислот, які не лише приймають участь у функціонуванні симбіозу, а й здатні створювати передумови для підвищення стійкості рослин до дефіциту вологи.

Результати досліджень, представлених у роботі, запропоновано враховувати при розробці і впровадженні нових підходів до керування продукційним процесом у бобових культур. Отримані дані є потенційним підґрунтям для розробки нових і вдосконалення існуючих елементів технологій біологічного землеробства, спрямованого на суттєве підвищення продуктивності бобових та зернових культур, економію енергоресурсів та захист довкілля. Рекомендовано застосування лектину насіння сої як компонента інокуляційної суспензії для зниження негативного впливу недостатнього водозабезпечення на ефективність симбіотичних систем сої та підвищення продуктивності даної культури при вирощуванні в посушливих регіонах.

За темою роботи опубліковано 73 праці. Загальна кількість публікацій авторів – 90, у тому числі патент. Роботи надруковані у міжнародних журналах, що містяться в базі даних SCOPUS – 4, загальна кількість посилань на публікаціїї  претендентів – 4, h-індекс – 3.