
... РІСТ ТА РОЗВИТОК У ВЗАЄМОДІЇ «РОСЛИНА-МІКРООРГАНІЗМИ» ...
GROWTH AND DEVELOPMENT IN "PLANT-MICROORGANISMS"
INTERACTION ...

УДК: 581.1:579.64:582.736

**Азотфіксувальна активність і продуктивність люцерни, інокульованої
Sinorhizobium meliloti, за різного водозабезпечення та використання білків
із гемаглютинуючою активністю**

С.Я. Коць, Л.М. Михалків, Л.І. Веселовська, С.К. Береговенко

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України (Київ, Україна)
mykhalm@ukr.net*

Вивчали вплив білків із гемаглютинуючою активністю (лектин насіння сої та гемаглютиніни насіння люцерни) на формування і продуктивність симбіозу люцерни із бульбочковими бактеріями. В умовах вегетаційного дослідження виявлено, що інкубація *Sinorhizobium meliloti* 441 із гемаглютинінами люцерни посилює азотфіксувальну активність корневих бульбочок, сформованих цими ризобіями, стимулює ріст вегетативної маси рослин і підвищує стійкість симбіотичної системи до нестачі вологи. Показано можливість використання соєвого лектину для активізації процесу відновлення молекулярного азоту симбіотичною системою люцерни – *S. meliloti* за недостатнього водозабезпечення. У польових умовах доведено стимулюючий вплив лектину сої на ріст надземної маси та утворення бобів у люцерни.

Ключові слова: люцерна, *Sinorhizobium meliloti*, гемаглютиніни, симбіоз, продуктивність, водозабезпечення.

**Азотфиксирующая активность и продуктивность люцерны,
инокулированной *Sinorhizobium meliloti*, при разном водообеспечении и
использовании белков с гемагглютинирующей активностью**

С.Я. Коць, Л.М. Михалків, Л.І. Веселовська, С.К. Береговенко

Изучали влияние белков с гемагглютинирующей активностью (лектин семян сои и гемагглютинины семян люцерны) на формирование и продуктивность симбиоза люцерны с клубеньковыми бактериями. В условиях вегетационного опыта обнаружено, что инкубация *S. meliloti* 441 с гемагглютининами люцерны усиливает азотфиксирующую активность корневых клубеньков, сформированных этими ризобиями, стимулирует рост вегетативной массы растений и повышает устойчивость симбиотической системы к недостатку влаги. Показана возможность использования соевого лектина для активизации процесса восстановления молекулярного азота симбиотической системой люцерны – *Sinorhizobium meliloti* при недостаточном водообеспечении. В полевых условиях доказано стимулирующее влияние лектина сои на рост надземной массы и образование бобов у люцерны.

Ключевые слова: люцерна, *Sinorhizobium meliloti*, лектин, гемагглютинины, симбиоз, продуктивность, водообеспечение.

**The nitrogen fixing activity and productivity of alfalfa inoculated with
Sinorhizobium meliloti under different water supply and using of protein with
hemagglutinin activity**

S.Ya. Kots, L.M. Mykhalkiv, L.I. Veselovska, S.K. Beregovenko

The influence of hemagglutinins (soybean seed lectin and alfalfa seed hemagglutinins) on the formation and productivity of the symbiosis between alfalfa and nodule bacteria was investigated. In pot experiment it was found that the incubation of *Sinorhizobium meliloti* 441 with alfalfa hemagglutinins increased nitrogen fixing activity of root nodules, stimulated plant growth and led to the enhance of resistance of the symbiotic system to water deficit. It was shown the possibility of using the soybean seed lectin to activate the molecular nitrogen fixation by

the symbiotic system alfalfa - *Sinorhizobium meliloti* under insufficient water supply. In field conditions it was proved the stimulating effect of soybean lectin on the growth of aboveground mass and the bean formation in alfalfa.

Key words: alfalfa, *Sinorhizobium meliloti*, lectin, hemagglutinins, symbiosis, productivity, water supply.

Вступ

Фізіологічні процеси, що відбуваються у рослинах родини бобових за умов інокуляції, і, відповідно, їхня реакція на дію стресів, визначаються особливостями утворення та функціонування симбіозу з бульбочковими бактеріями. Тому при пошуку шляхів підвищення продуктивності цих культур, зокрема, за несприятливих умов вирощування, важливо враховувати вплив зовнішніх чинників на здатність бобових у симбіозі з ризобіями засвоювати молекулярний азот, а також значення компонентів бобово-ризобіальних систем у реалізації їх потенціалу.

Важливу роль у формуванні та функціонуванні симбіозу відіграють лектини – білки неімунного походження, здатні зворотно і специфічно зв'язувати вуглеводні залишки різної хімічної природи. Завдяки даній властивості лектини взаємодіють із поверхневими вуглеводами бактеріальної клітини при утворенні бобово-ризобіального симбіозу. Окрім того, у літературі широко обговорюється значення цих білків у формуванні реакцій рослин на дію несприятливих факторів довкілля (Шакирова, Безрукова, 2007; De Hoff et al., 2009; Бабоша, 2010), а також можливість їх використання на практиці (Melnykova et al., 2013). Показано (Кириченко, 2011), що за дії УФ-опромінення обробка насіння пшениці аглютиніном зародків пшениці (АЗП) забезпечує протекторний ефект на ранньому етапі онтогенезу рослин, виявлено (Лубянова и др., 2009), що передстресова обробка проростків квасолі фітогемаглютиніном попереджає викликане засоленням гальмування мітотичної активності клітин апікальної меристеми кореня, тоді як застосування цього лектину в постстресовий період прискорює репарацію ростових процесів у коренях, доведено (Веселовська та ін., 2013), що застосування лектину сприяє підвищенню ефективності симбіозу *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* за посушливих умов. Зважаючи на властивості лектинів, їх участь у процесах взаємодії рослин та мікроорганізмів і у відповіді рослин на дію стресових факторів можна припустити перспективність використання цих білків для підвищення ефективності бобово-ризобіальних систем, зокрема, за несприятливих умов довкілля.

Тому метою представлених досліджень було вивчити вплив білків із гемаглютинуючою активністю на продуктивність симбіотичних систем люцерни – *Sinorhizobium meliloti* в умовах різного водозабезпечення.

Об'єкти та методи досліджень

Веgetаційні досліді проводили на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини люцерни сорту Надежда вирощували у піщаній культурі з додаванням поживного розчину Гельрігеля (0,25 норми азоту) та мікроелементів за природного освітлення й оптимального водозабезпечення (60% повної вологемкості (ПВ)). Модельну 30-добову посуху створювали, починаючи з фази прихованої бутонізації, шляхом контрольованого поливу рослин (40% ПВ), після чого його відновлювали до досягнення оптимального рівня водозабезпечення. Перед посівом насіння інокулювали бактеріями *Sinorhizobium meliloti* 441 (контроль), у дослідних варіантах ризобії попередньо інкубували із гемаглютинінами насіння люцерни (ГЛ) або ж насіннєвим лектином сої (ЛС). Польові експерименти проводили на базі дослідного поля агролабораторії Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Насіння люцерни сорту Надежда інкубували у розчині гемаглютинуючих білків сої та інокулювали бульбочковими бактеріями *S. meliloti* 441 і T17. Посів рендомізований, площа облікової ділянки – 4,5 м². Концентрація білків – 100 мкг/мл. Час інкубації насіння і бактерій із лектином – 20 год, тривалість інокуляції насіння – 1 год.

Азотфіксувальну активність бульбочок визначали з допомогою ацетиленового методу (Hardy, 1968) у 5-кратній повторності. Масу надземної частини та кореня рослин у вегетаційному досліді – у 15-кратній повторності. Відбори проводили у фази бутонізація–початок цвітіння і цвітіння у вегетаційному досліді, а також цвітіння–формування бобів – у польовому експерименті. Усі результати обраховували статистично за загальноприйнятою методикою (Доспехов, 1985), у таблицях і на рисунках подано середні арифметичні та їх стандартні похибки.

Результати та обговорення

За результатами вегетаційних досліджень встановлено (рис. 1), що за 60% ПВ ефект дії білків на функціональну активність симбіозу проявився лише у варіанті, де ризобії люцерни інкубували з гемаглютинінами люцерни, – приріст становив близько 50%. Відзначимо, що за недостатнього водозабезпечення ацетиленвідновлювальна активність у варіантах із гемаглютинуючими білками суттєво не відрізнялась від контролю за оптимального водозабезпечення. Це свідчить, що використання лектину сої та гемаглютинінів люцерни дозволяє пом'якшити, а, можливо, і повністю зняти негативний вплив посухи на фіксацію молекулярного азоту симбіотичними системами.

Визначення маси рослин люцерни показали (табл. 1), що використання гемаглютинуючих білків стимулює наростання маси коренів люцерни за недостатнього водозабезпечення у період бутонізація–початок цвітіння. Даний факт може свідчити про вищу адаптацію до посухи рослин люцерни у варіантах із гемаглютинінами, оскільки більш розвинена коренева система, як правило, покращує надходження води та поживних речовин у рослину. Водночас за оптимального водозабезпечення у дослідних варіантах виявлено зниження маси кореня у порівнянні з контролем.

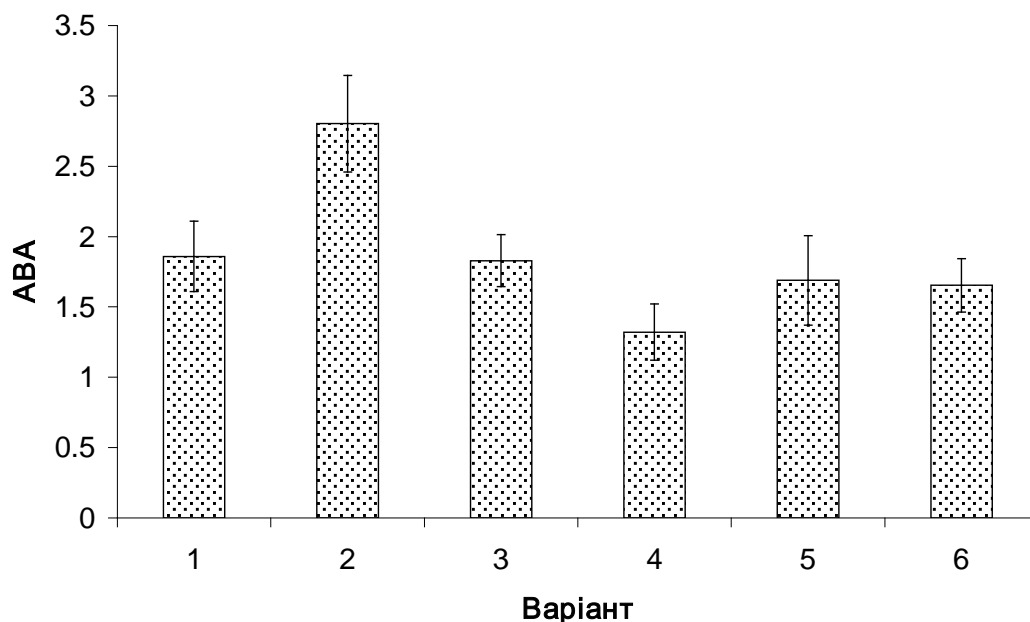


Рис. 1. Азотфіксувальна активність (АВА, мкмоль C₂H₄/(рослину · год) симбіотичних систем люцерна – *S. meliloti* при застосуванні білків із гемаглютинуючою активністю, фаза цвітіння: 1 – *S. meliloti*, 60% ПВ; 2 – *S. meliloti* + ГЛ, 60% ПВ; 3 – *S. meliloti* + ЛС, 60% ПВ; 4 – *S. meliloti*, 40% ПВ; 5 – *S. meliloti* + ГЛ, 40% ПВ; 6 – *S. meliloti* + ЛС, 40% ПВ

У період цвітіння відзначено зростання маси коренів рослин люцерни при використанні ГЛ за оптимального водозабезпечення (див. табл. 1).

Інокуляція рослин люцерни ризобіями, інкубованими з екстрактом гомологічних гемаглютинінів, призвела до наростання маси рослин у період бутонізації – цвітіння за 40% ПВ. При цьому у фазі цвітіння надземна маса люцерни за недостатнього водозабезпечення при застосуванні екстракту гемаглютинуючих білків насіння люцерни була на рівні контрольного варіанту за оптимального водозабезпечення. Таким чином, використання екстракту гемаглютинінів насіння люцерни нівелювало гальмівний вплив посухи на ріст надземної маси рослин.

У польових умовах встановлено, що передпосівна обробка насіння соєвим лектином теж покращувала ріст надземної маси люцерни (табл. 2) на фоні інокуляції *S. meliloti* 441, відзначено тенденцію до зростання даного показника за використання штаму Т17. При цьому суттєво збільшувалась і кількість бобів на рослині в 1,3–1,6 рази залежно від штаму-інокулянту.

Таблиця 1.

Вплив білків із гемаглютинуючою активністю на наростання вегетативної маси (г сухої речовини/рослину) люцерни, інокульованої *S. meliloti* 441 (вегетаційний дослід)

Варіант	Фаза розвитку рослин			
	Бутонізація–початок цвітіння		Цвітіння	
	маса кореня	надземна маса	маса кореня	надземна маса
<i>S. meliloti</i> , 60% ПВ	0,259 ± 0,023	0,283 ± 0,018	0,275 ± 0,019	0,339 ± 0,029
<i>S. meliloti</i> + ГЛ, 60% ПВ	0,150 ± 0,020	0,252 ± 0,024	0,348 ± 0,033	0,369 ± 0,034
<i>S. meliloti</i> + ЛС, 60% ПВ	0,149 ± 0,014	0,239 ± 0,021	0,269 ± 0,024	0,293 ± 0,025
<i>S. meliloti</i> , 40% ПВ	0,170 ± 0,017	0,197 ± 0,018	0,253 ± 0,023	0,267 ± 0,023
<i>S. meliloti</i> + ГЛ, 40% ПВ	0,213 ± 0,016	0,233 ± 0,019	0,267 ± 0,013	0,328 ± 0,025
<i>S. meliloti</i> + ЛС, 40% ПВ	0,212 ± 0,019	0,216 ± 0,020	0,233 ± 0,019	0,226 ± 0,019

Таблиця 2.

Вплив лектину насіння сої на надземну масу (г сирої речовини/м²) та формування бобів (шт./рослину) люцерни, інокульованої штамми *Sinorhizobium meliloti* Т17 та 441 (польовий дослід, цвітіння–формування бобів)

Варіант	Надземна маса	Кількість бобів
<i>S. meliloti</i> 441	334,1 ± 3,6	43,7 ± 2,5
<i>S. meliloti</i> 441 + ЛС	391,1 ± 7,1	56,0 ± 2,1
<i>S. meliloti</i> Т17	400,4 ± 8,1	38,5 ± 1,6
<i>S. meliloti</i> Т17 + ЛС	413,5 ± 10,9	61,5 ± 1,2

У процесі встановлення симбіотичних зв'язків між бобовими рослинами і бульбочковими бактеріями утворюються кореневі бульбочки, у яких зв'язується молекулярний азот. Згідно із лектиною гіпотезою, яка пояснює механізм інокуляції, розпізнавання бактеріями відповідної їм рослини-господаря відбувається за рахунок комплементарного зв'язування мікроорганізмів із рослинним лектином, що забезпечується полісахаридами ризобій. Дослідження із трансгенними рослинами (Diaz et al., 2000; van Rhijn et al., 2001) підтвердили участь лектинів у таких важливих симбіотичних процесах як адгезія бактерій до поверхні коренів рослин, інфікування корневих волосків та бульбочкоутворення. Очевидно, виявлене нами підвищення азотфіксувальної активності симбіотичних систем може бути пов'язане зі створенням умов, сприятливих для утворення і функціонування симбіозу, зокрема, змінами метаболізму ризобій під впливом екзогенного лектину. З літературних джерел відомо (Mody, Mody, 1987) про стимуляцію під впливом лектинів синтезу екстрацелюлярних і капсульних полісахаридів, що сприяє бульбочкоутворенню. На прикладі асоціативних систем пшениця – *Azospirillum brasilense* показано (Антонюк и др., 1997), що вплив лектинів може проявлятися також у активації ряду ферментів, у тому числі нітрогенази. У експериментах Маліченко та співавт. (Маліченко та ін., 2002) відзначено, що попередня інкубація ризобій із лектином модулює процеси формування і функціонування симбіозу, на основі чого зроблено висновок про участь цих білків не тільки як рецепторних молекул на перших етапах взаємодії ризобій із корінням рослини-господаря, але і як сигнальних молекул у подальшому формуванні та функціонуванні азотфіксуючої симбіотичної системи. При цьому виявлено стимуляцію росту сої за інокуляції

бульбочковими бактеріями, інкубованими з лектинами як специфічних, так і неспецифічних бобових рослин (сої, люпину, квасолі, гороху, канавалії).

Цілком можливо, що спостережувані в наших експериментах зміни у симбіотичних системах, особливо при застосуванні лектину для обробки насіння, могли бути викликані також безпосереднім впливом гемаглютининів на проростання насіння і подальший розвиток рослин. Такий стимулюючий ефект лектинів на проростання насіння та розвиток проростків було відзначено, зокрема, у експериментах із соєю (Маменко, 2005). Що ж стосується ефективності застосування лектину за стресових умов, то виявлені нами особливості можуть бути спричинені лектин-індукованими перебудовами гормональної системи рослини. Так, було показано (Кильдибекова и др., 2004), що попередня обробка коренів пшениці АЗП попереджала інгібування ростових показників (мітотичний індекс і площа клітин у зоні розтягнення) під впливом сольового стресу, а обробка після стресу сприяла відновленню росту. При цьому було виявлено, що АЗП попереджав різкі зміни кількості АБК та ІОК під впливом стресу в першому випадку і прискорював накопичення ІОК у другому. Підвищення мітотичного індексу під впливом екзогенного АЗП при стресі, на думку дослідників, свідчить про можливий антагонізм АЗП з АБК, що проявляє стосовно ростових процесів переважно інгібуючі властивості. На основі отриманих даних було зроблено припущення, що функції лектину полягають не стільки в забезпеченні фізіологічної дії АБК при стресах, скільки у інгібуванні її та обмеженні у часі. Інші дослідники (Безрукова и др., 2011) також спостерігали зміни у гормональному балансі рослин під впливом екзогенних лектинів, – накопичення активаторів росту (ІОК й цитокінінів) і зробили висновок, що рістстимулюючий ефект є характерною властивістю для фітолектинів, однак вона проявляється на своїх, специфічних, рослинних об'єктах (АЗП впливає на клітини пшениці і близькоспоріднених злаків, а ФГА – на клітини квасолі). У наших експериментах ми спостерігали стимулюючий ефект на рослини люцерни як гомологічних гемаглютининів, так і лектину сої. Можливо, це обумовлено особливостями будови молекул цих білків, і, відповідно, схожістю їх властивостей. Але для підтвердження даного припущення необхідне дослідження і розшифрування структури гемаглютинуючих білків насіння люцерни.

Отже, у результаті проведених досліджень виявлено, що інокуляція насіння люцерни ризобіями *S. meliloti* 441, попередньо інкубованими з насінневими гемаглютининами люцерни, посилює азотфіксувальну активність корневих бульбочок, стимулює ріст вегетативної маси рослин і дозволяє підвищити стійкість симбіотичних систем до недостатнього водозабезпечення. Показано можливість використання соєвого лектину для активізації процесу засвоєння молекулярного азоту симбіотичними системами люцерна – *Sinorhizobium meliloti* за нестачі вологи, а також стимулювання росту надземної маси та процесу утворення бобів на люцерні у польових умовах.

Список літератури

- Антонюк Л.П., Фомина О.Р., Игнатов В.В. Влияние лектина пшеницы на метаболизм *Azospirillum brasilense*: индукция биосинтеза белков // Микробиология. – 1997. – 66, № 2. – С. 172–178. / Antonyuk L.P., Fomina O.R., Ignatov V.V. Vliyanie lektina pshenitsyi na metabolizm *Azospirillum brasilense*: induktsiya biosinteza belkov // Mikrobiologiya. – 1997. – 66, # 2. – S. 172–178.
- Бабоша А.В. Индуцибельные лектины и устойчивость растений к патогенным организмам и абиотическим стрессам // Биохимия. – 2008. – вып. 7 (73). – С. 1007–1022. / Babosha A.V. Indutsibelnyie lektiny i ustoychivost rasteniy k patogennyim organizmam i abioticheskim stressam // Biohimiya. – 2008. – vyip. 7 (73). – S. 1007–1022.
- Безрукова М.В., Лубянова А.Р., Фатхутдинова Р.А. Участие лектинов пшеницы и фасоли в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней разных растений // Физиология растений. – 2011. – 58, № 1. – С. 144–151. / Bezrukova M.V., Lubyanova A.R., Fathutdinova R.A. Uchastie lektiniv pshenitsyi i fasoli v regulyatsii deleniya kletok apikalnoy meristemyi korney raznyih rasteniy // Fiziologiya rasteniy. – 2011. – 58, # 1. – S. 144–151.
- Веселовська Л.І., Михалків Л.М., Коць С.Я. Вплив екзогенного лектину на ефективність симбіозу *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* в умовах посухи // Физиология растений и генетика. – 2013. – 45, № 4. – С. 319–326. / Veselovska L.I., Mykhalkiv L.M., Kots S.Ya. Vplyv ekzohennoho lektynu na efektyvnist' symbiozu *Glycine max* – *Bradyrhizobium japonicum* v umovakh posukhy // Fyziologhiya rasteniy y henetyka. – 2013. – 45, # 4. – S. 319–326.
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с. / Dosphehov B.A. Metodika polevogo opyta. – M.: Agropromizdat, 1985. – 352 s.
- Кильдибекова А.Р., Безрукова М.В., Авальбаев А.М. и др. // Цитология. – 2004. – 46. – С. 312–315. / Kildibekova A.R., Bezrukova M.V., Avalbaev A.M., Fathutdinova R.A., Shakirova F.M. // Tsitologiya. – 2004. – 46. – S. 312–315.
- Кириченко О.В. Біологічна активність екзогенних рослинних лектинів при утворенні та функціонуванні фітобактеріальних асоціацій // Вісник ХНАУ. Серія Біологія. – 2011. – вип. 2 (23). – С. 46–59. / Kyrychenko

O.V. Biolohichna aktyvnist' ekzohennykh roslynnykh lektyniv pry utvorenni ta funktsionuvanni fitobakterial'nykh asotsiatsiy // Visnyk KhNAU. Seriya Biolohiya. – 2011. – вип. 2 (23). – С. 46–59.

Лубянова А.Р., Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М. Ростстимулирующий и защитный эффекты фитогемагглютина на растения фасоли // Влияние фитогемагглютина на солеустойчивость проростков // Вісник ХНАУ. Серія Біологія. – 2009. – вип. 2 (17). – С. 40–46. / Lubyanova A.R., Bezrukova M.V., Fathutdinova R.A., Shakirova F.M. Roststimuliruyuschiy i zaschitnyy efekty fitogemagglyutinina na rasteniya fasoli // Vliyaniye fitogemagglyutinina na soleustoychivost prorostkov // Вісник ХНАУ. Серія Біологія. – 2009.

Маліченко С.М., Даценко В.К., Маменко П.М., Коць С.Я. Участь лектинів специфічних і неспецифічних до бульбочкових бактерій бобових рослин у формуванні і функціонуванні азотфіксуючого симбіозу // Наукові записки Тернопільського педуніверситету. Серія Біологія. – 2002. – № 3 (18). – С. 49–57. / Malichenko S.M., Datsenko V.K., Mamenko P.M., Kots' S.Ya. Uchast' lektyniv spetsyfichnykh i nespetsyfichnykh do bul'bochkovykh bakteriy bobovykh roslyn u formuvanni i funktsionuvanni azotfiksuuyuchoho symbiozu // Naukovi zapysky Ternopil's'koho peduniversitytetu. Seriya Biolohiya. – 2002. – # 3 (18). – С. 49–57.

Маменко П.М. Лектини бобових і їх фізіологічна роль у формуванні і функціонуванні симбіозу. Автореферат дис... канд.біол.наук: 03.00.12. – К., 2005. – 21 с. / Mamenko P.M. Lektyny bobovykh i yikh fiziolohichna rol' u formuvanni i funktsionuvanni symbiozu. Avtoreferat dys... kand.biol.nauk: 03.00.12. – К., 2005. – 21 с.

Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журнал общей биологии. – 2007. – 68, № 2. – С. 109–125. / Shakirova F.M., Bezrukova M.V. Sovremennyye predstavleniya o predpolagaemykh funktsiyah lektinov rasteniy // Zhurnal obschey biologii. – 2007. – 68, # 2. – С. 109–125.

De Hoff P.L., Brill L.M., Hirsch A.M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense // Mol. Genet. Genomics. – 2009. – 282. – P. 1–15.

Diaz C.L., Spaink H.P., Kijne J.W. Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover root, transformed with the pea lectin gene // Mol. Plant Microbe Interact. – 2000. – Vol. 13. – P. 268–276.

Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene – ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – 43, N 8. – P. 1185–1207.

Melnykova N.M., Mykhalkiv L.M., Mamenko P.M., Kots S.Ya. The areas of application for plant lectins // Biopolymers and Cell. – 2013. – 29, N5. – P. 357–366.

Mody B., Mody V. Peanut agglutinin induced alterations in capsular and extracellular polysaccharide synthesis and ex-planta nitrogenase activity of cowpea rhizobia // J. Biol. Sci. – 1987. – 12, N 3. – P.289–296.

van Rhijn P., Fujishige N.A., Lim P.O., Hirsh A.M. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 126. – P. 133– 34.

Представлено: В.П. Патика / Presented by: V.P. Patyka

Рецензент: В.В. Жмурко / Reviewer: V.V. Zhmurko

Подано до редакції / Received: 21.10.2014