

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© С.А. Аленькина, В.Е. Никитина, 2014

УДК 579.22

С.А. Аленькина, В.Е. Никитина

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ, ИНДУЦИРОВАННОЕ ЛЕКТИНАМИ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Цель. Исследование возможного индуцирующего воздействия лектина ассоциативных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 на сигнальные системы растений.

Материалы и методы. Использованы различные методы определения содержания сигнальных интермедиатов в клетках корней проростков пшеницы.

Результаты. Результаты показали, что лектин способен оказывать влияние на компоненты сигнальных систем корней проростков пшеницы - регулировать содержание оксида азота, диацилглицерина, салициловой кислоты, а также модифицировать активность супероксиддисмутазы и липоксигеназы.

Заключение. Полученные результаты дают основание рассматривать лектин *Azospirillum brasilense* Sp7 в качестве сигнальной молекулы, вовлеченной во взаимодействие ризобактерий с корнями растений.

Ключевые слова: ризосфера, ассоциативная азотфиксация, лектины азоспирилл, корни проростков пшеницы, сигнальные молекулы.

S.A. Alen'kina, V.E. Nikitina

CHANGES IN METABOLIC ACTIVITY OF THE ROOTS OF WHEAT SEEDLINGS, INDUCED LECTINS GROWTH STIMULATING RHIZOBACTERIA

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

Objective. Investigate possible inductive effects of the lectin from *Azospirillum brasilense* Sp7, an associative nitrogen-fixing bacterium, on the plant cell signal systems.

Materials and methods. We used a variety of methods to determine the content of signal intermediates in the cells of wheat root seedlings.

Results. The lectin acted on signal system components in wheat seedling roots by regulating the contents of nitric oxide, diacylglycerol, and salicylic acid, as well as by modifying the activities of superoxide dismutase and lipoxygenase.

Conclusions. The results of the study suggest that the *Azospirillum brasilense* Sp7 lectin acts as a signal molecule involved in the interaction of growth-promoting rhizobacteria with plant roots.

Key words: Rhizosphere, associative nitrogen fixation, *Azospirillum*, lectins, wheat roots, signal molecules

Введение

Ассоциативные бактерии рода *Azospirillum* занимают важное место среди микроорганизмов, обладающих потенциалом стимулировать рост и развитие растений. Растения получают непосредственную выгоду от способности микроорганизмов к продукции фитогормонов, азотфиксации, солиubilизации фосфатов, улучшению водно-минерального статуса, а также продукции ими ряда соединений, увеличивающих мембранную активность растительных клеток и пролиферацию тканей корневой системы. В результате такого симбиоза бактерии уменьшают влияние стрессоров на растения и препятствуют их заселению другими многочисленными фитопатогенами [1, 2]. К механизмам опосредованного растением биоконтрольного эффекта относится способность микроорганизмов индуцировать у растений защитные реакции, направленные на повышение их устойчивости.

В.Е. Никитина с соавт. (1996) показали присутствие на поверхности клеток азоспирилл лектинов, вовлеченных в бактериальную адгезию к корням [3]. С поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7 был изолирован лектин, являющийся гликопротеином с молекулярной массой 36 кДа и специфичностью к L-фукозе (1.87 mM) и D-галактозе (20 mM). Лектин оказывал воздействие на активность α -, β -глюкозидаз и β -галактозидазы в мембране и фракции апопластов корней проростков пшеницы [4].

Целью данной работы явилось выявление сигнальных функций лектина *A. brasilense* Sp7 в ответных реакциях растений.

Материалы и методы.

Объектом исследования служил штамм азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7, полученный из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (г. Москва).

Выделение лектина с поверхности клеток проводили методом, описанным ранее [5]. Количество белка определяли по методу Бредфорд [6].

Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Саратовская 29» (ГНУ НИИ Сельского хозяйства Юго-Востока РСХА, Саратов, Россия) были поверхностно стерилизованы в 70% (v/v) этаноле 1 мин, отмыты стерильной водой. Для получения корней проростков семена были выращены в асептических условиях в чашках Петри на стерильной дистиллированной воде.

Количество NO определяли по нарастанию метаболитов – нитритов (NO₂⁻) в гомогенате корней с помощью реактива Грисса [7].

Количество диацилглицерина (ДАГ) определяли газожидкостной хроматографией. Для получения липидных экстрактов корней проростков пшеницы применяли методы Фолча и Блайя-Дайера. Идентификацию компонентов липидов осуществляли методом ТСХ с использованием силикагеля в системе гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (55:45:1 по объему), качественными реакциями и сравнением хроматографической подвижности образцов со стандартами [8].

Определение количества свободной и связанной форм салициловой кислоты (СК) проводили согласно [9].

Активность липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) в гомогенатах корней определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве субстрата линолевую кислоту [10].

Определение активности супероксиддисмутазы – СОД (ЕС 1.15.1.11) проводили по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН [11].

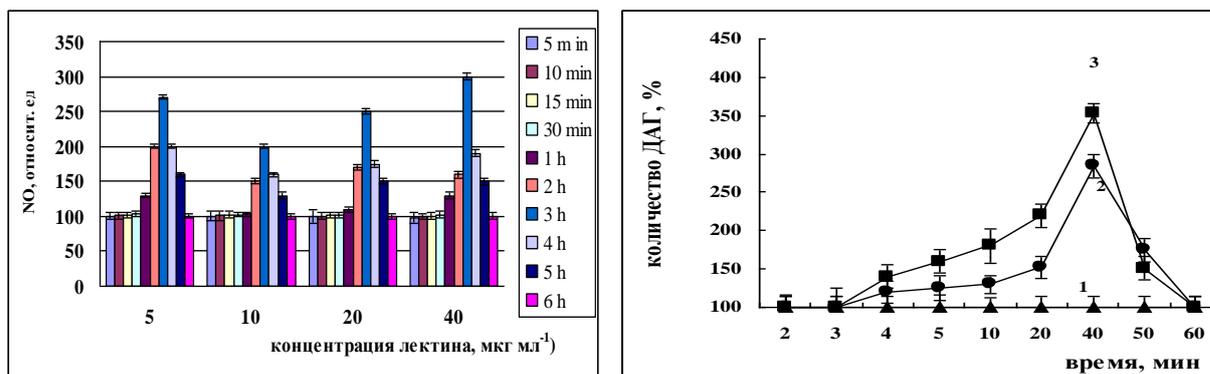
Опыты проводили в 3-кратной биологической и 5-кратной аналитической повторностях. Цифровой материал обработан статистически с помощью программы «Анализ данных электронных таблиц Microsoft Excel».

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных опытов показано, что прединкубация с лектином приводила к увеличению содержания оксида азота в корнях проростков для всех проверенных концентраций лектина (рис. 1а).

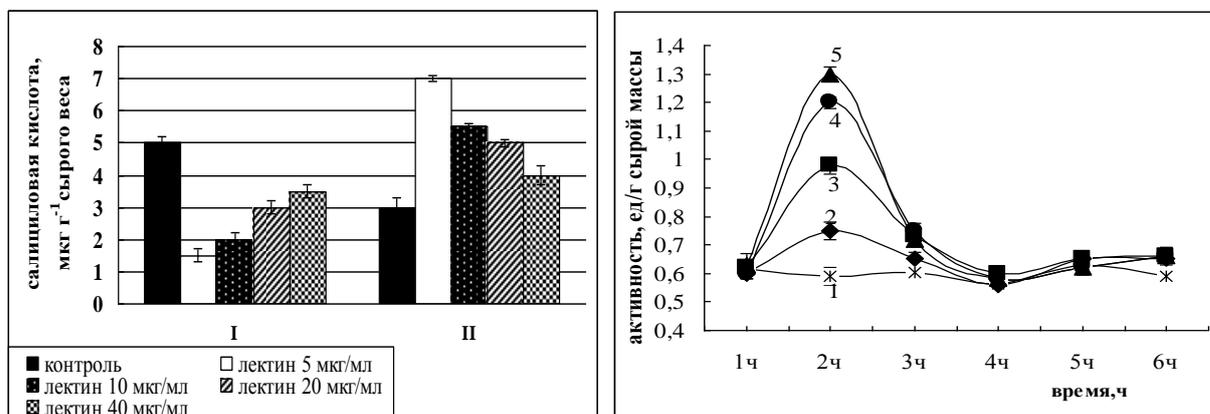
Самой эффективной была концентрация 40 мкг/мл. Эффект был отмечен через 1 ч воздействия и достигал максимума через 3 ч, а затем снижался до контрольного уровня.

Лектин *A. brasilense* Sp7 только в одной из проверенных концентраций – 40 мкг/мл вызывал индукцию синтеза ДАГ в корнях проростков уже через 3 мин совместной инкубации. Максимальное значение было зарегистрировано после 40 мин инкубации, после чего происходило резкое снижение синтеза и к 60 мин количество ДАГ соответствовало контрольному уровню. Кальций – основной активатор среди ионов, способных влиять на активность фосфолипазы С. При внесении в среду инкубации корней с лектином раствора CaCl₂ (1мМ) происходило усиление эффекта, оказываемого лектином (рис. 1б).



а. б.
 Рис.1. Содержание оксида азота (NO) (а) и ДАГ (б) в корнях проростков пшеницы после инкубации с лектином (40 мкг/мл) *A. brasilense* Sp7. Для (б): 1 – контроль – корни; 2 – лектин+корни; 3 – лектин+корни+CaCl₂.

В ходе экспериментов определяли количество свободной и конъюгированной форм салициловой кислоты (рис. 2а). Полученные результаты показали, что содержание СК изменялось лишь через час инкубации корней с лектином. Лектин во всех исследованных концентрациях вызывал увеличение содержания свободной и уменьшение конъюгированной форм СК. Максимум увеличения свободной СК отмечался при концентрации лектина – 5 мкг/мл. Что касается связанной формы СК, то с увеличением концентрации происходило снижение оказываемого лектином эффекта.



а. б.
 Рис.2. Влияние лектина *A. brasilense* Sp7 на содержание конъюгированной (I) и свободной (II) форм СК (а) и на активность супероксиддисмутазы (б) корней проростков пшеницы. 1 – контроль – корни; 2-5 – корни+лектины в концентрации: 5 (2), 10 (3), 20 (4), 40 (5) мкг/мл.

Для всех изученных концентраций лектина (5-40 мкг/мл) было отмечено увеличение активности СОД после 2 ч инкубации с корнями проростков, причем наибольший эффект был отмечен при концентрациях 20 и 40 мкг/мл

(рис. 2б).

Определение активности липоксигеназы в корнях после инкубации с лектином показало, что активирующее воздействие наблюдалось при концентрации лектина – 5 мкг/мл (рис. 3).

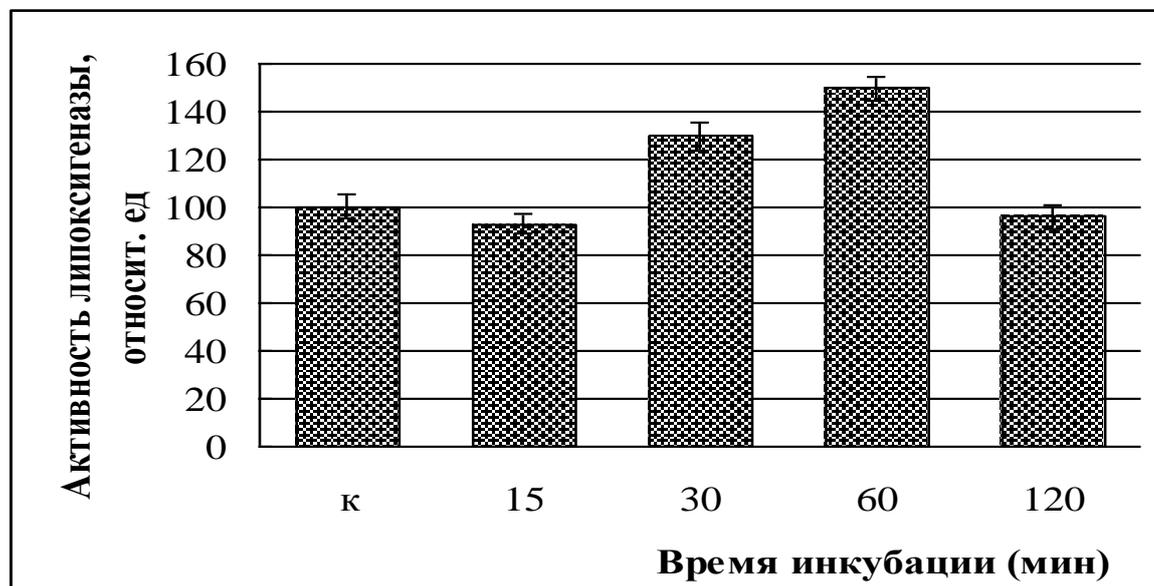


Рис. 3. Влияние лектина *A. brasilense* Sp7 на активность липоксигеназы корней проростков пшеницы. к – контроль – корни, 100%; 15, 30, 60, 120 – время инкубации, мин.

После 30 и 60 мин инкубации корней с лектином активность фермента возрастала на 30 и 50%, соответственно. При увеличении времени экспозиции корней с лектином активность фермента снижалась до контрольного уровня.

Заключение.

Таким образом, в результате проведенного исследования показана способность лектина *A. brasilense* Sp7 вызывать индукцию NO-синтазной, НАДФН-оксидазной, Са-фосфоинозитольной, липоксигеназной сигнальных систем корней пшеницы в процессе узнавания на начальных стадиях формирования растительно-бактериальной ассоциации, что в сочетании с ростстимулирующим эффектом бактерий способствует формированию устойчивости и продуктивности растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 2004. 50: 521–577.

2. Baldani J.I., Baldani V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Bras. Cienc. 2005. 77: 549–579.
3. Никитина В.Е., Аленькина С.А., Пономарева Е.Г. и др. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы. Микробиология. 1996. 65: 165–170.
4. Alen'kina S.A., Payusova O.A., Nikitina V.E. Effect of *Azospirillum* lectins on the activities of wheat-root hydrolytic enzymes. Plant and Soil. 2006. 283: 147–151.
5. Аленькина С.А., Петрова Л.П., Никитина В.Е. Получение и характеристика мутанта *Azospirillum brasilense* Sp7 по лектиновой активности. Микробиология. 1998. 67: 782–787.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976. 72: 248–254.
7. Schulz K., Kerber S., Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂ - in aqueous and protein-containing samples. J. Nitric Oxide. 1999. 3: 225–234.
8. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322с.
9. Palva T.K., Hurting M., Saindrmann P. et al. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in Tobacco. Mol. Plant Microb. Interact. 1994. 7: 356–363.
10. Axelrod B., Cheesebrough T.M., Laakso S. Lipoxygenase from soybeans. EC 1.13.11.12 linoleate: oxygen oxidoreductase. Methods. Enzymol. 1981. 71: 441–451.
11. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress plants. J. Exp. Bot. 2002. 53. 1331–1341.

Поступила 26.08.2014

(Контактная информация: Аленькина Светлана Александровна – к.б.н, старший научный сотрудник Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН; адрес: 410049, г. Саратов, пр-т Энтузиастов, 13; телефон (8452) 970444; E-mail: alenkina@ibppm.ru)