

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН



2015 * № 3

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

© С.А. Аленькина, В.Е. Никитина, 2015

УДК 579.22

С.А. Аленькина, В.Е. Никитина

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ЗАЩИТНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ

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

Цель. Выявление сигнальных функций лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3 (в их сравнении) в ответных реакциях растений.

Материалы и методы. Были использованы спектрофотометрические методы, иммуноферментный анализ (ELISA), тонкослойная хроматография, газо-жидкостная хроматография для определения содержания сигнальных интермедиатов в клетках корней проростков пшеницы.

Результаты. Результаты показали, что лектины способны в различной степени оказывать влияние на компоненты сигнальных систем корней проростков пшеницы: регулировать содержание цАМФ, оксида азота, диацилглицерина, салициловой кислоты, а также модифицировать активность супероксиддисмутазы и липоксигеназы.

Заключение. Результаты дают основание для рассмотрения лектинов азоспирилл в качестве индукторов сигнальных систем корней проростков пшеницы, так как при их воздействии происходит возникновение нескольких потоков первичных сигналов. Полученные данные имеют и общебиологическое значение, так как лектины содержатся во всех живых организмах и большинство функций лектинов остаются не вполне выясненными.

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

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

EFFECT OF LECTINS FROM THE ASSOCIATIVE BACTERIUM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS INVOLVED IN PLANT PROTECTIVE-ADAPTIVE RESPONSES

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

Objective. The aim of this work was to comparatively elucidate signal functions in the lectins of *Azospirillum brasilense* Sp7 and Sp7.2.3 during plant responses.

Materials and methods. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), spectrophotometry, and thin-layer and gas-liquid chromatography were used to determine the content of signal intermediates in the cells of wheat root seedlings.

Results. The results showed that the lectins could have effects of varying degree on the signal system components in wheat seedling roots by regulating the contents of cAMP, nitric oxide, diacylglycerol, and salicylic acid, as well as modifying the activities of superoxide dismutase and lipoxygenase.

Conclusions. The obtained results give grounds to consider *Azospirillum* lectins to be inducers of the signal systems of wheat seedling roots, because under their action, the emergence of several flows of primary signals was observed. The obtained data are also of general biological significance, because lectins are present in all living organisms and most lectin functions remain to be fully elucidated.

Keywords: 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 азотфиксации, продукции фитогормонов, солиubilизации фосфатов, улучшению водного и минерального статуса, синтеза ряда соединений, которые увеличивают мембранную активность и пролиферацию тканей корневой системы, а также уменьшают влияние стрессоров на растение и осуществляют контроль развития многочисленных фитопатогенов [1-3]. К механизмам опосредованного растением биоконтрольного эффекта относится способность индуцировать у растений защитные реакции, направленные на повышение устойчивости. Сигнальными молекулами, запускающими каскад защитных реакций, могут быть салициловая кислота, бактериальные липополисахариды, сидерофоры.

Многие азоспириллы не способны внедряться в клетки растения, и это предполагает, что бактерии способны к образованию сигнальных молекул, которые проникают через растительную клеточную стенку и узнаются мембранными рецепторами растения. Это взаимодействие инициирует цепь событий, приводящих к изменению метаболизма растения. Ответ растений на клеточном уровне может служить индикатором взаимодействия растений с бактериями, опосредованный бактериальными молекулярными сигналами. Известно, что связывание клеточных рецепторов *A. brasilense* Sp245 с агглютинином зародышей пшеницы (АЗП) вызывало изменения в метаболизме бактериальной клетки: повышало азотфиксацию, выделение ионов аммония, синтез индолилуксусной кислоты (ИУК), изменяло соотношение кислых фосфолипидов мембраны. АЗП может функционировать как сигнальная молекула в ассоциации *Azospirillum*-растение [4].

В то же время известно, что некоторые штаммы *Azospirillum* способны к продукции различных лектинов *in vitro* [5]. В.Е. Никитина с соавт. (1996) показала присутствие на поверхности клеток азоспирилл лектинов, вовлеченных в бактериальную адгезию к корням [6]. 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 мутантного штамма *A. brasilense* Sp7.2.3 имел идентичную лектину родительского штамма молекулярную массу и углевод-

ную специфичность, но отличался антигенными свойствами [7]. Было показано, что эти белки проявляют различную функциональную активность. Лектины с различной эффективностью оказывали воздействие на активность α -, β -глюкозидаз и β -галактозидазы в мембране и фракции апопластов корней проростков пшеницы [2].

Целью данной работы явилось выявление сигнальных функций лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3 (в их сравнении) в ответных реакциях растений.

Материалы и методы

Объектом исследования служили два штамма азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7, полученный из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (г. Москва), и его мутант, дефектный по лектиновой активности – *A. brasilense* Sp7.2.3 [7].

Выделение лектина с поверхности клеток проводили методом, описанным ранее [7]. Количество белка определяли по методу М.М. Bradford [8].

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.

Определение количества цАМФ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) [9]. Корни выдерживали в растворах лектинов в концентрации 40 мкг/мл; в отдельной серии экспериментов – растворах лектинов, содержащих 0.1 mM CaCl₂. Результат ИФА определяли как выраженную в процентах разницу значений оптической плотности, полученных для опытных (инкубированных в растворе лектина) и контрольных (необработанных) корней.

Количество NO определяли по нарастанию метаболитов – нитритов (NO₂) в гомогенате корней с помощью реактива Грисса, состоящего из равных объемов 0.3% сульфаниловой кислоты и 0.5% α -нафтиламина. После 10 мин контакта определялась оптическая плотность при 540 нм [10].

Количество цитруллина определяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ). Гомогенат корней проростков подвергали ТСХ на силикагеле 60А («Merck», Germany) в системе растворителей, содержащей н-бутанол, уксусную кислоту и воду (4:1:1 по объему). Хроматограммы окрашивали раствором нингидрина [11] и идентифицировали цитруллин с помощью чистого коммерческого препарата. Пятна вырезали, элюировали и проводили ко-

личественное определение цитруллина при 570 нм.

Определение количества диацилглицерина (ДАГ) проводили следующим образом. Для получения липидных экстрактов корней проростков пшеницы применяли методы J. Folch et al. [12] и E.G. Blight, W.J. Dyer [13]. 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 [14]. Количество ДАГ определяли газожидкостной хроматографией. Метилирование проводили согласно [15]. Хроматографирование осуществляли на газовом хроматографе Shimatzu GH-2010 (Япония) с использованием капиллярной колонки Eguity-1 (Supelco, USA) длиной 30 м и диаметром 0.32 мм; скорость потока гелия – 34 мл/мин. Температура испарителя – 270°C, детектора – 270°C. Идентификацию ДАГ проводили по времени удерживания, сравнивая пики в образцах со стандартом.

Активность липоксигеназы (КФ 1.13.11.12) в гомогенатах корней определяли спектрофотометрическим методом, используя в качестве субстрата линолевую кислоту [16].

Для определения количества свободной и связанной форм салициловой кислоты (СК) 1 г корней был тщательно отмыт дистиллированной водой и фиксирован горячим 96%-ным этанолом. Корни гомогенизировали, затем СК экстрагировали из корней 80%-ным кипящим этанолом. Экстракт был разделен на две части для получения свободной и связанной форм СК [17]. Определение содержания СК проводили на газовом хроматографе Shimatzu GH-2010 (Япония) с использованием колонки Eguity-1 (Supelco) при температуре 200°C.

Для определения активности фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ) (КФ 4.3.1.5) фермент экстрагировали из корней 0.1 М боратным буфером с pH 8.8 при 4°C в течение 30 мин при соотношении масса:объем 1:17. Реакционная смесь состояла из 0.1 мкл ферментного препарата и 0.4 мкл боратного буфера pH 8.8, содержащего 12 mM L-фенилаланина. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Активность фермента определяли спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности при 290 нм. Активность ФАЛ выражали в единицах оптической плотности ($\Delta E/g$ сырой массы) [18].

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) (ЕС 1.15.1.11) корни гомогенизировали в 0.15 М фосфатном буфере (pH 7.8). Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 7000g. Активность фермента определяли

по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН [19].

Опыты проводили в трехкратной биологической и пятикратной аналитической повторностях. Цифровой материал обработан статистически с помощью программы «Анализ данных электронных таблиц Microsoft Excel».

Результаты и обсуждение

Дана оценка влияния лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3 на содержание цАМФ в гомогенатах корней проростков пшеницы, инкубированных 15, 30 и 60 мин в растворах бактериальных лектинов в концентрации 40 мкг/мл. Методом ИФА было установлено, что лектин родительского штамма (в отсутствие Ca^{2+}) вызывал снижение количества циклонуклеотида в растительных клетках. При этом результаты, полученные для изучаемых временных интервалов инкубации корней с препаратами лектинов, достоверно не отличались – ингибирование составляло 30, 25 и 27% для 15, 30 и 60 мин инкубации соответственно (рис. 1).

Лектин мутантного штамма действовал таким же образом, однако выраженность эффекта была несколько ниже по сравнению с лектином родительского штамма (рис. 1).

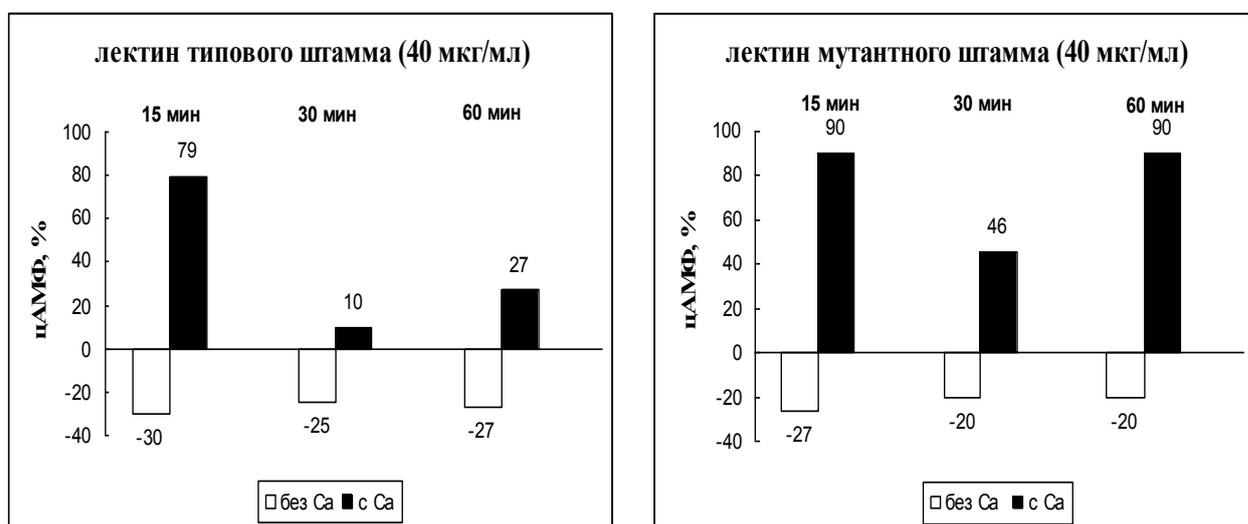


Рис.1. Изменение содержания цАМФ в корнях проростков пшеницы под влиянием лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3.

При всех изученных концентрациях обоих лектинов наблюдалось увеличение активности СОД после 2 ч инкубации с корнями проростков, причем наибольший эффект отмечен для родительского штамма при концентрациях 20 и 40 мкг/мл и для мутантного – при 40 мкг/мл. Уровень стимулирующего эффекта был для лектина мутантного штамма значительно

ниже по сравнению с лектином родительского штамма (рис. 2).

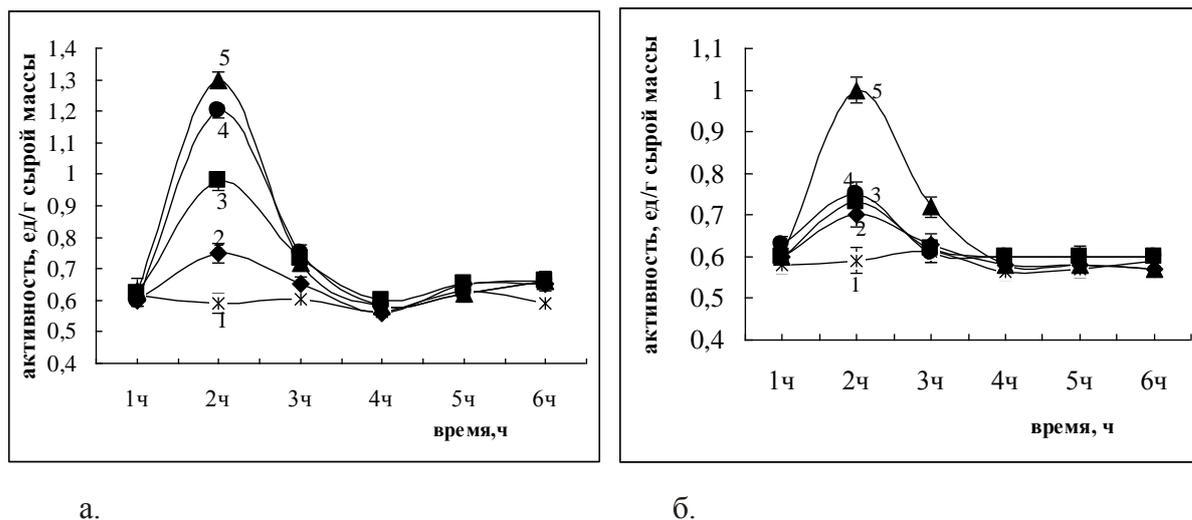


Рис.2. Влияние лектинов *A. brasilense* Sp7 (а) и Sp7.2.3 (б) на активность супероксиддисмутазы корней проростков пшеницы. 1 – контроль-корни; 2-5 – корни+лектины в концентрации – 5(2), 10(3), 20(4), 40(5) мкг/мл.

Кроме того, показано, что преинкубация с лектинами как родительского, так и мутантного штаммов приводила к увеличению содержания оксида азота в корнях проростков для всех проверенных концентраций лектинов. Самой эффективной в обоих случаях оказалась концентрация – 40 мкг/мл. Для обоих лектинов эффект был отмечен через 1 ч воздействия, достигал максимума через 3 ч, затем снижался до контрольного уровня. В то же время лектин родительского штамма проявлял большую эффекторную активность в отличие от другого изучаемого лектина (рис. 3).

В растениях может быть несколько источников образования NO, и лишь некоторые из них могут регулироваться через сигнальные пути [20]. Одним из таких путей является реакция, катализируемая синтазой оксида азота по следующей схеме: α -аргинин + O₂ + НАДФН → α -цитруллин + оксид азота.

Для проверки предположения, что лектины способны индуцировать образование оксида азота таким способом, было проведено определение количества цитруллина в корнях после экспозиции в растворах лектинов самой эффективной концентрации – 40 мкг/мл. В результате было показано, что количество цитруллина в растительной клетке возрастало с той же закономерностью, что и в случае с оксидом азота (рис. 3).

Тот факт, что инкубация с лектинами приводила одновременно к увеличению содержания оксида азота и цитруллина в корнях, позволяет сделать вывод, что лектины способны активировать NO-сигнальную систему растений.

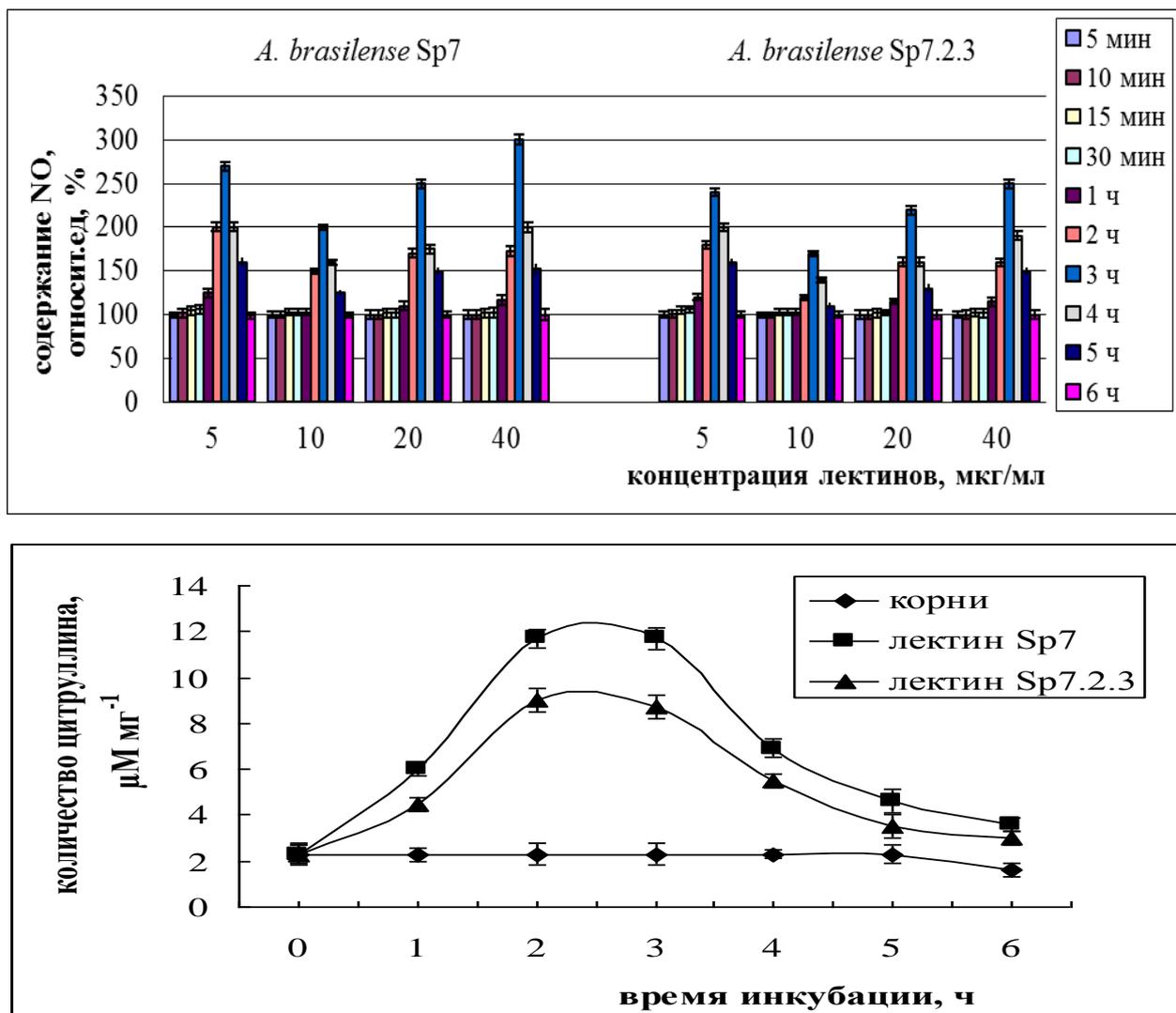
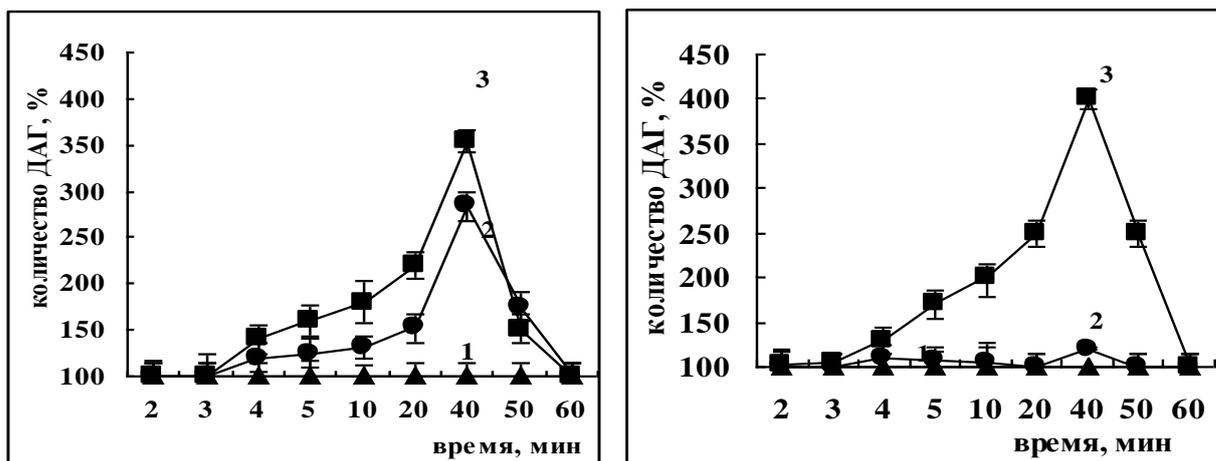


Рис. 3. Содержание оксида азота (NO) и цитруллина в корнях проростков пшеницы после инкубации с лектином *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3 (при определении цитруллина концентрация лектина – 40 мкг/мл).

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, а максимальные значения зарегистрированы на 40 мин инкубации, после чего происходило резкое снижение синтеза и к 60 мин количество ДАГ соответствовало контрольному уровню. Лектин мутантного штамма ни в одной из концентраций не проявлял индуктивной активности (рис. 4). Кальций – основной активатор среди ионов, способных влиять на активность фосфолипазы С [21]. При внесении в среду инкубации корней с лектинами раствора CaCl_2 (1мМ) происходило усиление эффекта, оказываемого лектином родительского штамма, и индукция образования ДАГ лектином мутантного штамма.

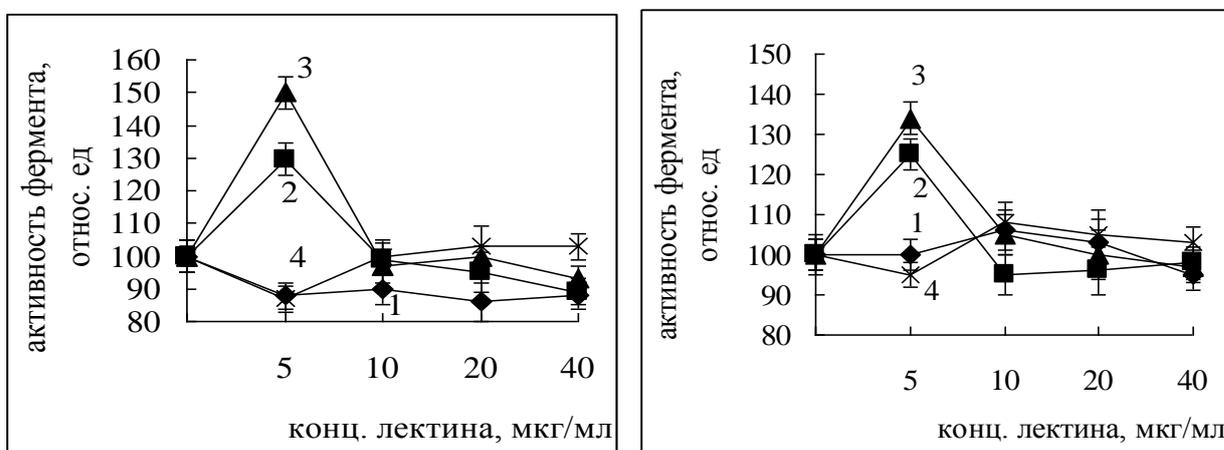


а.

б.

Рис. 4. Содержание ДАГ в корнях проростков пшеницы после инкубации с лектинами *A. brasilense* Sp7(а) и *A. brasilense* Sp7.2.3(б). 1 – контроль – корни; 2 – лектины + корни; 3 – лектины + корни + CaCl₂. Концентрация лектинов – 40 мкг/мл.

Одним из механизмов образования сигнальных продуктов превращения липидов является липоксигеназная сигнальная система, стартовым ферментом которой является липоксигеназа. Определение активности фермента в корнях после инкубации с лектинами показало, что активирующее воздействие наблюдалось при концентрации обоих лектинов – 5 мкг/мл (рис. 5).



а.

б.

Рис. 5. Влияние лектинов *A. brasilense* Sp7 (а) и Sp7.2.3 (б) на активность липоксигеназы корней проростков пшеницы. 1–контроль-корни, 100%; 2-4 – корни+лектины, время инкубации – 30(2), 60(3), 120(4) мин.

После 30 и 60 мин инкубации корней с лектином родительского штамма активность фермента возрастала на 30 и 50%, соответственно, а в корнях, обработанных лектином мутантного – на 25 и 34%. При увеличении времени экспозиции корней с лектинами активность фермента снижалась до кон-

трольного уровня.

При изучении содержания салициловой кислоты (СК) в растительной клетке при воздействии лектинов определяли количество свободной и конъюгированной форм. Полученные результаты показали, что содержание СК изменялось лишь через час инкубации корней с лектинами. Оба лектина во всех исследованных концентрациях вызывали увеличение содержания свободной и уменьшение конъюгированной форм СК (рис. 6).

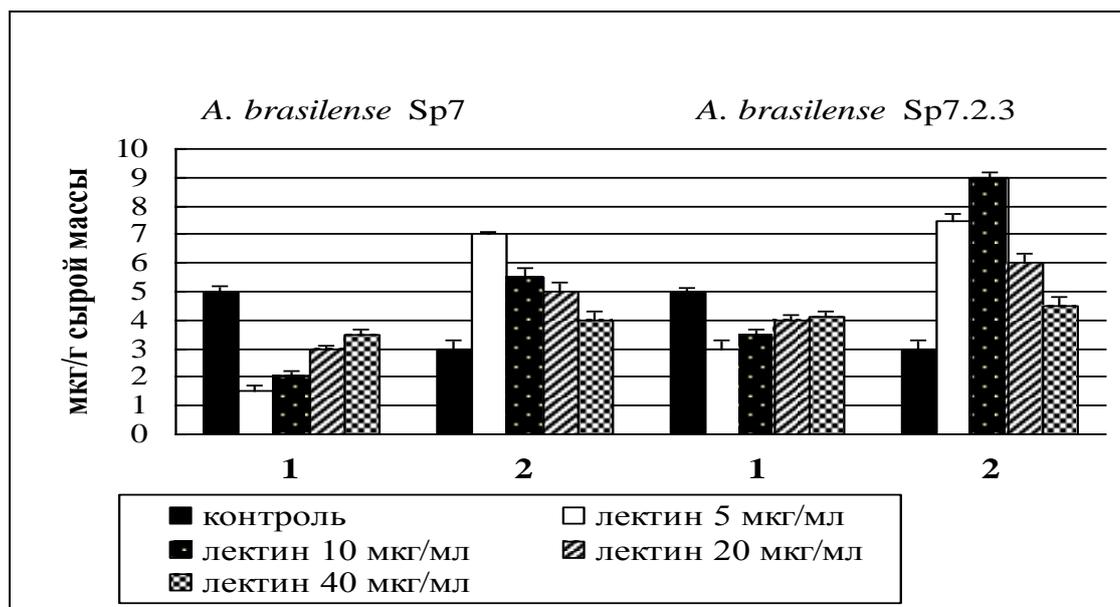


Рис. 6. Содержание конъюгированной (1) и свободной (2) форм СК в корнях проростков пшеницы в контроле и при предобработке лектинами *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3.

Максимум увеличения свободной СК отмечался при концентрации лектина родительского штамма 5 мкг/мл, а мутантного - 10 мкг/мл. Для лектина родительского штамма наблюдалось снижение эффекта с увеличением концентрации лектина. Что касается связанной формы СК, то для обоих штаммов *A. brasilense* с увеличением концентрации происходило снижение оказываемого лектинами эффекта. Таким образом, лектин мутантного штамма *A. brasilense* по сравнению с лектином родительского штамма наиболее эффективно увеличивал количество свободной СК и менее эффективно изменял содержание связанной формы СК.

Образование свободной СК может быть не только результатом гидролиза конъюгатов, но и синтеза *de novo*. Для ответа на этот вопрос определяли активность фермента, ответственного за синтез СК – фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ). Обнаружено, что индукция активности ФАЛ происходила как с лектином родительского, так и мутантного штамма, но лектин мутантного штамма прояв-

лял большую активность, особенно при концентрации – 10 мкг/мл.

Из рисунка 6 и таблицы видно, что при воздействии лектина мутантного штамма прослеживается очень четкая корреляция между изменением содержания свободной СК и активностью ФАЛ в корнях, что не отмечается при инкубации с лектином родительского штамма.

Таблица. Активность ФАЛ в корнях проростков после инкубации с лектинами *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3

Обработка	Активность ФАЛ, %
Вода (контроль)	100 ± 3
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7	
5 мкг/мл	115 ± 5
10 мкг/мл	105 ± 4
20 мкг/мл	110 ± 6
40 мкг/мл	120 ± 3
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7.2.3	
5 мкг/мл	150 ± 4
10 мкг/мл	210 ± 3
20 мкг/мл	110 ± 9
40 мкг/мл	105 ± 3

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лектины повышают активность β -глюкозидазы, которая превращает конъюгированную форму СК в свободную и активируют ФАЛ, отвечающую за синтез СК, что подтверждает ранее полученные нами данные [2]. Однако степень участия лектинов в первом и втором случаях различна. Лектин родительского штамма обладает большей регулирующей активностью по отношению к β -глюкозидазе, лектин же мутантного штамма – к ФАЛ.

Заключение

Таким образом, в результате обобщения результатов проведенных нами ранее [2, 30] и настоящего исследований установлена способность лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp7.2.3 вызывать с разной эффективностью индукцию аденилатциклазной, NO-синтазной, НАДФН-оксидазной, Са-фосфоинозитольной, липоксигеназной сигнальных систем корней пшеницы в процессе узнавания на начальных стадиях формирования растительно-бактериальной ассоциации.

Одним из ранних ответов растительной клетки на воздействие лектинов явилась индукция аденилатциклазного сигнального пути, происходящая через

15 мин совместной инкубации лектинов с корнями проростков. Ранее нами показано, что лектины *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3 с идентичной закономерностью, но разной эффективностью вызывали индукцию образования цАМФ как одного из компонентов аденилатциклазного сигнального пути растительных клеток. Известно, что данная сигнальная система играет важную роль в функциональных и структурных ответах растительных клеток на воздействие многих внешних факторов абиотической и биотической природы [22].

Кроме того, показано, что после 30 мин воздействия лектинов на корни происходила индукция липоксигеназного сигнального пути, о чем свидетельствует возрастание активности липоксигеназы. У растений фосфолипаза С локализована в плазматической мембране и является одним из ключевых ферментов фосфоинозитидного цикла. В результате ее функционирования образуются два внутриклеточных мессенджера – водорастворимый инозитол-1,4,5-трисфосфат (ИФ3) и липидорастворимый ДАГ. ИФ3 мобилизует Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, увеличивая концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, а ДАГ, оставаясь в мембране, активирует Ca^{2+} -чувствительную, фосфолипидзависимую протеинкиназу [23]. После 40 мин инкубирования лектинов с корнями происходило увеличение количества ДАГ, что, очевидно, является следствием активирования фосфолипазы С.

Через час воздействия лектинов на корни происходило увеличение количества монооксида азота (NO), являющегося участником NO-сигнальной системы и регулятором физиологических процессов в растительной клетке. Показано, что NO принимает участие в регуляции клеточного цикла растительной клетки [24], процессов дифференциации и морфогенеза растений [25], формирования симбиотических отношений бобовых с ризобиями [26]. Дополнительным доказательством того, что лектины способны активировать NO-сигнальную систему растений является тот факт, что инкубация лектинов с корнями приводила к единовременному увеличению оксида азота и цитруллина в корнях.

После часового воздействия лектинов в корнях проросток пшеницы происходило увеличение количества салициловой кислоты (СК), стрессового метаболита, сочетающего свойства сигнального интермедиата и фитогормона. Считается, что реализация эффектов СК при биотических стрессах в значительной степени обусловлена влиянием на активность ферментов, причастных к регулированию про-/антиоксидантного равновесия, в частности, ка-

талазы, НАДФН-оксидазы, пероксидазы [27] и супероксиддисмутазы [28].

Особенный интерес вызывает синтез перекиси водорода, который является одним из наиболее быстрых ответов растительной клетки на индуцирующие воздействия. Активные формы кислорода функционируют, в основном, в рамках НАДФН-оксидазной сигнальной системы. При этом СОД выступает важнейшим ферментом антиоксидантной защиты растений, катализирующим реакцию восстановления супероксид радикала до пероксида водорода [29]. В нашей работе показано, что уже через 2 ч воздействия лектинов происходило увеличение активности СОД.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Антонюк Л.П., Евсеева Н.В. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа. Микробиология. 2006. 75 (4): 544-549.
5. Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. Curr. Microbiol. 1998. 36: 241-244.
6. Никитина В.Е., Аленькина С.А., Пономарева Е.Г., Савенкова Н.Н. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы. Микробиология. 1996. 65 (2): 165-170.
7. Аленькина С.А., Петрова Л.П., Никитина В.Е. Получение и характеристика мутанта *Azospirillum brasilense* Sp7 по лектиновой активности. Микробиология. 1998. 67 (6): 782-787.
8. 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.
9. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V. Plant adenilate cyclases. J. Receptors Signal Transduction. 2008. 28: 531-542.
10. 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.
11. Дарбре А. Практическая химия белка. М.: Мир, 1989. 623 с.
12. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957. 226: 497-509.
13. Blight E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 1959. 37: 911-917.
14. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
15. Christie W.W., Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis, in Advances in Lipid Methodology – Two, Christie W.W., Ed., Dundee: Oily Press, 1993: 69-111.
16. Axelrod B., Cheesebrough T.M., Laakso S. Lipoxygenase from soybeans. EC 1.13.11.12 linoleate:oxygen oxidoreductase. Methods. Enzymol. 1981. 71: 441-451.
17. Palva T.K., Hurting M., Saindrmann P., Palva E.T. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in Tobacco. Mol. Plant Microb. Interact. 1994. 7: 356-363.
18. Zucker M. Induction of phenylalanineammonialyase in Xaritin leaf disk. Photosynthetic requirement and effect of daylength. Plant Physiol. 1969. 44: 91-112.

19. 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.
20. Глянько А.К., Акимова Г.П., Соколова М.Г., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. Защитно-регуляторные механизмы при развитии бобово-ризобиального симбиоза. *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. 43 (3): 289-297.
21. Novotná Z., Valentová O., Martinec J., Feltl T., Nokhrina K. Study of phospholipase D and C in maturing and germinating seeds of *Brassica napus*. *Biochem. Soc. Trans.* 2000. 28: 817-818.
22. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V. Plant adenylate cyclases. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 2008. 28: 531-542.
23. Красильников М. А. Сигнальные пути, регулируемые фосфотидилинозит-3-киназой, и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток. *Биохимия.* 2000. 65 (1): 68-78.
24. Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 2008. 31: 622-631.
25. Simpson G.G. NO in flowering. *Bioessays.* 2005. 27: 239-324.
26. Глянько А.К., Васильева Г.Г. Активные формы кислорода и азота при бобово-ризобиальном симбиозе (обзор). *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. 46 (1): 21-28.
27. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. *Plant Sci.* 2002. 163: 653-660.
28. Rao M.V., Paliyaht G., Ormrod D.P. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 1997. 115: 137-149.
29. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. *Plant Sci.* 2002. 163: 653-660.
30. Аленькина С.А., Никитина В.Е. Изменение метаболической активности корней проростков пшеницы, индуцированное лектинами ростстимулирующих ризобактерий. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2015. 3: 1-15 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2014-3/Articles/1-Alenkina-Nikitina-2014-3.pdf>).

Поступила 18.08.2015

(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; тел. (8452) 970444; E-mail: alenkina@ibppm.ru).

LITERATURA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Antonjuk L.P., Evseeva N.V. Lektin pshenicy kak faktor rastitel'no-mikrobnoj kommunikacii i belok stressovogo otveta. *Mikrobiologija.* 2006. 75 (4): 544-549.
5. Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. *Curr. Microbiol.* 1998. 36: 241-244.
6. Nikitina V.E., Alen'kina S.A., Ponomareva E.G., Savenkova N.N. Izuchenie roli lek-tinov

- kletochnoj poverhnosti azospirill vo vzaimodejstvii s kornjami pshenicy. Mikrobiologija. 1996. 65 (2): 165-170.
7. Alen'kina S.A., Petrova L.P., Nikitina V.E. Poluchenie i harakteristika mutanta *Azospirillum brasilense* Sp7 po lektinovoju aktivnosti. Mikrobiologija. 1998. 67 (6): 782-787.
 8. 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.
 9. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V. Plant adenilate cyclases. J. Receptors Signal Transduction. 2008. 28: 531-542.
 10. 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.
 11. Darbre A. Prakticheskaja himija belka. M.: Mir, 1989. 623 c.
 12. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957. 226: 497-509.
 13. Blight E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 1959. 37: 911-917.
 14. Kejts M. Tehnika lipidologii. M.: Mir, 1975. 322 s.
 15. Christie W.W., Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis, in Advances in Lipid Methodology – Two, Christie W.W., Ed., Dundee: Oily Press, 1993: 69-111.
 16. Axelrod B., Cheesebrough T.M., Laakso S. Lipoxygenase from soybeans. EC 1.13.11.12 linoleate:oxygen oxidoreductase. Methods. Enzymol. 1981. 71: 441-451.
 17. Palva T.K., Hurting M., Saindrmann P., Palva E.T. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* in Tobacco. Mol. Plant Microb. Interact. 1994. 7: 356-363.
 18. Zucker M. Induction of phenylalanineammonialyase in Xaritin leaf disk. Photosynthetic requirement and effect of daylength. Plant Physiol. 1969. 44: 91-112.
 19. 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.
 20. Gljan'ko A.K., Akimova G.P., Sokolova M.G., Makarova L.E., Vasil'eva G.G. Zashhitno-reguljatornye mehanizmy pri razvitii bobovo-rizobial'nogo simbioza. Prikl. bio-himija i mikrobiologija. 2007. 43 (3): 289-297.
 21. Novotná Z., Valentová O., Martinec J., Feltl T., Nokhrina K. Study of phospholipase D and C in maturing and germinating seeds of *Brassica napus*. Biochem. Soc. Trans. 2000. 28: 817-818.
 22. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V. Plant adenilate cyclases. Journal of Receptors and Signal Transduction. 2008. 28: 531-542.
 23. Krasil'nikov M. A. Signal'nye puti, reguliruemye fosfotidilinozit-3-kinazoj, i ih znachenie dlja rosta, vyzhivaemosti i zlokachestvennoj transformacii kletok. Bio-himija. 2000. 65 (1): 68-78.
 24. Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. Plant Cell Environ. 2008. 31: 622-631.
 25. Simpson G.G. NO in flowering. Bioessays. 2005. 27: 239-324.
 26. Gljan'ko A.K., Vasil'eva G.G. Aktivnye formy kisloroda i azota pri bobovo-rizobial'nom simbioze (obzor). Prikl. biohimija i mikrobiologija. 2010. 46 (1): 21-28.
 27. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. Plant Sci. 2002. 163: 653-660.
 28. Rao M.V., Paliyaht G., Ormrod D.P. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. Plant Physiol. 1997. 115: 137-149.
 29. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. Plant Sci. 2002. 163: 653-660.
 30. Alen'kina S.A., Nikitina V.E. Izmenenie metabolicheskoi aktivnosti kornej prorostkov pshenicy, inducirovannoe lektinami roststimulirujushchih rizobakterij. Bjuulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN. 2015. 3: 1-15 [Jelektronnyj resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2014-3/Articles/1-Alenkina-Nikitina-2014-3.pdf>).

Образец ссылки на статью:

Аленькина С.А., Никитина В.Е. Влияние лектинов ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense* на биохимические показатели, вовлеченные в защитно-приспособительные реакции растений. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 3: 1-14 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/ASA-VEN-2015-3.pdf>).