

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>

© Коллектив авторов, 2015

УДК 579.22

*Н.И. Романов, С.А. Аленькина, В.Е. Никитина*

## **ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ ЭНДОФИТНОГО И ЭПИФИТНОГО ШТАММОВ АЗОСПИРИЛЛ НА АКТИВНОСТЬ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ**

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

*Цель.* Сравнительная оценка способности лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 оказывать регулирующее воздействие на активность пектинолитических ферментов в корнях проростков пшеницы.

*Материалы и методы.* Использованы спектрофотометрические методы определения активности полигалактуроназы, пектатлиазы и пектинэстеразы в клетках корней проростков пшеницы.

*Результаты.* Лектины азоспирилл способны вызывать индукцию пектинразрушающих ферментов самих растений, являющихся одним из основных факторов, способствующих разрушению клеточных стенок и внедрению микроорганизмов в ткани растения.

*Заключение.* Полученные результаты дают основания полагать, что лектины азоспирилл могут вызывать индукцию защитных механизмов растений, что в сочетании с ростстимулирующим эффектом бактерий способствует формированию устойчивости и продуктивности растений.

*Ключевые слова:* ризосфера, ассоциативная азотфиксация, лектины азоспирилл, корни проростков пшеницы, пектолитические ферменты

---

---

*N.I. Romanov, S.A. Alen'kina, V.E. Nikitina*

## **EFFECT OF THE LECTINS OF AN ENDOPHYTIC AND AN EPIPHYTIC AZOSPIRILLUM STRAINS ON THE PECTOLYTIC ENZYME ACTIVITY OF THE PLANT CELL**

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

*Objective.* The aim of this work was to comparatively evaluate the ability of lectins from *Azospirillum brasilense* Sp7 and *A. brasilense* Sp245 to regulate pectolytic enzyme activity in wheat seedling roots.

*Materials and methods.* Spectrophotometric methods were used to determine the activities of polygalacturonase, pectatelyase, and pectinesterase in the cells of wheat seedling roots.

*Results.* *Azospirillum* lectins are capable of inducing pectin-degrading enzymes in plants themselves, which are some of the principal factors contributing to cell wall degradation and microorganism entry into plant tissues.

*Conclusions.* The obtained results suggest that *Azospirillum* lectins can induce plant defense mechanisms, which, in combination with the plant-growth-promoting effect, is conducive to better plant resistance and productivity.

*Keywords:* Rhizosphere, associative nitrogen fixation, *Azospirillum*, lectins, wheat roots, pectolytic enzymes.

## **Введение**

Бактерии рода *Azospirillum* (альфа-субкласс протеобактерий) известны много лет как улучшающие рост растений ризобактерии (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) [1].

Бактерии обладают рядом очень важных свойств для эффективного ассоциативного взаимодействия с растениями: способностью к азотфиксации, продукции фитогормонов, солюбилизации фосфатов, улучшению водного и минерального статуса, продукции ряда соединений, увеличивающих мембранную активность и пролиферацию тканей корневой системы, уменьшению влияния стрессоров на растение и осуществлению контроля многочисленных фитопатогенов [2]. Они были изолированы из ризосферы многих трав и злаков, произрастающих как в тропическом, так и умеренном климате. Азоспириллы, в основном, колонизируют поверхность корня, и лишь некоторые штаммы способны проникать во внутренние ткани корня [3, 4]. Вопросы, связанные с проникновением бактерий в ткани корня растений являются одними из невыясненных в исследовании азотфиксирующих бактериально-растительных ассоциаций.

Фитопатогенные и мутуалистические микроорганизмы, такие как *Rhizobium* и *Azospirillum*, являются известными продуцентами ферментов, деградирующих пектин клеточной стенки растений [5]. В то же время показана способность ризобий индуцировать активность этих ферментов в самой растительной клетке на начальных этапах взаимодействия [6].

С действием пектолитических ферментов связывают не только процессы разрушения пектиновых веществ при проникновении и продвижении по тканям растения, но и изменение проницаемости для воды и ионов. Повреждающее действие пектолитических ферментов вызывает сдвиг физиологических процессов и развитие в тканях растения ответных реакций, соотношение которых может определять исход взаимоотношений между организмами.

Как показано [7], в большинстве случаев пектинолитические ферменты растений являются гликопротеинами и, следовательно, несут детерминанты специфичности. Присутствие в молекулах пектолитических ферментов углеводов может обуславливать специфическое взаимодействие с лектинами, в том числе бактериальными [8].

В.Е. Никитина с соавт. (1996) показали присутствие на поверхности клеток азоспирилл лектинов, вовлеченных в бактериальную адгезию к кор-

ням [9]. С поверхности двух отличающихся по способу колонизации растений штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий – *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 были изолированы лектины, являющиеся гликопротеинами с различными молекулярными массами и углеводной специфичностью [10, 11]. Установлено, что лектины азоспирилл являются полифункциональными молекулами, и, помимо адгезивной функции, они способны влиять на метаболизм растительной клетки – стимулировать прорастание семян [12], проявлять по отношению к растительной клетке митогенную и ферментомодифицирующую активности [13, 14], изменять содержание стрессовых метаболитов в растительной клетке, что свидетельствует о способности лектинов выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы [15].

В связи с вышесказанным целью данной работы была сравнительная оценка способности лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 оказывать регулирующее воздействие на активность пектинолитических ферментов в корнях проростков пшеницы.

#### **Материалы и методы**

В работе использованы лектины двух штаммов бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7 (эпифитный), полученный из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (г. Москва), и *A. brasilense* Sp245 (эндофитный) из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Выращивание культур, выделение и очистку лектинов проводили, как описано ранее [9, 11]. Количество белка определяли по методу М.М. Bradford [16].

Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Саратовская 29» (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. Корни после экспозиции с препаратами лектинов, гомогенизировали в 0.15 М фосфатном буфере (рН 7.8). Гомогенат центрифугировали при 7000g, надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов.

Активность полигалактуроназы, пектатлиазы и пектинэстеразы определяли по известной методике [17]. Активность ферментов выражали числом единиц активности фермента в 1 г сырой массы корней.

Опыты проводили в трехкратной биологической и пятикратной аналитической повторностях. Цифровой материал обработан статистически с помощью программы «Анализ данных электронных таблиц Microsoft Excel». Доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

### Результаты и обсуждение

Для проведения экспериментов по изучению влияния лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 на активность пектинолитических ферментов были взяты концентрации лектинов от 5 до 40 мкг/мл. Время инкубирования лектинов с корнями проростков составляло 15-120 мин. Результаты проведенных исследований показали, что изучаемые лектины в концентрациях от 5 до 20 мкг/мл после 1ч воздействия на корни проростков пшеницы способны вызывать индукцию активности полигалактуроназы, пектинэстеразы, пектатлиазы – ферментов пектинолитического комплекса клеточной стенки растений (рисунок).

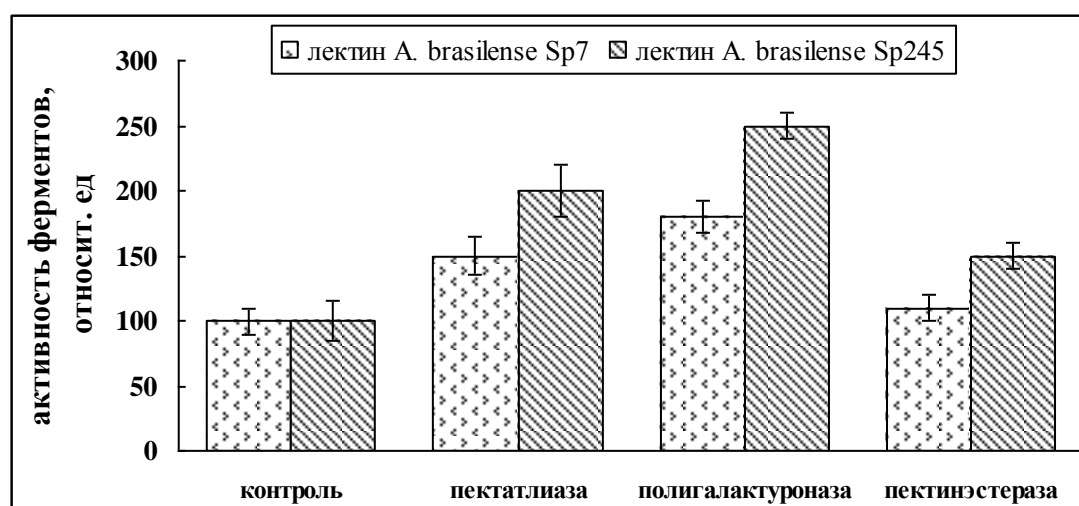


Рис. Влияние лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 на активность пектолитических ферментов корней проростков пшеницы. Контроль - корни: активность пектатлиазы – 20 ед/г сырой массы, полигалактуроназы – 10 ед/г сырой массы, пектинэстеразы – 25 ед/г сырой массы. Концентрация лектинов – 10 мкг/мл. Время инкубации – 1ч.

Наибольший эффект наблюдался по отношению к полигалактуроназе, увеличение активности для лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 составляло 60 и 80%, соответственно. Лектин эндофитного штамма *A. brasilense* Sp245 проявлял наиболее высокую индуцирующую активность по отношению ко всем изучаемым ферментам.

## **Заключение**

Полученные данные свидетельствуют о том, что лектины азоспирилл способны вызывать индукцию пектинразрушающих ферментов самих растений, являющихся одним из основных факторов, способствующих разрушению клеточных стенок и внедрению микроорганизмов в ткани растения и в этом прослеживается сходство с бобово-ризобияльным симбиозом [6].

Кроме того, представленные результаты и предыдущие данные, свидетельствующие о способности лектинов азоспирилл вызывать спектр ответных биохимических реакций, являющихся частью сигнальных систем [15], дают основания полагать, что лектины азоспирилл могут вызывать индукцию защитных механизмов растений, что в сочетании с ростстимулирующим эффектом бактерий способствует формированию устойчивости и продуктивности растений.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Okon Y., Vanderleyden J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News. 1997. 63: 366-370.
2. 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.
3. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 2000. 24: 487-506.
4. Saikia S.P., Bora D., Goswami A., Mudoj K.D., Gogoi A. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. African J. Microbiol. Res. 2012. 6: 1085-1102.
5. Khammas K.M., Ageron., Grimond P.A., Kaiser P. *Azospirillum irakense* spp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 1989. 140: 679-693.
6. Xie F., Murray J.D., Kim J., Heckmann A.B., Edwards A., Oldroyd G.E.D., Downie J. A. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. PNAS. 2012. 109: 633-638.
7. Albersheim P., Valent B. Host-pathogen interactions in plants. J Cell Biology. 1978. 78: 627-643.
8. Cervone F., Anderbhan T., Corn R. H. A., Wood R. K. S. Effects of french bean tissue on *Colletotrichum lindemuthianum* polygalacturonase. Phytopathol. Z. 1981. 102: 238-246.
9. 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.
10. Никитина В.Е., Пономарева Е.Г., Аленькина С.А. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимоотношениях с растениями. В кн.: Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. М.: Наука, 2005: 70-97.
11. Шелудько А.В., Пономарева Е.Г., Варшаломидзе О.Э., Ветчинкина Е.И., Кацы Е.И., Никитина В.Е. Гемагглютинирующая активность и подвижность бактерий *Azospirillum brasiliense* в присутствии разных источников азота. Микробиология. 2009. 78 (6): 749-756.
12. Никитина В.Е., Богомолова Н.В., Пономарева Е.Г., Соколов О.И. Влияние лектинов

азоспирилл на способность семян к прорастанию. Известия РАН. Серия биологическая. 2004. 4: 431-435.

13. 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.
14. Чернышева М.П., Аленькина С.А., Никитина В.Е., Игнатов В.В. Внеклеточные протеолитические ферменты штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и регулирование их активности гомологичным лектином. Прикл. биохимия и микробиология. 2005. 41 (4): 444-448.
15. Alen'kina S.A., Bogatyrev V.A., Matora L.Yu., Sokolova M.K., Chernysheva M.P., Trutneva K.A., Nikitina V.E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions. *Plant and Soil*. 2014. 381: 337-349.
16. 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.
17. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд., 1987. 430 с.

*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](mailto:alenkina@ibppm.ru)).*

---

---

## LITERATURA

1. Okon Y., Vanderleyden J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News*. 1997. 63: 366-370.
2. 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.
3. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev*. 2000. 24: 487-506.
4. Saikia S.P., Bora D., Goswami A., Mudoj K.D., Gogoi A. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. *African J. Microbiol. Res*. 2012. 6: 1085-1102.
5. Khammas K.M., Ageron., Grimond P.A., Kaiser P. *Azospirillum irakense* spp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol*. 1989. 140: 679-693.
6. Xie F., Murray J.D., Kim J., Heckmann A.B., Edwards A., Oldroyd G.E.D., Downie J. A. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *PNAS*. 2012. 109: 633-638.
7. Albersheim P., Valent B. Host-pathogen interactions in plants. *J Cell Biology*. 1978. 78: 627-643.
8. Cervone F., Anderbhan T., Corn R. H. A., Wood R. K. S. Effects of french bean tissue on *Colletotrichum lindemuthianum* polygalacturonase. *Phytopathol. Z*. 1981. 102: 238-246.
9. Nikitina V.E., Alen'kina S.A., Ponomareva E.G., Savenkova N.N. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с зёрнами пшеницы. *Микробиология*. 1996. 65 (2): 165-170.
10. Nikitina V.E., Ponomareva E.G., Alen'kina S.A. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимоотношениях с растениями. В кн.: *Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. М.: Наука, 2005: 70-97.*

11. Shelud'ko A.V., Ponomareva E.G., Varshalomidze O.Je., Vetchinkina E.I., Kacy E.I., Nikitina V.E. Gemagglutinirujushhaja aktivnost' i podvizhnost' bakterij Azospirillum brasilense v prisutstvii raznyh istochnikov azota. *Mikrobiologija*. 2009. 78 (6): 749-756.
12. Nikitina V.E., Bogomolova N.V., Ponomareva E.G., Sokolov O.I. Vlijanie lektinov azospirilla na sposobnost' semjan k prorastaniju. *Izvestija RAN. Serija biologiche-skaja*. 2004. 4: 431-435.
13. 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.
14. Chernysheva M.P., Alen'kina S.A., Nikitina V.E., Ignatov V.V. Vnekletochnye proteoliticheskie fermenty shtamma Azospirillum brasilense Sp7 i regulirovanie ih aktivno-sti gomologichnym lektinom. *Prikl. biohimija i mikrobiologija*. 2005. 41 (4): 444-448.
15. Alen'kina S.A., Bogatyrev V.A., Matora L.Yu., Sokolova M.K., Chernysheva M.P., Trutneva K.A., Nikitina V.E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium Azospirillum brasilense Sp7 in bacterial-plant root interactions. *Plant and Soil*. 2014. 381: 337-349.
16. 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.
17. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Jarosh N.P., Peruanskij Ju.V., Lukovnikova G.A., Ikonnikova M.I. *Metody biohimicheskogo issledovanija rastenij / Pod red. A.I. Ermakova. L.: Agropromizdat, Leningr. otd., 1987. 430 s.*

**Образец ссылки на статью:**

*Романов Н.И., Аленькина С.А., Никитина В.Е. Влияние лектинов эндофитного и эпифитного штаммов азоспириллы на активность пектолитических ферментов растительной клетки. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 3: 1-7 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/NIR-2015-3.pdf>).*