

## **ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СОЛЕЙ СВИНЦА**

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук, Саратов

\*E-mail: alenkina\_s@ibppm.ru

**Аннотация.** Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур, эффективное и ограниченное использование удобрений и средств защиты растений, а также повышение устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным агроклиматическим условиям и антропогенным воздействиям являются актуальными для сельского хозяйства, а также для решения экологических проблем и охраны окружающей среды. Данные вопросы привлекают внимание многих ученых, работающих в различных областях науки: растениеводстве, почвоведении, агрономии, агрохимии, экологии, микробиологии и других. Особенно важными для решения этих задач являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов, и биологических механизмов взаимодействия компонентов растительно-микробных систем.

*Azospirillum brasilense* обладающие потенциалом стимулировать рост растений, относятся к группе plant-growth-promoting bacteria (PGPB). Лектины, обнаруженные на поверхности бактерий азоспирилл и обладающие способностью связывать специфические углеводы, обеспечивают адгезию бактерий к корневой поверхности. Изучали влияние лектинов двух штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* - *Azospirillum brasilense* Sp7 (эпифит) и *Azospirillum brasilense* Sp245 (эндофит) на активность ферментов антиоксидантного комплекса корней четырехдневных проростков

пшеницы при воздействии  $Pb(CH_3COO)_2$ . Показано, что оба лектина вызывали увеличение активности пероксидазы, супероксиддисмутазы и уменьшение активности каталазы при действии данного вида стресса, но временная и концентрационная зависимости были различными. Вероятной причиной различной функциональной активности лектинов может быть различная углеводная специфичность, структурные различия белков, и как следствие, различное взаимодействие с поверхностью растительной клетки, что является определяющим фактором для включения последующих этапов.

Полученные в нашей работе результаты продемонстрировали возможность участия лектинов азоспирилл в адаптации и индукции защитных механизмов растений, что в сочетании с ростстимулирующим эффектом этих бактерий может способствовать формированию устойчивости и повышению продуктивности растений.

**Ключевые слова:** ассоциативная азотфиксация, азоспириллы, лектины, корни проростков пшеницы, антиоксидантные ферменты, абиотические стрессы

**Введение.** Ассоциативные азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* – PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) микроорганизмы, стимулирующие рост растений за счет ряда положительных эффектов на растения - способности к азотфиксации, продукции фитогормонов, солюбилизации фосфатов, улучшению водного и минерального статуса, продукции ряда соединений, увеличивающих мембранную активность и пролиферацию тканей корневой системы, способности уменьшать влияние стрессоров на растение и осуществлять контроль многочисленных фитопатогенов (Y. Bashan et al., 2004). К механизмам опосредованного растением биоконтрольного эффекта относится способность индуцировать у растений защитные реакции, направленные на повышение устойчивости. Несмотря на активно ведущиеся в этой области исследования, на данный момент вопрос о приоритетности какого-либо из перечисленных факторов, объясняющих благоприятное влияние инокуляции азотфиксирующими бактериями на рост и продуктивность растения, остается открытым.

Интерес к штаммам *A. brasilense* Sp7 и Sp245 обусловлен тем, что они относятся к наиболее изученному виду азоспирилл и отличаются стратегией поведения в процессе формирования симбиотических отношений. В частности, штамм *A. brasilense* Sp7 был обнаружен только на поверхности корня, в тоже время *A. brasilense* Sp245 - единственный штамм, принадлежность которого к эндофитам строго доказана. Как показали исследования, проведенные с использованием олигонуклеотидных зондов и сканирующей конфокальной лазерной микроскопии, бактерии штамма Sp245 способны к исключительно тесному взаимодействию с растением-хозяином: они заполняют корневые волоски и колонизируют проводящую систему корня пшеницы (M. Schlöter et al., 1997). Эндофитные бактерии представляют особый интерес, поскольку они способны мутуалистически жить внутри растительных тканей, что позволяет им по сравнению с другими микроорганизмами в меньшей степени зависеть от внешних факторов среды и одновременно проявлять комплекс хозяйственно полезных свойств. При этом, однажды внедрившись в ткани растения, эндофиты могут способствовать формированию длительной защиты макроорганизма от стрессовых факторов окружающей среды.

Образование азотфиксирующих систем, подобно как и любых других биологических межклеточных взаимодействий, согласно современным представлениям, включает функционирование углеводсвязывающих белков – лектинов. Долгое время считалось, что в системе углевод-белкового взаимодействия при формировании азотфиксирующих ассоциаций и симбиозов роль узнающих молекул выполняют лектины растений (Л.П. Антонюк, Н.В. Евсеева, 2006). Однако появление новых знаний относительно лектинов азотфиксирующих бактерий заставило внести коррективы в систему взглядов по лектин-углеводным взаимодействиям, реализуемым при возникновении азотфиксирующих ассоциаций с учетом роли бактериальных лектинов.

Было показано, что инициация взаимодействия бактерий с корнями происходит по принципу лиганд-рецепторного взаимодействия. Установлено, что со стороны азоспирилл в этом процессе, в числе других факторов,

участвуют лектины, находящиеся на поверхности клетки. С поверхности двух штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий - *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 были выделены лектины, являющиеся гликопротеинами с различными молекулярными массами и углеводной специфичностью. Лектин *A. brasilense* Sp7 имел молекулярную массу 36 кДа и проявлял специфичность к L-фукозе (1,87 mM) и D-галактозе (20 mM). Лектин *A. brasilense* Sp245 проявлял сродство к собственному полисахариду – кислому D-рамнану и имел молекулярную массу 67 кДа (В.Е. Никитина с соавт., 2005).

Было показано, что лектины азоспирилл являются полифункциональными молекулами. Они принимают участие в адгезии бактерий к корням растений, обладают способностью влиять на метаболизм растительной клетки - стимулировать прорастание семян, проявлять по отношению к растительной клетке митогенную и ферментмодифицирующую активности, изменять содержание стрессовых метаболитов в растительной клетке (S.A. Alen'kina et al., 2017; В.Е. Никитина с соавт., 2005).

Возрастающее поступление в окружающую среду тяжелых металлов приводит к загрязнению почвы, которая является основным источником поступления избыточных количеств тяжелых металлов в растения. Аккумуляция тяжелых металлов приводит к снижению количества и качества урожая сельскохозяйственных растений и животноводческой продукции, а также росту заболеваемости населения и сокращению продолжительности жизни. Поэтому становится понятной необходимость тщательного изучения путей их поступления в почвы и растения, роли каждого элемента и их взаимодействия в животном и растительном организмах. Это весьма актуально в связи с тем, что токсическое действие тяжелых металлов сильно оказывается на культурных растениях, а в настоящее время их часто приходится культивировать в условиях загрязнения, особенно вблизи крупных городов. В связи с тем, что самоочищения почв практически не происходит или скорость его чрезвычайно низка, это создает большие проблемы для растениеводства.

Общим следствием токсичности тяжелых металлов в растительном

организме является чрезмерное накопление активных форм кислорода, которые могут вызвать перекисное окисление липидов (ПОЛ), окисление белка, инактивацию ферментов, повреждение нуклеиновых кислот и др. Высшие растения развили сложные системы антиоксидантной защиты растительных клеток от окислительного стресса, важнейшим звеном которых являются антиокислительные ферменты - супероксиддисмутазы, каталазы, некоторые пероксидазы (V.R. Devraj, 2008). В настоящее время, одним из перспективных направлений по повышению устойчивости растений к действию различных стрессовых факторов является использование экологически чистых технологий, основанных на применении эпифитных и эндофитных штаммов *Azospirillum*, обладающих ростстимулирующей активностью. Цель нашей работы состояла в выявлении способности лектинов азоспирилл двух штаммов - *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 оказывать регулирующее влияние на активность пероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы в корнях проростков пшеницы в условиях загрязнения солями свинца ( $Pb(CH_3COO)_2$ ).

**Методика исследований.** 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 *A. brasilense* Sp245 из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>).

Выделение лектинов с поверхности клеток бактерий проводили методом Эшдата (Y. Echdat et al., 1978).

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 и инкубированы в темноте при 25°C. Для экспериментов были использованы четырехдневные проростки.

Для изучения влияния кратковременных стресса на активность ферментов

корни в течение двух часов подвергали совместному воздействию лектинов (концентрация 5–40 мкг/мл) и  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (концентрация  $10^{-3}$  мМ).

В качестве контроля выступали корни проростков, выращенные при 25°C.

Корни гомогенизировали в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7,8). Гомогенат центрифугировали при 7000g 10 мин, надосадочную жидкость использовали для определения активности ферментов.

Количество белка определяли по методу Бредфорд (М.М Bradford, 1976).

Для определения активности пероксидазы (ЕС 1.11.1.7) использовали микрометод (Р.М Хайруллин с соавт., 2001). Метод основан на окислении *o*-фенилендиамина (ОФД). Активность выражали в единицах поглощения на 1 г сырой массы корней. Для сравнительного анализа вариантов активность выражали в относительных единицах.

Определение активности каталазы (ЕС 1.11.1.6) проводили по методу Аеbi (Н. Аеbi, 1984). Снижение количества  $\text{H}_2\text{O}_2$  измеряли при 240 нм, а активность рассчитывали как единицы (мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , разлагаемой в минуту) на г сырой массы корней (коэффициент экстинкции  $39,4 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Для сравнительного анализа вариантов активность выражали в относительных единицах.

Активность супероксиддисмутазы (ЕС 1.15.1.11) определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН (R.G. Alscher, 2002). Оптическую плотность продукта окисления нитросинего тетразолия – формазама измеряли при 560 нм и использовали для расчета активности фермента. Результаты выражали в относительных единицах.

Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента. На рисунках приведены средние арифметические значения по трем независимым опытам, проведенным в 5-кратной биологической повторности, и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются величины, достоверные при  $P < 0.05$ .

**Результаты исследований.** В результате проведенных нами опытов было

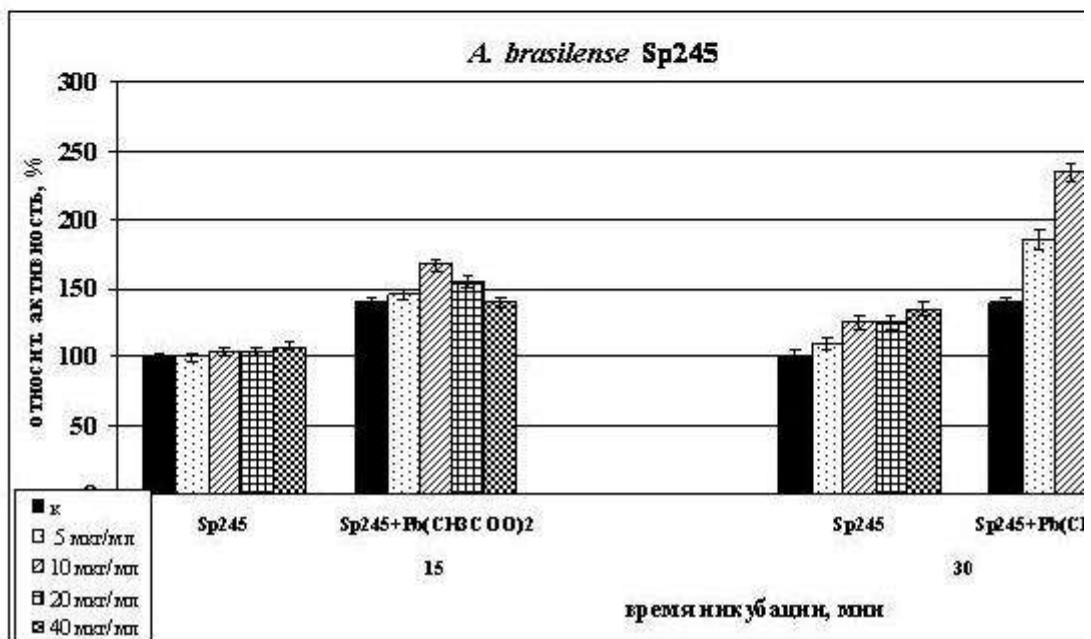
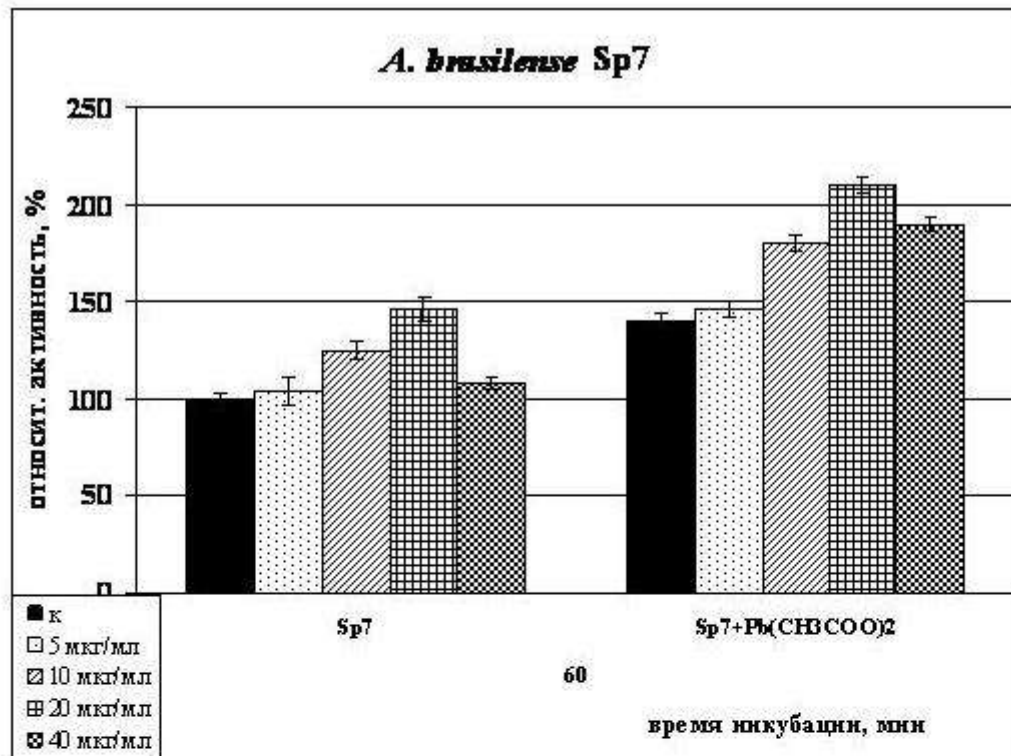
установлено, что комбинированное воздействие лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 с  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  приводило к повышению активности пероксидазы в корнях проростков пшеницы. Активность фермента в случае с лектином *A. brasilense* Sp245 максимально возрастала после 30-минутной экспозиции в присутствии  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Эффективная концентрация лектина – 10 мкг/мл. Для лектина *A. brasilense* Sp7 эффект был отмечен после часа инкубации с корнями и концентрации лектина 20 мкг/мл.

Необходимо отметить, что в варианте с корнями проростков, подвергшихся воздействию  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , и в варианте с корнями, обработанными одними лектинами также происходило повышение активности пероксидазы, но в варианте с синергическим воздействием лектинов и стрессового фактора уровень был выше (Рисунок 1).

Рассмотрение антиоксидантной системы невозможно без оценки функционирования фермента детоксикации образовавшейся  $\text{H}_2\text{O}_2$  - каталазы. Активность растительной каталазы часто рассматривается как показатель загрязнения среды, в которой развивается данное растение. Изучение воздействия изучаемых лектинов на корни проростков пшеницы в присутствии соли тяжелого металла приводило к снижению активности каталазы в корнях проростков, причем это понижение происходило на фоне повышения активности этого фермента при воздействии изучаемой соли на корни проростков пшеницы.

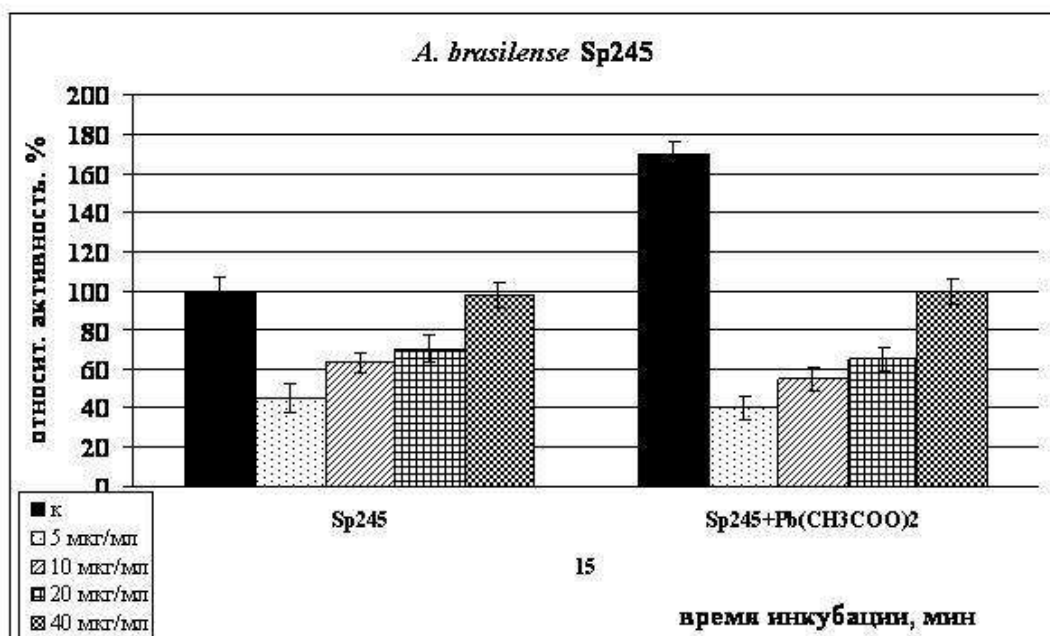
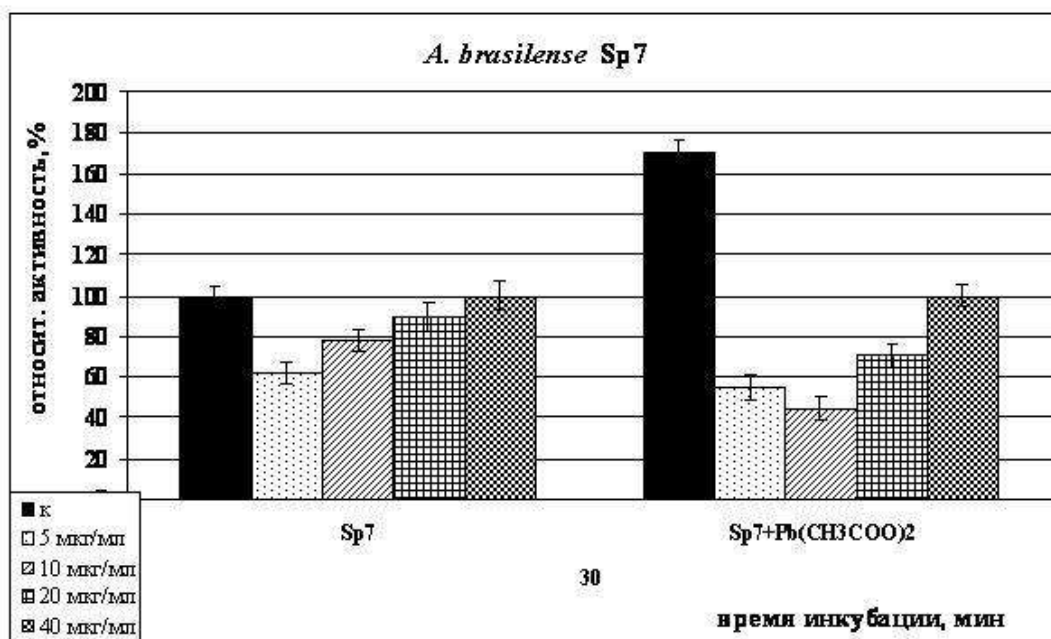
В случае с лектином *A. brasilense* Sp7 максимальное уменьшение происходило после 30 мин инкубации с корнями в присутствии металла, затем происходило снижение эффекта и к часу инкубации лектинов с корнями она достигала уровня воздействия одними лектинами. Максимальный эффект был отмечен при концентрации лектина – 10 мкг/мл.

Для лектина *A. brasilense* Sp245 уменьшение активности происходило после 15 мин совместного воздействия с солью. Максимальный эффект был отмечен при концентрации лектина – 5 мкг/мл (Рисунок 2).



**Рисунок 1. Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 на активность пероксидазы корней проростков пшеницы. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой ( $n=3$ ). Все различия достоверны ( $p<0,05$ )**





**Рисунок 2. Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 на активность каталазы корней проростков пшеницы. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой ( $n=3$ ). Все различия достоверны ( $p<0,05$ )**

Было показано, что лектины *A. brasilense* Sp7 и Sp245 вызывали индукцию активности СОД в корнях проростков пшеницы после совместного воздействия с солью тяжелого металла после часа инкубации с корнями. В случае лектина *A. brasilense* Sp7 наибольший эффект в отношении фермента был отмечен для концентрации лектина – 20 мкг/мл. При совместном воздействии лектина *A. brasilense* Sp245 и  $Pb(CH_3COO)_2$ , было показано, что

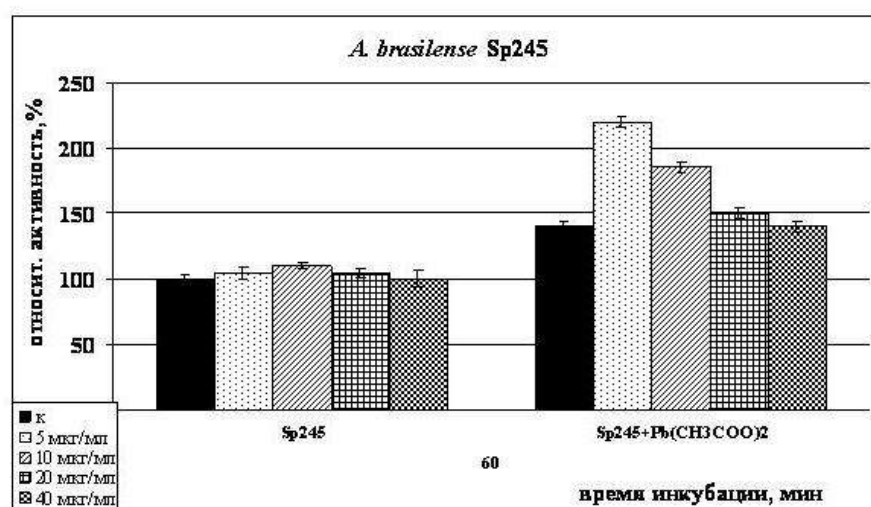
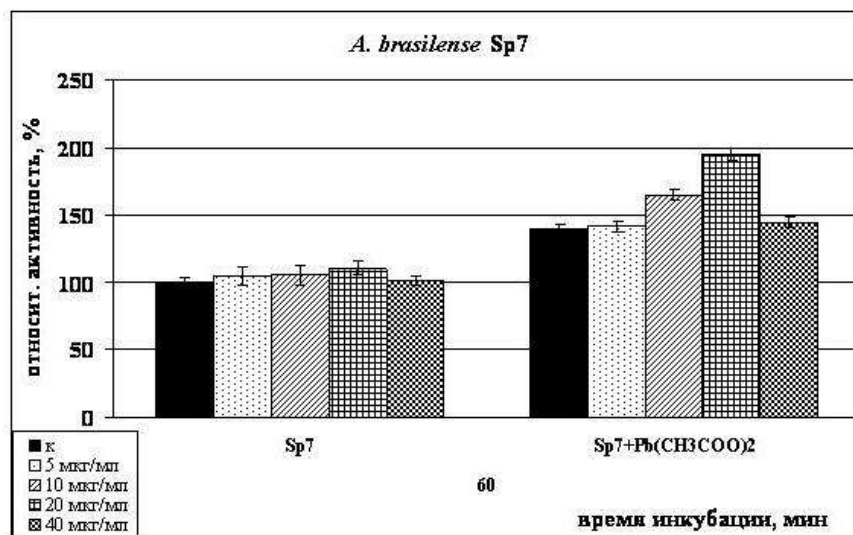
максимальное повышение активности фермента наблюдалось при концентрации лектина - 5 мкг/мл (Рисунок 3).

Необходимо отметить, что в варианте с корнями проростков, подвергшихся воздействию соли тяжелого металла и в варианте с корнями, обработанными одними лектинами также происходило повышение активности СОД, но в варианте с синергическим воздействием лектинов и стрессового фактора уровень был выше

Необходимо отметить, что для всех изучаемых ферментов лектин *A. brasilense* Sp7 проявлял максимальный эффект в отношении фермента при более высоких концентрациях, чем лектин *A. brasilense* Sp245 и уровень эффекта для лектина штамма Sp245 был значительно выше по сравнению с лектином штамма Sp7. Вероятной причиной отличающейся функциональной активности лектинов могут быть различия в углеводной специфичности, структуре белков, и как следствие, неодинаковое взаимодействие с поверхностью растительной клетки, что является определяющим фактором для включения последующих этапов.

**Выводы.** Представленные данные подтверждают результаты других авторов, которые отмечают способность азоспирилл изменять активность антиоксидантных ферментов в растениях при различных абиотических стрессах (N. Baniaghil et al, 2013). Одной из возможных причин повышения активности пероксидазы, СОД и угнетения каталазной активности может быть влияние салициловой кислоты, индукцию синтеза которой вызывают лектины азоспирилл (S.A. Alen'kina et al., 2014).

В связи с выше изложенным, лектины азоспирилл можно отнести к регуляторам роста растений, обладающих как росторегулирующим, так и антистрессовым и иммуностимулирующим действием, что может явиться основой разработки технологии повышения продуктивности растений.



**Рисунок 3. Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 на активность СОД корней проростков пшеницы. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой ( $n=3$ ). Все различия достоверны ( $p<0,05$ )**

### Список литературы

1. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) / Y. Bashan, G. Holguin, L.E. de-Bashan // Can. J. Microbiol. - 2004. - V. 50. - P. 521-577.
2. Schloter, M. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera / M. Schloter, W. Wiehe, B. Assmus, H. Steindl, H. Becke, G. Hoftich, A. Hartmann // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - V. 63. - P. 2038-2046.
3. Антонюк, Л.П. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа / Л.П. Антонюк, Н.В. Евсеева // Микробиология. - 2006. - Т. 75. - № 4. - С. 544-549.
4. Никитина, В.Е. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимоотношениях с растениями / В.Е. Никитина, Е.Г. Пономарева, С.А. Аленькина // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. - М.: Наука, 2005. - С. 70-97.
5. Alen'kina, S.A. Change in the ratio of the activities of different types of proteases and their inhibitors in plant roots exposed to *Azospirillum* lectins / Alen'kina, S.A.,

Nikitina V.E. // J. Plant Regulation. -2017. - V. 36. - P.522-527.

6. Devraj, V.R. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*) / V.R. Devraj // Aust. J. Crop. Sci. - 2008. - V. 2. - P. 40-48.

7. Echdat, Y. Isolation of mannose-specific lectin from *E.coli* and its role in the adherence of the bacterial to epithelial cells / Y. Echdat, I. Ofek, Y. Yachow-Yan, N. Sharon, D. Mirelman // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1978. - V. 85. - P. 1551-1559.

8. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. - 1976. - V. 72. - P. 248-254.

9. Хайруллин, Р.М, Активация хитоолигосахаридами окисления ортофенилендиамина проростками пшеницы в присутствии щавелевой кислоты / Р.М. Хайруллин, Л.Г. Яруллина, Н.Б. Трошина, И.Э. Ахметова // Биохимия. - 2001. - Т. 66. - № 3. - С. 354-358.

10. Aebi, H. Catalase in Vitro / L. Packer // Methods in Enzymology, - Academic Press, San Diego., 1984. - P. 121-126.

11. Alscher, R.G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress plants / R.G. Alscher, N. Erturk, L.S. Heath // J. Exp. Bot. - 2002. - V. 53. - P. 1331-1341.

12. Baniaghil, N. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, antioxidant enzymes and microelements of canola under salt stress / N. Baniaghil, M.H. Arzanesh, M. Ghorbanli, M. Shahbazi // J. Appl. Environ. Biol. Sci. - 2013. - V. 3. - P. 17-27.

13. Alen'kina, S.A. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions / S.A. Alen'kina, V.A. Bogatyrev, L.Yu. Matora, M.K. Sokolova, M.P. Chernysheva, K.A. Trutneva, V.E. Nikitina // Plant and Soil. - 2014. - V. 381. - P. 337-349.

### **Сведения об авторах**

**Аленькина Светлана Александровна**, канд. биол. наук, ст. научный сотрудник лаборатории микробиологии, 410049 г. Саратов, пр-т Энтузиастов 13, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, телефон (8452) 970444, E-mail: alenkina\_s@ibppm.ru

**Романов Никита Иванович**, магистрант лаборатории микробиологии, 410049 г. Саратов, пр-т Энтузиастов 13, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, телефон (8452) 970444, E-mail: nikita.romanov.94@gmail.com

**Никитина Валентина Евгеньевна**, доктор биологических наук, зав. лабораторией микробиологии, 410049 г. Саратов, пр-т Энтузиастов 13, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, телефон (8452) 970444, E-mail: nikitina\_v@ibppm.ru