

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ АЗОСПИРИЛЛ НА СОДЕРЖАНИЕ
ПЕРОКСИДАЗ, ОКСИДА АЗОТА (NO) И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления подготовки 06.03.01 - Биология
биологического факультета
Васиной Натальи Васильевны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

А. А. Галицкая

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

С. А. Коннова

Саратов 2016 год

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Для того чтобы управлять процессами влияния бактерий на растения, необходимо узнать механизмы их взаимодействия на молекулярном уровне. Механизм межклеточного узнавания лежит в основе целого ряда важнейших процессов коммуникации, таких, как например узнавания растением фитопатогенных или симбиотических микроорганизмов. Известно, что необходимой предпосылкой для инфекции является прикрепление бактериальных клеток к растущему кончику корневого волоска растения. Это в свою очередь индуцирует определенные сигнальные системы и запускает защитные ответы растения. Наиболее изученным считается бобово-ризобильный симбиоз. При этом в ряде работ было показано, что ризобии вызывают особую передачу сигналов, которые связаны с формированием системной устойчивости. Важную роль в этих процессах играют накопление активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА), которые могут выполнять сигнальную роль. Кроме того отмечено участие флавоноидов на этапе узнавания и «привлечения» растениями микроорганизмов. Однако ризобии и бобовые – не единственная форма симбиоза. Менее изученным остается механизм формирования симбиотических отношений между ассоциативной ризосферной микрофлорой и такой экономически значимой культурой, как пшеница. Типичный представитель ассоциативных азотофиксаторов – бактерии рода *Azospirillum*. В литературе приводятся данные, подтверждающие участие липополисахаридов (ЛПС) и капсульных полисахаридов (КПС) в формировании взаимоотношений с растением на стадиях узнавания микроорганизма корнями растения-ассоцианта, агрегации бактерий и прикрепления к поверхности корня.

Цель работы – определить динамику изменения содержания пероксидаз, оксида азота (NO) и фенольных соединений в проростках пшеницы под влиянием липополисахаридов (ЛПС) азоспирилл.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

1) определить влияние ЛПС различных штаммов азоспирилл на динамику содержания пероксидаз, оксида азота (NO) и фенольных соединений в проростках пшеницы сорта Саратовская-29;

2) сравнить динамику содержания пероксидаз и NO под действием ЛПС азоспирилл в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

Материалы и методы исследования: Объектом исследования служили яровая мягкая пшеница сортов Саратовская-29 и Добрыня.

В работе были использованы препараты ЛПС штамма SR55, SR109 полученные из бактерий рода *Azospirillum brasilense* и ЛПС штамма BV-S из бактерий рода *Azospirillum thiophilum*. Определение суммы фенольных соединений проводили спектрофотометрически методом Фолина-Чокатеу, содержание оксида азота NO – спектрофотометрически с использованием реактива Грисса, пероксидазы – спектрофотометрически, с использованием в качестве субстрата ортофенилендиамина.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен из 63 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: формирование симбиотических отношений между бактериями и растениями; значение флавоноидов в процессе формирования симбиозов; участие АФК и пероксидазы в защитных реакциях растений; оксид азота NO и его функции в растениях.

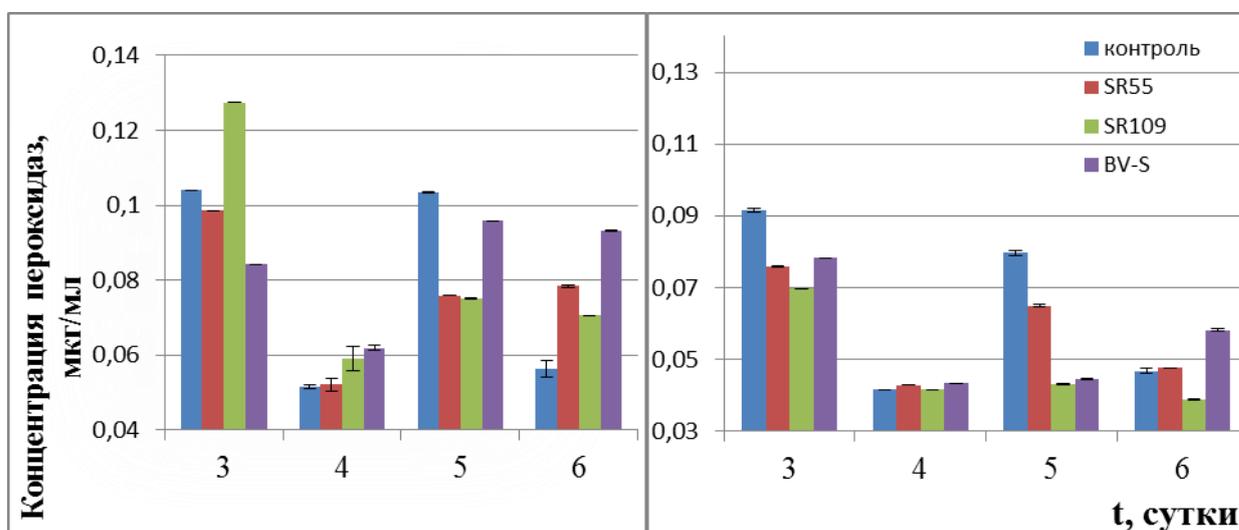
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

На первом этапе мы исследовали активность пероксидазы в стеблях и корнях проростков пшеницы сорта Саратовская-29.

Мы сравнивали динамику содержания пероксидазы в корнях проростков пшеницы сорта Саратовская-29 в течение недели.

Было показано, что на третьи сутки в корнях общее содержание пероксидаз составляло 0,1 мкг/мл экстракта (рисунок 1А). По мере

прорастания, содержание изменялось, на четвертый день оно снижалось примерно в два раза. На пятые сутки содержание пероксидаз увеличивалось, до значений сравнимых с первоначальными значениями, на шестые сутки наблюдалось снова снижение, до значений сходных с четвертыми сутками. Добавление ЛПС азоспирилл к среде культивирования приводило к количественному изменению содержания пероксидаз в проростках пшеницы. При этом сохранялась общая картина динамики. Однако следует отметить, что ЛПС разных штаммов отличались по действию на содержание пероксидаз. Добавление в среду культивирования ЛПС штамма SR55 приводило к снижению содержания пероксидаз на третьи и пятые сутки по сравнению с контрольным образцом. При добавлении ЛПС штамма SR109 отмечено понижение активности пероксидаз на пятые сутки по сравнению с контрольным образцом, в остальные дни активность увеличивалась. Добавление ЛПС штамма BV-S приводило к увеличению активности пероксидаз в корнях на четвертые и шестые сутки.



А
 Б
 к—контроль; SR55—ЛПС *A. brasilense* SR55; SR109—ЛПС *A. brasilense* SR109; BV-S—ЛПС *A. thiophilum* BV-S

Рисунок 1 – Активность пероксидаз в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б).

В ряде работ указывается, что разные сорта пшеницы отличаются по синтезу вторичных метаболитов. Поэтому на следующем этапе работы мы

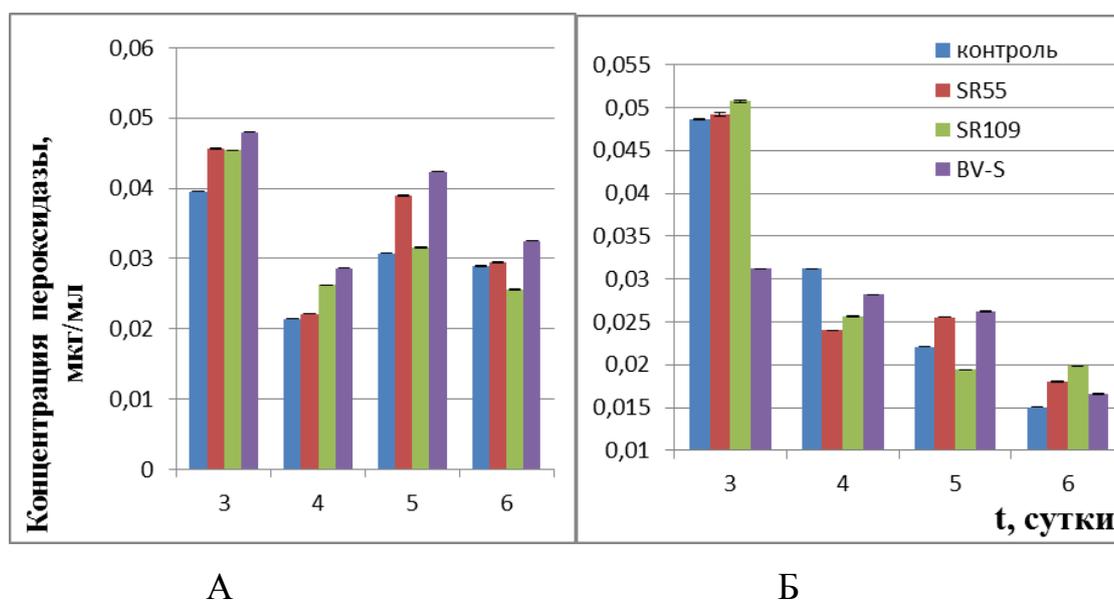
провели сравнительный анализ динамики содержания пероксидаз у проростков пшеницы сорта Добрыня.

На рисунке 1 (Б) показано, что общая картина динамики концентрации пероксидаз сохраняется, как и в случае с пшеницей сорта Саратовская-29. Хотя общее содержание ее было несколько ниже.

Внесение ЛПС в среду прорастания зерновок пшеницы сорта Добрыня привело к количественным изменениям содержания пероксидаз при сохранении общей динамики. Следует отметить, что в случае добавления ЛПС штамма SR55 содержание пероксидаз возрастало на пятые сутки, но было ниже контрольных значений, и практически сравнивалось с контрольным образцом на шестые сутки. При этом ЛПС штамма BV-S иначе влияли на динамику содержания пероксидаз. На пятые сутки концентрация пероксидаз не изменялась, по сравнению с предыдущими сутками, а на шестые сутки увеличивалась, превышая контрольные значения.

Известно, что активация пероксидаз является одной из форм системного ответа растений на стресс. Учитывая, что некоторые из их форм принимают участие в процессах лигнификации, мы исследовали динамику содержания пероксидаз в стеблях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

На рисунке 2 показано изменение активности пероксидазы в стеблях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б). Общая динамика содержания пероксидаз контрольных растений в целом соответствовала предыдущим наблюдениям. Однако внесение ЛПС приводило к увеличению содержания пероксидазы на третьи и четвертые по сравнению с контрольным образцом. При этом образцы, в которые добавляли ЛПС штаммов SR55 и SR109, содержали одинаковое количество пероксидазы на третьи сутки. На четвертые сутки общее содержание пероксидазы в контроле было почти в два раза меньше, чем на третьи сутки.



к–контроль; SR55–ЛПС *A. brasilense* SR55; SR109–ЛПС *A. brasilense* SR109; BV-S–ЛПС *A. thiophilum* BV-S

Рисунок 2 – Активность пероксидазы и оксида азота в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б).

Добавление ЛПС штамма SR55 привело к достоверному увеличению содержания пероксидазы на пятые сутки по сравнению с контрольным образцом. На шестые сутки значения практически приближались к контролю. Добавление ЛПС штамма SR109 приводило к уменьшению содержания пероксидазы по сравнению с другими образцами на шестые сутки. Следует отметить, что содержание пероксидаз в образцах, выращенных в присутствии ЛПС *A. thiophilum* BV-S, было максимальным на протяжении всего эксперимента.

Анализ содержания пероксидазы в стеблях проростков пшеницы сорта Добрыня выявило иной характер динамики. Полученные данные представлены на рисунке 2 (Б).

В течение четырех суток мы наблюдали уменьшение концентрации пероксидазы в контрольных образцах. При добавлении ЛПС штамма BV-S наблюдалось аналогичное уменьшение содержания пероксидазы, хотя на пятые и шестые сутки оно превышало контрольные значения. Добавление ЛПС штамма SR55 в среду культивирования на четвертые сутки приводило к

значительному уменьшению концентрации пероксидазы по сравнению с контрольным образцом, в остальных образцах содержание пероксидазы было больше по сравнению с контролем. Добавление ЛПС штамма SR109 приводило к незначительному, но достоверному по сравнению с контролем увеличению активности пероксидазы на третьи и шестые сутки.

Важной составляющей в регуляции ответа растений на биотический стресс, в частности на взаимодействие с ризосферными микроорганизмами, является синтез АФА, в том числе оксида азота (NO), который принимает участие в регуляции целого ряда физиологических процессов, протекающих в растении, в том числе обеспечивает формирование системного ответа на биогенный стресс.

Мы исследовали динамику изменения содержания NO в проростках пшеницы Саратовская-29 и Добрыня.

Образцы пшеницы сорта Саратовская-29, в которые добавляли ЛПС азоспирилл, практически не отличались по содержанию NO, как между собой, так и по сравнению с контрольным образцом. Единственным исключением было небольшое увеличение содержания NO под действием ЛПС бактерий штамма BV-S к концу эксперимента.

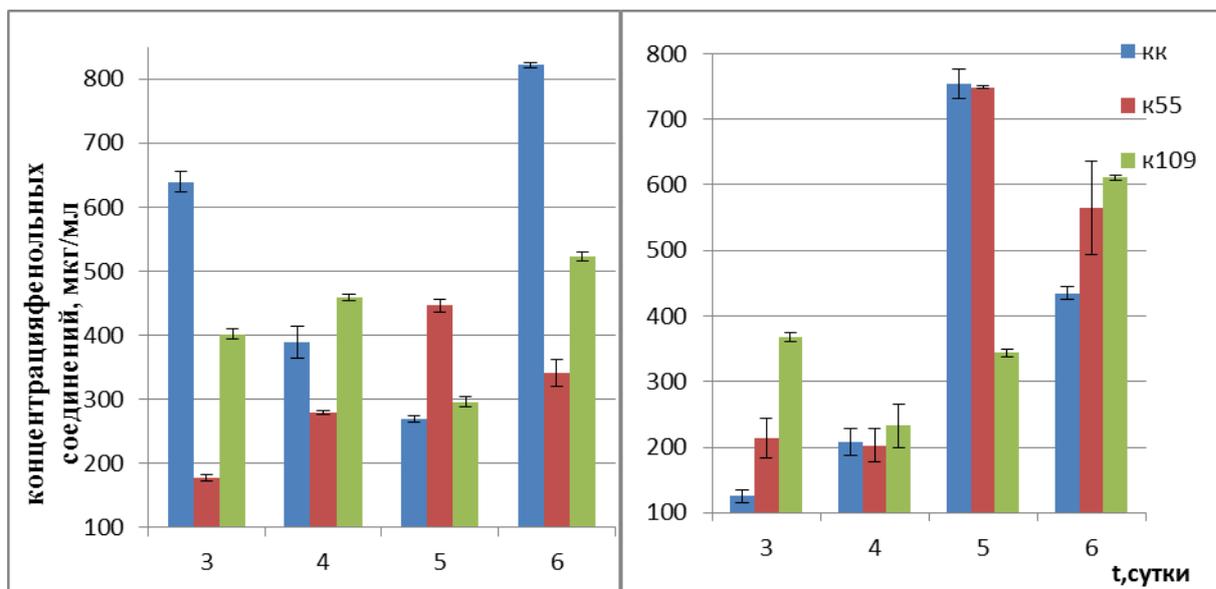
В проростках пшеницы сорта Добрыня начальное содержание NO приблизительно на 20 % выше, чем в проростках пшеницы Саратовская-29. На четвертые сутки она снижалась, хотя следует отметить, что все описанные изменения в контрольном эксперименте не превышали 10%, что свидетельствует об относительном постоянстве содержания NO в процессе прорастания зерновок. Кроме того, добавление в среду культивирования ЛПС бактерий не оказывало существенного влияния на содержание NO в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня, за исключением ЛПС сорта SR55, который вызвал увеличение содержания на шестые сутки.

Полученные нами результаты показывают, что ЛПС исследованных штаммов азоспирилл при воздействии на проростки пшеницы не приводили к значимым изменениям содержания NO в корнях. Однако, этот вопрос

требует дополнительного исследования, поскольку в литературе есть сведения о том, что скорость ферментативной продукции NO зависит от силы стрессового воздействия

На следующем этапе работы была проведена предварительная оценка динамики содержания фенольных соединений в корнях и стеблях проростков пшеницы сорта Саратовская-29. На рисунке 3 (А) показано, что на 3-и сутки концентрация фенольных соединений составила 639,2 мкг/мл тотального экстракта корней, в течение последующих двух суток оно снижалось, достигнув величины 269,4 мкг/мл, а на 6-е сутки резко возросло до величины 821,4 мкг/мл. Добавление в среду прорастания ЛПС *A. brasilense* SR55 привело к изменению содержания фенольных соединений: на 3-и, 4-е и 6-е сутки оно было значительно меньше, чем в контрольных образцах, а на 5-е сутки – превышало контрольные значения на 40 %. При этом следует отметить изменение общей динамики содержания: оно возрастало до пятых суток, а на шестые – уменьшилось на 31 % по сравнению с предыдущим днем. ЛПС *A. brasilense* SR109 на третьи сутки также снижало концентрацию фенольных соединений в корнях проростков пшеницы по сравнению с контролем, на 4-е сутки оно превышало контрольные значения на 15 %, достигая максимума к шестым суткам – 522,5 мкг/мл. При этом отмечен волновой характер изменений.

На рисунке 3 (Б) показанно содержание фенольных соединений в стеблях проростков пшеницы сорта Саратовская-29. Наименьшая концентрация фенольных соединений наблюдалась в контрольном образце на третьи сутки, затем концентрация повышалась, и на пятые сутки была максимальной, на шестые сутки снова происходило снижение до величины 434,9 мкг/мл, что было на 70 % выше, чем в первые сутки. При добавлении ЛПС азоспирилл штамма SR55 происходило резкое увеличение концентрации фенольных соединений на пятые сутки до величины 748 мкг/мл, на шестые сутки как и в случае с контрольным образцом происходило снижение концентрации. Добавление ЛПС азоспирилл штамма



А

Б

к–контроль; SR55–ЛПС *A. brasilense* SR55; SR109–ЛПС *A. brasilense* SR109; BV-S–ЛПС *A. thiophilum* BV-S

Рисунок 3 – Влияние ЛПС азоспирилл на концентрацию фенольных соединений в корнях (А) и стеблях (Б) проростков пшеницы сорта Саратовская-29.

SR109 приводило к увеличению концентрации фенольных соединений на третьей сутки по сравнению с контролем, затем их содержание снижалось до контрольных значений, с четвертых суток отмечено увеличение концентрации. При этом на 5-е сутки оно на 119 % было ниже, чем в контроле, а на 6-е – на 29 % превышало, достигая своих максимальных значений. При этом на третьей сутки концентрация фенольных соединений была выше, чем на четвертые сутки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами спектрофотометрии выявлены изменения активности пероксидазы и оксида азота в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

Установлено, что внесение липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* влияет на динамику содержания пероксидазы и оксида азота.

Таким образом, нами было показано, что содержание пероксидазы в корнях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня имеют волновую динамику, которая при действии препаратов ЛПС азоспирилл сохраняется. Выявлены количественные изменения содержания пероксидазы в корнях проростков пшеницы под действием ЛПС. Обнаружены сортовые различия содержания пероксидазы и оксида азота в корнях проростков пшеницы. Отмечено относительное постоянство содержания NO при прорастании пшеницы в контроле и в присутствии препаратов ЛПС азоспирилл.

Следует отметить, что внесение в среду прорастания зерновок пшеницы ЛПС азоспирилл приводило к количественным и качественным изменениям содержания фенольных соединений в корнях и побегах проростков пшеницы. Динамика отмеченных изменений зависела от особенностей ЛПС, что позволяет предположить, что фенольные соединения играют определенную роль в формировании ассоциации пшеницы и бактерий рода *Azospirillum*.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что препараты ЛПС *A. brasilense* SR55 и SR109, а также ЛПС *A. thiophilum* BV-S приводят к количественным изменениям содержания пероксидазы в проростках пшеницы сорта Саратовская-29, не влияя на волновой характер динамики при прорастании.

2. Показано, что содержание пероксидазы в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня на 10% ниже, а содержание NO на 20% выше, чем у сорта Саратовская-29.
3. Обнаружено, что изменение содержания NO в корнях проростков пшеницы сорта Саратовская-29 происходит только под действием препарата *A. thiophilum* BV-S на 6 сутки (на 12%). В корнях проростков пшеницы сорта Добрыня достоверное увеличение содержания NO на 4% вызывал препарат ЛПС *A. brasilense* SR55.
4. Обнаружено, что препараты ЛПС *A. brasilense* SR55 и SR109 приводят к качественным и количественным изменениям динамики содержания фенольных соединений в проростках пшеницы.