

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

Кафедра биохимии и биофизики

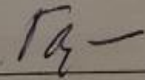
СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДАЗ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В ПРИСУТСТВИИ
КОМПОНЕНТОВ ПОВЕРХНОСТИ АЗОСПИРИЛЛ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления подготовки 06.03.01 - Биология
биологического факультета
Татовосовой Виктории Сергеевны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

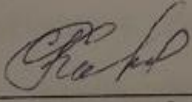


20.06.22

А. А. Галицкая

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор



20.06.22 г.

С. А. Коннова

Саратов 2022 год

ВВЕДЕНИЕ

Пшеница – экономически значимая культура. Урожайность и обеспечение зерном является важной проблемой. Исходя из этого актуальной становится задача повышения урожайности пшеницы. Данную проблему можно решить применением биологических или химических удобрений. Зачастую действие биологических удобрений достигается за счёт каких-либо ассоциаций или консорциев, что приводит к более быстрому росту растений, увеличению биомассы и урожайности при минимальном негативном воздействии на окружающую среду.

Выделяют группу бактерий, условно названную PGPR (ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений). Такие бактерии колонизируют корни растений, усиливая рост растений.

К данной группе относятся бактерии рода *Azospirillum*. Способность азоспирилл колонизировать ризосферу зависит от нескольких свойств бактерий, таких как хемотаксис по отношению к корневым экссудатам, антагонизм по отношению к конкурирующим микроорганизмам, образование кист, позволяющее выживать в неблагоприятных условиях и, главное, способность связываться с корнями растений и почвенными частицами. Выделяют 2 этапа образования ассоциации между бактериями и растениями. Первый этап представляет собой быструю и слабую адсорбцию и зависит от бактериального поверхностного белка. Вторая стадия состоит в прочном закреплении адсорбированных и свободных бактерий с помощью бактериального внеклеточного полисахарида.

Однако, в отличие от бобово-ризобияльного симбиоза механизм формирования ассоциаций пшеницы и ризосферных бактерий изучен довольно слабо. Поскольку взаимодействие корней растений с поверхностными компонентами бактерий, в том числе ЛПС, является первым этапом в формировании ассоциаций, актуальным вопросом остается

формирование ответных реакций растения на контакт с бактериальной клеткой.

Цель данной работы – оценить влияние поверхностных структур бактерий рода *Azospirillum* на некоторые ответные реакции растений пшеницы на первых этапах прорастания.

Достижение указанной цели осуществлялось путём решения следующих задач:

1) Выявить изменение морфометрических показателей проростков пшеницы в присутствии липополисахаридов (ЛПС) бактерий рода *Azospirillum*.

2) Определить влияние поверхностных структур бактерий рода *Azospirillum* на содержание фенольных соединений в корнях проростков пшеницы.

3) Оценить влияние ЛПС бактерий рода *Azospirillum* на содержание пероксидаз в корнях проростков пшеницы.

Объектом исследований была выбрана пшеница Саратовская-29.

Другим объектом исследования служили препараты ЛПС, полученные из бактерий рода *Azospirillum*:

- ЛПС *A. brasilense* SR109 (выделен из ризосферы кукурузы);
- ЛПС *A. thiophilum* BV-S (выделен из соленых почв).

Определение суммы фенольных соединений проводили методом Фолина-Чокалтеу, содержание пероксидазы– с использованием в качестве субстрата *o*-фенилендиамина, определение количества углеводов– с помощью реакции определения содержания углеводов без предварительного гидролиза полисахарида с фенолом и серной кислотой.

Работа состоит из 5 глав: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен из 39 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для достижения данной цели и задач мы исследовали влияние ЛПС бактерий рода *Azospirillum* на изменение морфометрических показателей проростков пшеницы, а также на содержание фенольных соединений и пероксидаз в корнях и стеблях проростков пшеницы Саратовская-29.

Поверхность семян, как правило, содержит споры различных бактерий и грибов. Правильная поверхностная стерилизация семян и проращивание в асептических условиях позволяет достигнуть сохранения целостности тканей и провести эксперимент с необходимой точностью измерений. Кроме того, это позволит исключить действие сопутствующей микрофлоры, которая может исказить эффект исследуемых компонентов бактериальной поверхности.

Все семена были разделены на 3 группы:

1. Контрольную группу проращивали на автоклавированной среде Кнопа.
2. Первую экспериментальную группу – на среде Кнопа в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 в количестве 0,125 г/мл.
3. Вторую экспериментальную группу – на среде Кнопа в присутствии ЛПС *A. thiophilum* BV-S в количестве 0,125 г/мл.

Перед использованием в препаратах ЛПС определили количество углеводного компонента с помощью фенол-серной реакции. Оно составило $32,67 \pm 0,20$ мкг/мл для препарата ЛПС *A. brasilense* SR109 и $49,33 \pm 0,20$ мкг/мл для ЛПС *A. thiophilum* BV-S.

После проращивания семян пшеницы корни и стебли были отделены, затем было проведено измерение длины.

Средняя длина корней проростков пшеницы на 10 сутки составила в контроле $0,89 \pm 0,049$ см. При проращивании в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 средняя длина корней составила $8,00 \pm 0,60$ см, *A. thiophilum* BV-S – $5,00 \pm 0,01$ см.

Средняя длина стеблей проростков пшеницы на 10 сутки составила $13,15 \pm 0,58$ см. При проращивании в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 средняя длина корней составила $18,00 \pm 0,30$ см, *A. thiophilum* BV-S – $17,00 \pm 0,06$ см.

Среднее значение массы корней пшеницы на 10 сутки составила $1,22 \pm 0,12$ г. При проращивании в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 средняя масса корней составила $2,70 \pm 0,13$ г, *A. thiophilum* BV-S – $2,03 \pm 0,13$ г.

Среднее значение массы стеблей пшеницы на 10 сутки составила $1,16 \pm 0,04$ г. При проращивании в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109 средняя масса корней составила $2,90 \pm 0,08$ г, *A. thiophilum* BV-S – $2,20 \pm 0,07$ г.

Таким образом, внесение в среду прорастания препаратов поверхности азоспирилл приводит к увеличению средней длины корней проростков на 798,9% и массы – на 121,3% для ЛПС *A. brasilense* SR109. Добавление в среду ЛПС свободноживущего штамма *A. thiophilum* BV-S вызвало увеличение длины корней проростков на 461,8%, массы – на 66,4%.

Увеличение длины и массы проростков говорит об увеличении процессов синтеза в стеблях и корнях. Следовательно, ризосферные бактерии обладают бóльшим ростостимулирующим действием.

На сегодняшний день наблюдается быстрое изменение условий среды, которое, вероятно, перевешивает адаптационный потенциал растений. Эти экологические изменения в основном связаны с антропогенной деятельностью. Кроме того, растения подвергаются естественным климатическим стрессам, например, высокая радиация, жара, дисбаланс питательных веществ.

Поскольку растения являются сидячими организмами и имеют лишь ограниченные механизмы предотвращения стресса, им нужны гибкие средства для адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды.

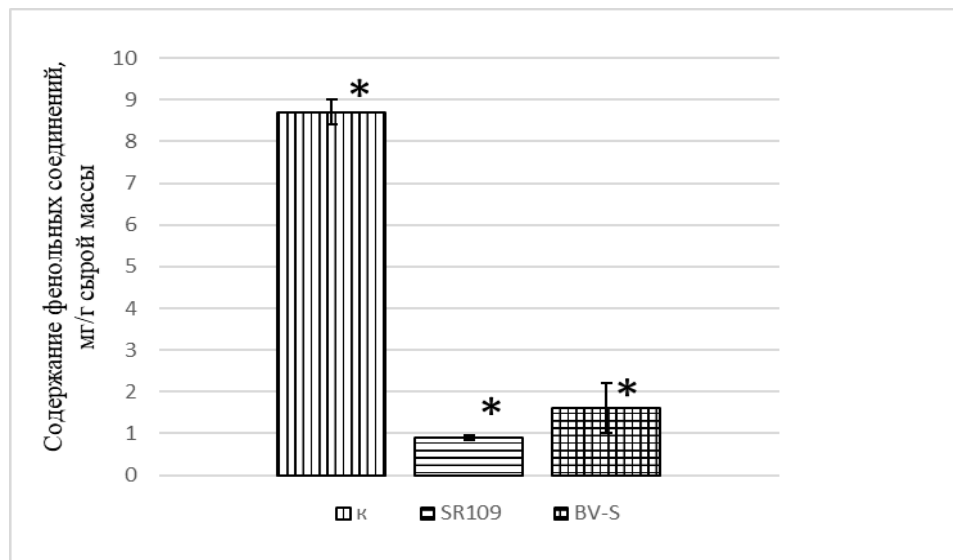
Общим последствием большинства абиотических и биотических стрессов является то, что на определенной стадии стрессового воздействия они приводят к увеличению продукции активных форм кислорода. Контроль уровня оксидантов достигается с помощью антиоксидантных систем.

Фенольные соединения являются одними из примеров антиоксидантов. Они повсеместно распространены в растениях, и вторгшийся патоген сталкивается с ними на поверхности листьев, а почвенные патогены - в ризосфере. Кроме того, ряд авторов рассматривает фенольные соединения не только как компоненты защитной системы растений, но и как возможных участников первых этапов «узнавания» микро- и макропартнеров при формировании симбиотических/ассоциативных отношений.

Мы исследовали содержание фенольных соединений в проростках пшеницы и изменение их количества при добавлении ЛПС азоспирилл в среду для культивирования.

В результате было выяснено, что в корнях содержание фенольных соединений сильно уменьшалось по сравнению с контролем.

Количество фенольных соединений в контрольных образцах составляло $8,7 \pm 0,3$ мкг/г сырой массы. При добавлении ЛПС содержание фенольных соединений сильно снижалось. В проростках пшеницы, выращенной на среде с добавлением ЛПС *A. brasilense* SR 109 количество фенолов было $0,90 \pm 0,06$ мкг/г, *A. thioophilum* BV-S – $1,6 \pm 0,6$ мкг/г. Результаты исследований представлены на рисунке 1.



к – контроль; SR 109 – проращивание в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109; BV-S – проращивание в присутствии ЛПС *A. thiophilum* BV-S; * – различия достоверны по отношению к контролю (для $p < 0,999$)

Рисунок 1– Содержание фенольных соединений в корнях проростков пшеницы Саратовская-29

ЛПС азоспирилл так же снижало количество фенольных соединений в стеблях проростков.

Пшеница, пророщенная без добавления ЛПС, содержала $14,87 \pm 0,50$ мкг/г фенольных соединений. При добавлении ЛПС *A. brasilense* SR109 содержание фенолов составляло $6,06 \pm 0,30$ мкг/г, *A. thiophilum* BV-S – $7,8 \pm 0,2$ мкг/г.

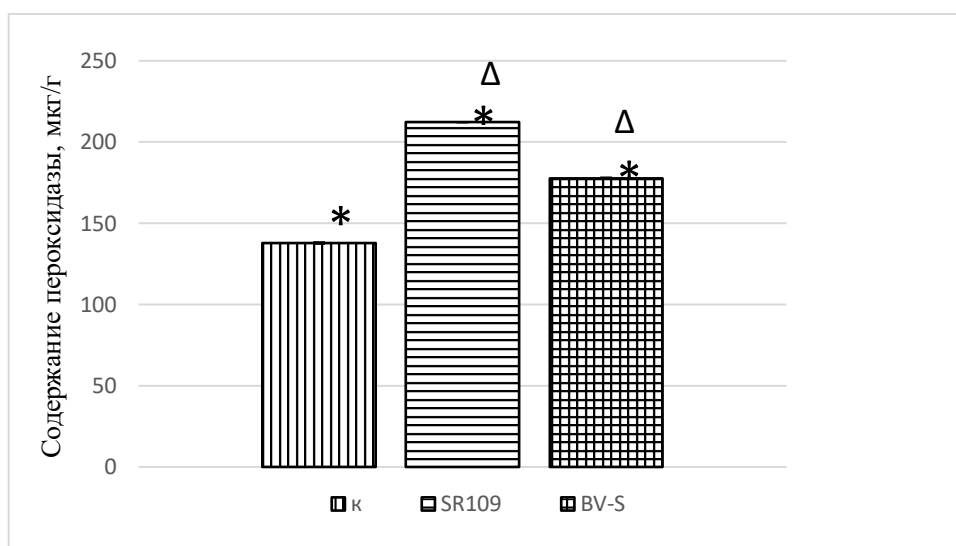
Таким образом, было выяснено, что добавление в среду культивирования ЛПС бактерий значительно изменило содержание фенольных соединений в корнях и стеблях проростков пшеницы, уменьшив их количество.

Воздействие поверхностных структур *A. brasilense* SR109 на проростки вызвало уменьшение фенольных соединений корней на 89,7%. При добавлении в среду ЛПС *A. thiophilum* BV-S количество фенольных соединений уменьшилось на 81,6%.

Пероксидазы играют защитную роль против АФК, производимых в избытке в условиях экологического стресса. В связи с этим уровень их

экспрессии часто отражает возникновение биотических и абиотических стрессов.

Мы исследовали содержание пероксидазы в корнях и стеблях пшеницы на 10 сутки проращивания. Было выяснено, что наибольшее количество фермента в корнях содержится в пшенице, выращенной на среде Кноппа с добавлением ЛПС *A. brasilense* SR109 ($212,15 \pm 0,80$ мкг/мл). При добавлении в среду ЛПС *A. thiophilum* BV-S количество пероксидазы составляло $177,78 \pm 0,40$ мкг/мл. Наименьшее содержание фермента было в контрольных образцах пшеницы и составляло $137,84 \pm 0,50$ мкг/мл. Результаты исследований представлены на рисунке 2.



к – контроль; SR 109 – проращивание в присутствии ЛПС *A. brasilense* SR109; BV-S – проращивание в присутствии ЛПС *A. thiophilum* BV-S; * – различия достоверны по отношению к контролю (для $p < 0,999$);

Δ – различия достоверны для $p < 0,999$ между ЛПС *A. brasilense* SR109 и ЛПС *A. thiophilum* BV-S

Рисунок 2– Содержание пероксидазы в корнях проростков пшеницы Саратовская-

29

При исследовании стеблей пшеницы на содержание пероксидазы мы выяснили, что добавление ЛПС бактерий в среду уменьшает количество фермента. Количество пероксидазы пшеницы, пророщенной на среде с

добавлением ЛПС *A. Brasilense* SR 109 составляло $50,2 \pm 0,2$ мкг/мл, ЛПС *A. thiophilum* BV-S – $72,1 \pm 0,2$ мкг/мл. В контроле было отмечено наибольшее количество пероксидазы значительно превышающее образцы с ЛПС ($125,0 \pm 0,7$ мкг/мл).

Таким образом, добавление ЛПС бактерий рода *Azospirillum* в среду для культивирования значительно повлияло на содержание пероксидазы в проростках пшеницы Саратовская-29. При этом ЛПС разных штаммов бактерий оказывали неодинаковое влияние на изменение количества фермента. В стеблях пшеницы ЛПС значительно уменьшало содержание пероксидазы, при этом при добавлении ЛПС *A. Brasilense* SR109 содержание пероксидазы было более чем в 2 раза меньше по сравнению с контролем.

При этом в корнях ЛПС оказывало противоположное влияние, повышая содержание пероксидазы. Наибольшее количество фермента наблюдалось у проростков, выращенных на среде, содержащей ЛПС *A. Brasilense* SR109, количество пероксидазы было увеличено на 53,9%. В случае с ЛПС *A. thiophilum* BV-S количество фермента увеличилось на 28,9%. Это может быть объяснено различной природой бактерий.

Azospirillum Brasilense SR109 является ризосферной бактерией, что обеспечивает ей больший контакт с корнями растения. *Azospirillum thiophilum* BV-S – свободноживущая бактерия, индифферентная к растениям. В связи с этим ЛПС *A. Brasilense* SR109 вызывает более сильный биотический стресс, сопровождающийся большим увеличением пероксидазы в корнях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было изучено влияние поверхностных структур бактерий рода *Azospirillum* на некоторые ответные реакции пшеницы Саратовская-29 на первых этапах прорастания.

Было показано, что добавление в среду прорастания поверхностных структур бактерий *Azospirillum* привело к увеличению средней длины корней

проростков в 8 раз в случае ризосферного штамма *A. brasilense* SR109 и увеличению в 5 раз в присутствии свободноживущего штамма *A. thiophilum* BV-S. Это сопровождалось увеличением средней массы корней на более чем в 2 раза при добавлении ЛПС *A. brasilense* SR109 и увеличением на 66% при добавлении ЛПС *A. thiophilum* BV-S.

Также добавление ЛПС бактерий значительно повлияло на содержание фенольных соединений и пероксидаз проростков пшеницы. Следует отметить различия в изменениях при добавлении ЛПС разных видов бактерий.

Являясь ризосферной бактерией, *A. brasilense* SR109 вызывает большой биотический стресс у растения. При этом содержание пероксидазы в корнях увеличивается на 54%, а общее количество фенольных соединений уменьшается на 90%.

Свободноживущая бактерия *A. thiophilum* BV-S оказывает меньшее влияние на растение, являясь индифферентной. При добавлении в среду препарата ЛПС *A. thiophilum* BV-S содержание пероксидазы увеличивается на 30%, количество фенольных соединений снижается на 82%.

ВЫВОДЫ

1. Добавление в среду прорастания поверхностных структур бактерий *Azospirillum* оказывает ростостимулирующее действие по отношению к проросткам пшеницы. Показано увеличение средней длины и массы корней проростков в 8 раз и более чем в 2 раза соответственно в случае ризосферного штамма *A. brasilense* SR109.
2. Свободноживущий штамм *A. thiophilum* BV-S в меньшей степени приводил к увеличению средней длины и массы корней: в 5 раз и на 66% соответственно.
3. Обнаружено, что компоненты поверхности азоспирилл приводят к снижению синтеза фенольных соединений в проростках пшеницы. Воздействие ЛПС *A. brasilense* SR109 на проростки вызвало уменьшение фенольных соединений в корнях и стеблях на 90% и 59% соответственно.

При добавлении в среду ЛПС *A. thiophilum* BV-S количество фенольных соединений в корнях и стеблях уменьшилось на 82% и 48% соответственно.

4. Показано, что проращивание пшеницы в присутствии липополисахаридов азоспирилл приводит к увеличению содержания пероксидаз. Выявлено увеличение количества пероксидазы корней и стеблей проростков на 54 % и 62% соответственно в случае ризосферного штамма *A. brasilense* SR109. Штамм *A. thiophilum* BV-S приводил к увеличению содержания пероксидазы корней и стеблей на 30% и 42% соответственно.

Лис