

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА
ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И СОДЕРЖАНИЕ
ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

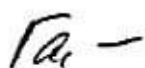
Студентки 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Башировой Сабины Нияз кызы

Научный руководитель
доцент, канд. биол. наук



подпись, дата
30.05.22

А. А. Галицкая

Зав. кафедрой:
профессор, док. биол. наук



подпись, дата
30.05.22

С. А. Коннова

Саратов 2022

Введение

Актуальность работы. Известно, что необходимой предпосылкой для инфекции является прикрепление бактериальных клеток к растущему кончику корневого волоска растения. Для привлечения бактерий-ассоциантов растения экскретируют в почву аттрактанты, к которым относятся, например, флавоноиды. Эти соединения фенольной природы иницируют таксис бактерий и способствуют взаимному узнаванию микро- и макропартнеров. Это в свою очередь индуцирует определенные сигнальные системы и запускает защитные ответы растения. Поскольку механизм взаимодействия растений и ассоциативных бактерий изучен слабо, мы решили определить, какие ответные реакции растения включаются при контакте с компонентами их поверхности.

Цель и задачи исследования. Целью представляемой работы являлось выявление изменения содержания фенольных соединений и показателей оксидативного стресса в проростках пшеницы при прорастании в присутствии липополисахаридов бактерий.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) определить влияние ЛПС различных штаммов азоспирилл на содержание фенольных соединений в проростках пшеницы сорта Саратовская-29;
- 2) определить влияние ЛПС различных штаммов азоспирилл на содержание пероксидазы и NO в проростках пшеницы сорта Саратовская-29;
- 3) о влияние состава питательной среды на содержание фенольных соединений и показателей оксидативного стресса.

Материалы и методы исследования. В работе использовали яровую мягкую пшеницу сорта Саратовская 29 урожая 2015 года, которая была любезно предоставлена сотрудниками кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н.Г. Чернышевского.

Препараты ЛПС бактерий *A. brasilense* SR109, а также ЛПС *A. thiophilum* BV-S были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории биохимии ИБФРМ РАН.

Поверхностно стерилизованные зерновки пшеницы проращивали на чашках Петри. После этого чашки переносили в термостат на 27°C на сутки. Культивирование в течение 2^{-х} – 3^{-х} суток продолжали в чашках Петри, а затем, на 4-е сутки их переносили в стерильные контейнеры, предварительно внося в них по 50 мл стерильной питательной среды. Весь период роста проростки находились в термостате при температуре 27°C.

Длину корней и стеблей проростков измеряли линейкой, результаты записывали в таблицу и проводили статистическую обработку данных. Затем с помощью скальпеля отрезали от проростков корни и стебли, гомогенизировали их отдельно пестиком в фарфоровой ступке до однородной массы вместе с 20 мл этилового спирта 95% концентрации. Растительный материал нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут с момента закипания водно-спиртовой смеси. После окончания смесь фильтровали, в круглодонную колбу и упаривали досуха на роторном вакуумном испарителе при 60 °C. После упаривания сухой остаток растворяли 95% спиртом [1].

Количественное определение содержания фенольных соединений в корневых экстрактах пшеницы оценивали колориметрически по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси [2].

Для определения содержания пероксидазы растительный материал растирали в охлажденном цитрат-фосфатном буфере, pH 4,5. На 1 мг сырого растительного материала добавляли 10 мл буфера. Экстракцию проводили в течение 1 ч при 4°C. Гомогенат центрифугировали 10 минут при 14000g. Определение содержания пероксидазы проводили в планшетах для иммунохимических реакций. К 0,5 мл надосадочной жидкости (супернатанта) добавляли 5 мл 0,05 %-ного раствора о-фенилендиамина в цитратно-фосфатном буфере (pH 4,5) и 10 мкл 33%-ной перекиси водорода. Через 20

секунд реакцию останавливали добавлением 0,5 мл концентрированной серной кислоты. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли с помощью спектрофотометра при длине волны 490 нм. Контрольный раствор готовили по той же схеме, но вместо растительного экстракта добавляли равный объем цитрат-фосфатного буфера [3].

Содержание пероксидазы определяли по калибровочной кривой, построенной по пероксидазе хрена, и выражали в мкг фермента на 1 мл экстракта.

Количество оксида азота определяли спектрофотометрически, используя реактив Грисса [4]. Измерения проводили в трехкратной биологической и аналитической повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Excel пакета Microsoft Office.

Содержание углеводов в ЛПС определяли фенол-серной реакцией.

Структура и объем работы. Работа включает в себя такие структурные элементы, как Содержание, Обозначения и сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа проиллюстрирована 14 рисунками и 1 таблицей. Список литературы состоит из 83 наименований. Объем работы составляет 65 страниц.

Основное содержание работы

Глава «Обзор литературы» содержит анализ литературных данных по общей характеристике фенольных соединений, классификации фенольных соединений, об общих сведениях о флавоноидах, кумаринах и антоцианах, о фенольных соединениях как аттрактантах для бактерий при формировании различных форм симбиоза, о современных представлениях механизмов окислительного стресса, об участии активных форм кислорода и пероксидазы в механизмах окислительного стресса, об оксиде азота NO и его функции в растениях, об общей характеристике бактерий рода *Azospirillum* и их липополисахаридах.

В главе «Материалы и методы» описаны объекты исследования и использованные методы.

Глава «Результаты и обсуждение»: ЛПС охарактеризовали с точки зрения содержания углеводного компонента, что позволяет оценить количество действующего вещества. В ЛПС *A. brasilense* SR109 количество углеводов составляет $0,5 \pm 0,001$ мг/мл, а в ЛПС *A. thiophilum* BV-S количество углеводов составляет $0,7 \pm 0,0005$ мг/мл.

Проращивание зерновок пшеницы в присутствии ЛПС азоспирилл различных штаммов привело к достоверным изменениям средней длины корней и побегов. В присутствии ЛПС ризосферного штамма средняя длина корней выросла в 5 раз, в то время как в присутствии ЛПС свободноживущего в 6 раз. При этом изменение средней длины для наземной части побегов прошло в меньшей степени, по сравнению с контролем. В случае действия ризосферного штамма, длина побегов превышала длину корней почти в 6 раз, в присутствии свободноживущего в 2 раза. Причем различия в этих величинах тоже являются достоверными. Известно, что фенольные соединения растений, в первую очередь флавоноиды, являются аттрактантами для многих ризосферных организмов. Поскольку основной их синтез происходит в наземной части побегов, это приводит к быстрому развитию надземной части, и некоторому замедлению роста корневой системы, по сравнению с реакцией проростков на действие ЛПС свободноживущего штамма.

На первом этапе было проведено количественное определение содержания фенольных соединений в экстрактах корней и побегов пшеницы сорта Саратовская-29 колориметрически по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси [2].

Показано, что концентрация фенольных соединений в корнях контрольных образцов составляет $8,7 \pm 0,3$ мг/г сырой биомассы. При этом добавление при проращивании ЛПС бактерий приводит к снижению количества фенольных соединений почти в 10 раз до $0,9 \pm 0,06$ мг/г сырой биомассы в случае *A. brasilense* SR109, и $1,6 \pm 0,5$ мг/г сырой массы при

добавлении ЛПС *A. thiophilum* BV-S. Однако, содержание фенольных соединений при добавлении ЛПС бактерий *A. thiophilum* BV-S в 1,8 раз выше, чем при добавлении ЛПС бактерий *A. brasilense* SR109. При этом следует отметить, что бактерии имеют различные экологические ниши: *A. brasilense* SR109 является ризосферным микроорганизмом, а *A. thiophilum* BV-S – свободноживущий. Снижение количества фенольных соединений можно рассматривать с разных точек зрения. Например тем, что данные бактерии не являются микропартнёрами для пшеницы, не вступают в ассоциативные отношения, и при этом не являются фитопатогенными.

Известно, что синтез фенольных соединений проходит в зеленой части побегов, поэтому представлялось интересным оценить влияние присутствия ЛПС на их количество в зеленой части проростков. Показана концентрация фенольных соединений в контрольных образцах побегов пшеницы сорта Саратовская-29. Она составляет $14,87 \pm 0,5$ мг/г сырой массы, что намного выше, чем при добавлении ЛПС бактерий *A. brasilense* SR109 и ЛПС *A. thiophilum* BV-S. Однако, если сравнивать содержание фенольных соединений при добавлении ЛПС бактерий *A. thiophilum* BV-S ($6,06 \pm 0,3$ мг/г сырой массы) с изменением концентрации ФС при добавлении ЛПС бактерий *A. brasilense* SR109 ($7,8 \pm 0,2$ мг/г сырой биомассы), то можно заметить, что концентрация ФС в 1,3 раза выше при добавлении ЛПС бактерий *A. thiophilum* BV-S.

NO оказывает антиоксидантное действие, повышая устойчивость к абиотическим стрессам. Было отмечено, что NO выполняет еще и стимулирующую функцию, воздействуя на показатели отдельных частей роста растений, а также целого растения. Поэтому на втором этапе работы мы исследовали изменение содержания NO в корнях и побегах проростков пшеницы Саратовская-29 при введении в среду культивирования компонентов поверхности азоспирилл.

Образцы, в которые добавляли ЛПС *A. brasilense* SR109 и ЛПС *A. thiophilum* BV-S сильно отличались по содержанию оксида азота, как между собой, так и по сравнению с контрольным образцом. Концентрация оксида

азота при добавлении ЛПС штамма SR109 составляла $\approx 7,59 \pm 0,03$ мкг/г сырой массы, что почти в 2 раза больше концентрации оксида азота при добавлении ЛПС штамма BV-S, концентрация оксида азота которого составляла $\approx 14,77 \pm 0,94$ мкг/г сырой массы.

Было обнаружено, что в стеблях проростков пшеницы сорта Саратовская-29 с добавлением ЛПС штамма SR109, и штамма BV-S, общее содержание оксида азота увеличивалось. При добавлении ЛПС штамма SR109 общее содержание составляло $\approx 214,43 \pm 3,56$ мкг/г сырой массы, а при добавлении ЛПС штамма BV-S общее содержание составляло $\approx 263,01 \pm 4,37$ мкг/г сырой массы, при том что концентрация в контроле составляла $\approx 188,06 \pm 14,5$ мкг/г сырой массы.

Поскольку взаимодействие с бактериями является для растений стрессовым фактором и запускает в растении ответные реакции, в том числе активизирует синтез АФА и АФК, можно предположить, что в растении будет увеличиваться активность защитных механизмов, в том числе пероксидазы. Нами было показано, что при проращивании происходит увеличение активности пероксидазы, в случае с SR109 в 1,5 раза, при этом ЛПС BV-S также привел к увеличению пероксидазы, но в меньшей степени.

На следующем этапе мы смотрели содержание пероксидазы в побегах проростков пшеницы сорта Саратовская-29.

Внесение ЛПС в среду прорастания зерновок пшеницы сорта Саратовская-29 привело к количественным изменениям содержания пероксидазы в побегах. Отмечено, что в контрольных образцах содержание пероксидазы было выше чем в образцах штамма BV-S и SR109 и составляло $\approx 125,00 \pm 0,7$ мкг/г сырой массы. Мешенью ЛПС являются корни, поэтому содержание пероксидазы в корнях по сравнению с побегом больше.

Далее мы смотрели как состав среды влияет на содержание NO в корнях в присутствии ЛПС.

Мы наблюдали, что содержание NO в образцах, выращенных на среде Кнопа в целом выше, чем в образцах, выращенных на среде Фареуса. Также

содержание оксида азота в образцах, выращенных на среде Кнопа при добавлении ЛПС SR109, составляло $7,59 \pm 0,33$ мкг/г сырой массы, которое незначительно отличалось от образцов, выращенных на среде Фареуса, содержание оксида азота которого было $7,137 \pm 0,116$ мкг/г сырой массы.

Затем мы смотрели как состав среды влияет на содержание пероксидазы в корнях в присутствии ЛПС.

В данном случае мы наблюдали что содержание пероксидазы также было выше в образцах, выращенных на среде Кнопа. Самое высокое содержание пероксидазы было в образцах, выращенных на среде Кнопа при добавлении ЛПС SR109, которое составляло $212,45 \pm 0,8$ мкг/мл, самое низкое содержание было в образцах, выращенных на среде Фареуса, которое составляло $2,56 \pm 0$ мкг/мл.

На последнем этапе мы смотрели как состав среды влияет на содержание фенольных соединений в корнях в присутствии ЛПС.

При сравнении содержания фенольных соединений не было выявлено достоверных различий ни в контрольных, ни в опытных вариантах, из чего можно предположить, что форма азота в составе питательной среды не оказывает значительного влияния на этот показатель.

Выводы

- 1 Обнаружено, что препараты ЛПС азоспирилл приводят к снижению содержания фенольных соединений в корнях проростков пшеницы по сравнению с контролем в 10 раз для *A. brasilense* SR109 и в 5 раз для *A. thiophilum* BV-S. В надземной части проростков тенденция к снижению сохраняется, но выражена в меньшей степени: в 2,5 и 2 раза соответственно.
- 2 Показано, что препараты ЛПС *A. brasilense* SR109 и ЛПС *A. thiophilum* BV-S приводят к увеличению содержания пероксидазы в корнях проростков пшеницы сорта Саратовская-29 на 50 и 30% соответственно. При этом содержание

пероксидаз в надземной части проростков в присутствии ЛПС азоспирилл снижается в среднем в 2 раза.

- 3 Выявлено снижение содержания NO в корнях проростков пшеницы в присутствии ЛПС азоспирилл в 4 раза для ЛПС *A. brasilense* SR109 и в 2 раза для ЛПС *A. thiophilum* BV-S. Для надземной части проростков показано достоверное увеличение содержания оксида азота (II) на 14 и 40% соответственно.
- 4 Установлено, что состав питательной среды влияет на численные значения содержания пероксидазы и оксида азота (II) как показателей окислительного стресса, и не приводят к изменению количества фенольных соединений.

Список литературы

- 1 Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетке обыкновенной / Д.И. Лесовой [и др.] // Химия растительного сырья –2000. №1. – С. 85-88.
- 2 Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие / Г.В. Сибгатуллина [и др.]. Казань, – 2011. – С. 61.
- 3 Способ определения пероксидазной активности в биологических жидкостях / Л.Ф. Азнабаева [и др.] / Заявка 2000125850/14 от 13.10.2000. Оpubл. 27.02.2002.
- 4 Zhou, B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *stylosanthes quianensis* / B. Zhou [et al.] // J. Exp. Bot. – 2005. – V.56, N. 422. – P. 3223-3228.

