

свойств грибов рода *Chaetomium* исследования полученные данные в лабораторных условиях были подтверждены на полевых опытах.

In this article exploring in laboratory and field conditions fungicidal quality of cellulosedestruction mushrooms *Chaetomium* against stimuli rooted decay of barley mushrooms *Fusarium* and *Bipolaris*. In result antagonistic qualities of mushrooms *Chaetomium* investigations obtained datum in laboratory conditions there were confirmed on field experiences

С.А. Аленькина, К.А. Трутнева, В.Е. Никитина

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ НА СОДЕРЖАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

(Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов (Россия),
e-mail: alenkina@ibppm.sgu.ru)

*В настоящей работе изучено в динамике изменение эндогенного содержания и соотношение свободной и связанной форм салициловой кислоты в корнях проростков пшеницы при воздействии лектинов двух штаммов азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7 и его мутанта по лектиновой активности *A. brasilense* Sp7.2.3. Установлены различия в ответной реакции растений на воздействие лектинов этих двух штаммов. Полученные данные свидетельствуют о том, что лектины азоспирилл способны выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы*

Необходимым условием развития экологического земледелия является создание методов и технологий формирования, поддержания эффективного функционирования высокоинтегрированных микробно-растительных систем, сочетающих в себе полезные свойства и растений, и микроорганизмов. В настоящее время информации о функционировании ассоциативных симбиозов пока еще недостаточно для глубокого понимания этого явления, и многие вопросы остаются пока неясными. Кроме общепризнанных ведущих факторов, синтеза фитогормонов и вклада в азотное питание растений за счет фиксации молекулярного азота, несомненно, существует и ряд других аспектов позитивного воздействия микропартнера ассоциативного симбиоза на жизнедеятельность макропартнера.

Учитывая функциональные особенности гемагглютинирующих белков азоспирилл было выдвинуто предположение, что лектины наряду с другими поверхностными структурами способны участвовать не только в адгезии бактерий на корнях растений [1], но и влиять на метаболизм растительной клетки. Действительно, оказалось, что лектины способны стимулировать прорастание семян [2], проявлять по отношению к растительной клетке митогенную и ферментмодифицирующую активности [3, 4], изменять уровень сигнальных соединений - цАМФ, оксида азота (NO), перекиси водорода в корнях проростков пшеницы, и тем самым участвовать в формировании защитных реакций растений [5, 6].

Частью защитных реакций растений является увеличение уровня салициловой кислоты (СК) в растительной клетке. Известно, что под воздействием различных биогенных факторов содержание СК в тканях растений может возрастать в десятки раз [7].

Задачей настоящего исследования явилось изучение влияния лектинов азоспирилл на содержание СК в корнях проростков пшеницы.

Объектом исследования служили два штамма азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7, полученный из Института микробиологии РАН (г. Москва) и *A. brasilense* Sp7.2.3 – мутант по лектиновой активности [8], а также корни проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29.

Культуры азоспирилл выращивали на жидкой синтетической среде для флокуляции при 37°C в течение 18 ч [9].

Выделение лектинов с поверхности клеток проводили методом Eshdat и Sharon [10].

Очищенные препараты лектинов получали ранее описанным способом [5].

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [11].

В работе использовали 3-суточные проростки пшеницы. Семена стерилизовали 1 мин 60%-ным этанолом и проращивали на дистиллированной воде при 22°C.

Для изучения влияния лектинов на содержание СК корни проростков инкубировали с растворами лектинов в течение двух часов. Контролем служили корни, не обработанные растворами лектинов.

Получение свободной и связанной форм СК проводили по методу, изложенному в работе [12]. 1г корней был тщательно отмыт дистиллированной водой и фиксирован горячим 96%-ным этанолом.

Корни гомогенизировали, затем СК экстрагировали из корней 80% кипящим этанолом. Экстракт был разделен на две части для получения свободной и связанной форм СК. Определение содержания СК проводили на газовом хроматографе Shimadzu GH-2010 (Япония) с использованием колонки Eguity-1 (Supelco) при температуре 200°.

ФАЛ (КФ 4.3.1.5) экстрагировали из тканей проростков 0.1 М боратным буфером с pH 8.8 при +4°С в течение 30 мин при соотношении масса:объем 1:17. Реакционная смесь состояла из 0.1 мл ферментного препарата и 0.4 мл боратного буфера pH 8.8, содержащего 12 мМ L-фенилаланина. В контроль вместо фермента добавляли 0.1 мл боратного буфера. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°С. Активность фермента определяли спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности при 290 нМ. Активность ФАЛ выражали в единицах оптической плотности (ΔЕ/г сырой массы)[13].

Опыты проводили в 3-кратной биологической и 5-кратной аналитической повторностях. Цифровой материал обработан статистически с помощью программы «Анализ данных электронных таблиц Microsoft Excel». В таблицах приведены средние арифметические из всех определений и их стандартные отклонения.

Как уже было отмечено выше, в работе были исследованы лектины двух штаммов азоспирилл – *A. brasilense* Sp7 и мутантного штамма *A. brasilense* Sp7.2.3. Лектины этих двух штаммов являются гликопротеинами, выделенными с поверхности бактериальных клеток с молекулярной массой 36 кДа и специфичностью к L-фукозе и D-галактозе [8]. Лектин мутантного штамма отличался от лектина родительского штамма антигенными свойствами. Предыдущими исследованиями было показано, что эти белки обладают различной функциональной активностью [2-6].

Изменение содержания СК в корнях проростков пшеницы при воздействии лектинов родительского и мутантного штаммов свидетельствует о том, что они оказывают заметное влияние на этот показатель. Для исследований были взяты четыре концентрации лектинов - 5, 10, 20, 40 мкг/мл. В ходе проведенных экспериментов мы измеряли количество свободной и конъюгированной форм СК, поскольку формы СК легко переходят одна в другую и при этом обладают разной биохимической и физиологической активностью [14]. Результаты показали, что лектины изменяли содержание СК лишь через час инкубации с корнями. Оба лектина вызывали увеличение концентрации свободной и уменьшение концентрации конъюгированной форм СК при всех изучаемых концентрациях. Для лектина родительского штамма наблюдалось снижение эффекта с увеличением концентрации лектина. Максимум увеличения свободной СК отмечался при концентрации 5 мкг/мл. Для лектина мутантного штамма максимальное значение наблюдалось при 10 мкг/мл. Что касается связанной формы СК, то для обоих штаммов с увеличением концентрации происходило снижение оказываемого лектинами эффекта. Максимальное снижение происходило при концентрации лектинов – 5 мкг/мл. Лектин мутантного штамма по сравнению с лектином родительского штамма наиболее эффективно увеличивал количество свободной СК и менее эффективно изменял содержание связанной формы СК.

Как видно из рис.1 количество образовавшейся свободной СК и количество гидролизованной связанной СК неравнозначно, особенно в случае с лектином мутантного штамма.

В связи с этим возникает вопрос, является ли аккумуляция СК результатом только гидролиза конъюгатов, или же наряду с процессом гидролиза происходит и ее синтез *de novo*. Для ответа на этот вопрос определяли активность фермента, ответственного за синтез СК – фенилаланин-аммиак-лиазы.

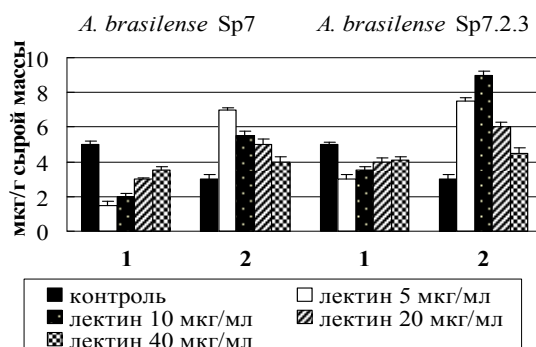


Рисунок 1. Содержание конъюгированной (1) и свободной (2) форм СК в корнях проростков пшеницы в контроле и при предобработке лектинами *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp7.2.3

Как показали результаты, индукция активности ФАЛ происходила как в случае с лектином родительского, так и мутантного штамма, но лектин мутантного штамма в данном случае проявлял

большую активность, особенно при концентрации – 10 мкг/мл. Из рис. 1 и табл. 1 видно, что при воздействии лектина мутантного штамма прослеживается очень четкая корреляция между изменением содержания свободной СК и активностью ФАЛ в корнях для изучаемых концентраций лектина, что не отмечается при инкубации с лектином родительского штамма.

Таблица 1. Активность ФАЛ в корнях проростков после инкубации с лектинами *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3

Обработка	Активность ФАЛ, %
Вода (контроль)	100 ± 3
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7 - 5 мкг/мл	115 ± 5
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7 - 10 мкг/мл	105 ± 4
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7 - 20 мкг/мл	110 ± 6
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7 - 40 мкг/мл	120 ± 3
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7.2.3 - 5 мкг/мл	150 ± 4
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7.2.3 - 10 мкг/мл	210 ± 3
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7.2.3 - 20 мкг/мл	110 ± 9
Лектин <i>A. brasilense</i> Sp7.2.3 - 40 мкг/мл	105 ± 3

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лектины повышают активность β -глюкозидазы, о чем свидетельствуют ранее полученные нами данные [3], которая превращает конъюгированную форму СК в свободную и активируют ФАЛ, отвечающую за синтез СК. Однако степень участия лектинов в первом и во втором случае различна. Лектин родительского штамма обладает большей регулирующей активностью по отношению к β -глюкозидазе, лектин же мутантного штамма – к ФАЛ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что лектины азоспирилл способны выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы.

1. Никитина В.Е., Аленькина С.А., Пономарева Е.Г., Савенкова Н.Н. Изучение роли клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы // Микробиология.- 1996.- Т. 65.- № 2.- С. 165-170.
2. Никитина В.Е., Богомоллова Н.В., Пономарева Е.Г., Соколов О.И. Влияние лектинов азоспирилл на способность семян к прорастанию // Известия АН. Серия биологическая.- 2004.- № 4.- С. 431-435.
3. 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.- V. 283.- № 1-2.- P. 147-151.
4. 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.- Т. 41.- № 4.- С. 444 - 448.
5. Аленькина С.А., Матора Л.Ю., Никитина В.Е. Оценка влияния лектинов азоспирилл на уровень цАМФ в растительной клетке // Микробиология.- 2010.- Т. 79.- №6.- С. 856-858.
6. Аленькина С.А., Никитина В.Е. Изменение содержания оксида азота в корнях проростков пшеницы под влиянием лектинов азоспирилл // Доклады РАСХН.- 2011.-Т. 79.- №6.- С. 12-14.
7. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота. // Прикл. биохимия и микробиология.- 2007.- Т. 43.- №4.- С. 405-411.
8. Аленькина С.А., Петрова Л.П., Никитина В.Е. Получение и характеристика мутанта по лектиновой активности // Микробиология.- 1998.- Т. 67.- № 6.- С. 782-787.
9. Sadasivan L., Neyra C.A Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* // J. Bacteriol.1985.- V. 163.- P. 716-723.
10. Echdat Y., Ofek I., Yachow-Yan Y., Sharon N., Mirelman D. Isolation of mannose-specific lectin from *E.coli* and its role in the adherence of the bacterial to epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 1978.- V. 85.- P. 1551-1559.
11. 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.- V. 72.- P. 248-254.
12. Панина Я.С., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Свободная и конъюгированные формы салициловой кислоты: содержание и роль в картофеле // Прикл. биохимия и микробиология.-2005.- Т. 41.- №3.- С. 1-4.
13. Zucker M. Induction of phenylalanine ammonialyase in *Xaritin* leaf disk. Photosythetic requirement and effect of day-length // Plant Physiol.- V. 44.- P. 91-112.
14. Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. Янтарная кислота – миметик салициловой кислоты // Физиология растений.- 1999.- Т.46.- №1.- С. 23-28.