

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  
КОНЦЕНТРАЦИЮ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ПЕРОКСИДАЗ И  
ОКСИДА АЗОТА (NO) В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы  
направления подготовки 06.04.01 - Биология  
биологического факультета  
Васиной Натальи Васильевны

Научный руководитель

к.б.н., доцент

  
\_\_\_\_\_  
19.06.2018.

А. А. Галицкая

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

  
\_\_\_\_\_  
19.06.2018

С. А. Коннова

Саратов 2018

## 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 узнавание растением фитопатогенных или симбиотических микроорганизмов. 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 инициируют таксис бактерий и способствуют взаимному узнаванию микро- и макропартнеров. Это в свою очередь индуцирует определенные сигнальные системы и запускает защитные ответы растения. Так в ряде работ было показано, что ризобии вызывают системную передачу сигналов, которые связаны с формированием системной устойчивости. При этом важную роль в этих процессах играют накопление активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА), которые могут выполнять сигнальную роль.

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.

Целью нашей работы было определить динамику изменения концентрации фенольных соединений, пероксидаз и оксида азота (NO) в проростках пшеницы под влиянием липополисахаридов (ЛПС) азоспирилл. Для реализации были поставлены следующие задачи:

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

2) определить влияние ЛПС различных штаммов *Azospirillum* на динамику концентрации фенольных соединений, пероксидаз и оксида азота в проростках пшеницы сорта Добрыня;

3) сравнить динамику концентрации фенольных соединений, пероксидаз и оксида азота под действием ЛПС *Azospirillum* в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

**Научная новизна:** впервые показано, что внесение в среду прорастания липополисахаридов азоспирилл приводит к изменению концентрации фенольных соединений в проростках пшеницы сортов Саратовская 29 и Добрыня. Выявлено, что ЛПС ризосферных бактерий *Azospirillum brasilense* штаммов SR55 и SR109 вызывают схожие изменения в отличие от ЛПС свободноживущих бактерий *Azospirillum thioophilum* BV-S.

**Научная и практическая значимость работы:** полученные данные позволяют оценить участие метаболитов растений в формировании ассоциативных отношений с бактериями рода *Azospirillum*. Создание эффективных ассоциаций с растениями может быть использовано при создании бактериальных удобрений.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Внесение в среду прорастания липополисахаридов азоспирилл приводит к изменению концентрации фенольных соединений и пероксидаз в проростках пшеницы сортов Саратовская 29 и Добрыня.
2. ЛПС ризосферных бактерий *Azospirillum brasilense* штаммов SR55 и SR109 вызывают схожие изменения в отличие от ЛПС свободноживущих бактерий *Azospirillum thioophilum* BV-S.

**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

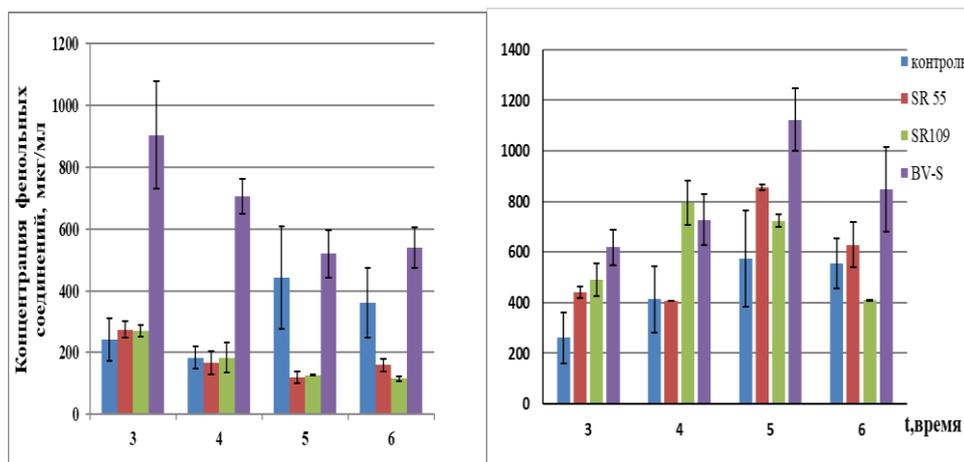
бактерий рода *Azospirillum thiophilum*. Определение суммы фенольных соединений проводили спектрофотометрически, методом Фолина-Чокалтеу, содержание оксида азота NO – спектрофотометрически с использованием реактива Грисса, пероксидазы – спектрофотометрически, с использованием в качестве субстрата ортофенилендиамина.

**Структура магистерской работы:** работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Литературный обзор составлен из 111 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: формирование симбиотических отношений между бактериями и растениями; значение флавоноидов в процессе формирования симбиозов; участие АФК и пероксидаз в защитных реакциях растений; оксид азота NO и его функции в растениях.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

На первом этапе мы исследовали динамику изменения концентрации фенольных соединений в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня. На рисунке 1 (А) показано, что концентрация фенольных соединений на 3, 4 сутки достоверно не изменяется и составляет 243 мкг/мл. При этом достоверно увеличивается на 5 и 6 сутки до 361 мкг/мл. При добавлении ЛПС бактерий штамма SR55 на 3, 4 сутки концентрация фенольных соединений приблизительно равно контролю. На 5 и 6 сутки уменьшается по сравнению с контрольным образцом, но его абсолютное значение при этом не изменяется. Аналогичным образом ведет себя и ЛПС штамма SR109. При этом следует отметить, что динамика изменения концентрации фенольных соединений под действием ЛПС свободноживущих бактерий *A. thiophilum* носит иной характер. На начальном этапе прорастания (3, 4 сутки) количество фенольных соединений значительно превышает контрольные значения (в 3,5 раза). К 5 – 6 суткам происходит постепенное снижение до значений контрольных образцов. Это может быть связано с тем, что представители данного вида бактерий не характерны для ризосферы и растения реагируют на них, как на возможный патоген, увеличивая количество фенольных соединений для обеспечения защитных реакций. При

этом, поскольку инфицирования не происходит, доставка этих метаболитов в корень снижается до нормальных физиологических величин.



А

Б

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

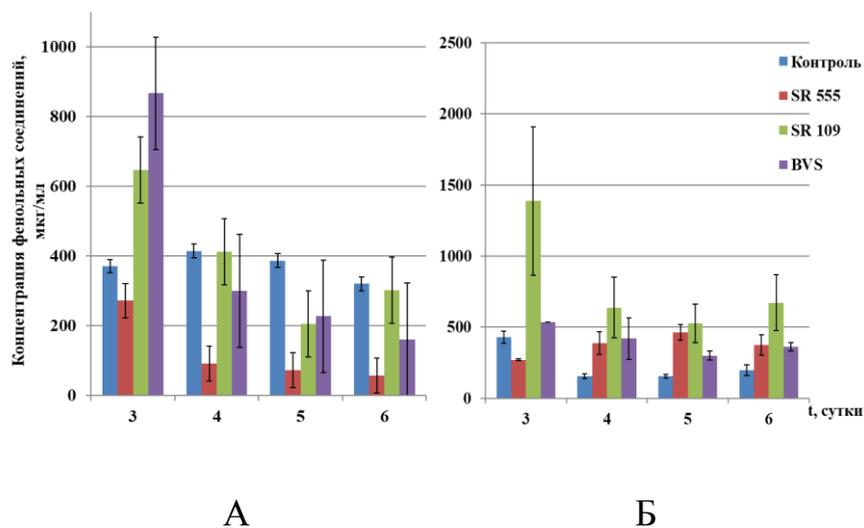
Рисунок 1 – Изменение концентрации фенольных соединений в корнях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б).

Известно, что различные сорта пшеницы могут значительно отличаться друг от друга по количественному и качественному спектру синтезируемых фенольных соединений, в том числе и флавоноидов. Поэтому на следующем этапе мы провели исследование динамики количества фенольных соединений в проростках пшеницы сорта Добрыня.

На рисунке 1 (Б) показано изменение концентрации фенольных соединений в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня. В контрольном образце происходило увеличение концентрации фенольных соединений к 6 суткам. Добавление в среду прорастания ЛПС бактерий штамма SR55 на 3 сутки приводило к увеличению концентрации фенольных соединений по сравнению с контрольным образцом. На 4 сутки было приблизительно равно контролю, но уменьшалось по сравнению с 3 сутками. На 5-6 сутки увеличивалась абсолютная концентрация, но на 5 сутки концентрация была больше, чем в контроле, а на 6 сутки приблизительно равна контролю. ЛПС штамма SR109 приводит к увеличению фенольных соединений на 3 сутки по сравнению с контрольным образцом. На 4 сутки выше контроля, но меньше

чем на 3 сутки. На 4 и 5 сутки концентрация фенольных соединений была равно контролю. На 6 сутки концентрация была ниже, чем на 3-5 сутки, но больше контроля на 6 сутки. ЛПС штамма BV-S на протяжении эксперимента приводил к увеличению концентрации на 3-6 сутки по сравнению с контрольным образцом. К 5 суткам происходило достоверное увеличение, на 6 сутки было равно концентрации фенольных соединений на 5 сутки. Следует отметить, что ЛПС свободноживущих, неризосферных бактерий *A. thiophilum* BV-S и в данном случае индуцировали активный синтез фенольных соединений

Поскольку основной процесс биосинтеза проходит в надземной части проростков, мы провели анализ концентрации фенольных соединений в стеблях проростков пшеницы сорта Саратовская-29. На рисунке 2 (А) показано, что концентрация фенольных соединений в контрольных образцах не изменялась на протяжении всего периода. При добавлении в среду прорастания зерновок ЛПС бактерий штамма SR55 происходило достоверное уменьшение показателя на 4-6 сутки по сравнению с контрольным образцом на 78%. Это может быть связано с интенсивным оттоком фенольных соединений в корни и оттуда, возможно, в среду прорастания. ЛПС бактерий штамма SR109 не вызывал изменения. Однако, добавление в среду прорастания ЛПС штамма BV-S, который был выделен из соленых почв, на 3 сутки приводит к достоверному увеличению концентрации фенольных соединений по сравнению с контрольным образцом 134%. На 4 – 5 сутки этот показатель сравнивается с контролем и снижается на 50% к 6-м суткам. Это хорошо согласуется с результатами предыдущего эксперимента: сначала растение «воспринимает» ЛПС свободноживущих бактерий как свидетельство атаки возможного патогена, что индуцирует дополнительный синтез фенольных соединений с целью защиты. При этом, поскольку инфицирования не происходит, интенсивность этого процесса уменьшается до физиологических значений.



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

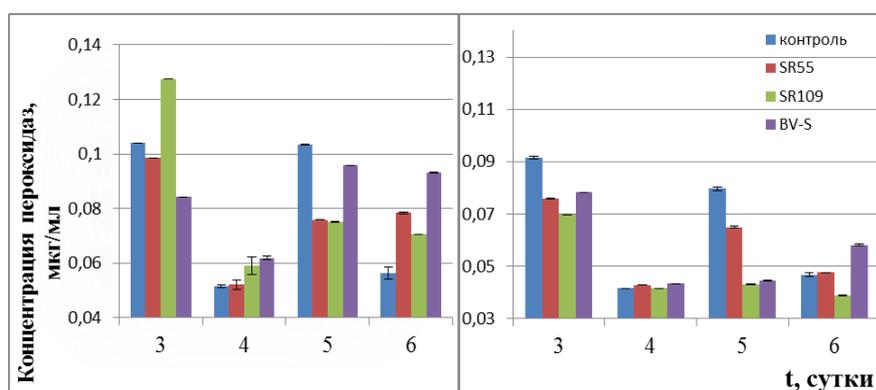
Рисунок 2 – Изменение концентрации фенольных соединений в стеблях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б).

На рисунке 2 (Б) показано, что концентрация фенольных соединений в контрольном образце достоверно уменьшалась к 5-6 суткам. Достоверной разницы между сутками не наблюдалось. Концентрация фенольных соединений при добавлении в среду культивирования ЛПС азоспирилл штамма SR55 на 3 сутки была ниже на 37%, чем в контрольном образце. С 4-х суток происходило увеличение (на 150%) и далее не изменялось. ЛПС бактерий штамма SR109 приводил к достоверному увеличению количества фенольных соединений по сравнению с контролем на 3-6 сутки до 671 мкг/мл. Это количество поддерживалось на протяжении всего периода наблюдений. ЛПС азоспирилл штамма BV-S в данном случае, как и для проростков сорта Саратовская 29, приводил к достоверному увеличению количества фенольных соединений по сравнению с контролем, демонстрируя тенденцию к снижению, однако достоверных различий на протяжении шести суток наблюдения выявлено не было.

На следующем этапе мы сравнивали динамику концентрации пероксидаз в корнях проростков пшеницы сорта Саратовская-29.

Было показано, что на третьи сутки в корнях общая концентрация пероксидаз составляло 0,1 мкг/мл экстракта (рисунок 3 А). По мере

прорастания, концентрация изменялась, на четвертый день оно снижалось примерно в два раза. На пятые сутки концентрация 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 концентрации пероксидаз в проростках пшеницы. При этом сохранялась общая картина динамики. Однако следует отметить, что ЛПС разных штаммов отличались по действию на концентрацию пероксидаз. Добавление в среду культивирования ЛПС штамма SR55 приводило к снижению концентрации 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 к–контроль; SR55–ЛПС *A. brasilense* SR55; SR109–ЛПС *A. brasilense* SR109; BV-S–ЛПС *A. thiophilum* BV-S

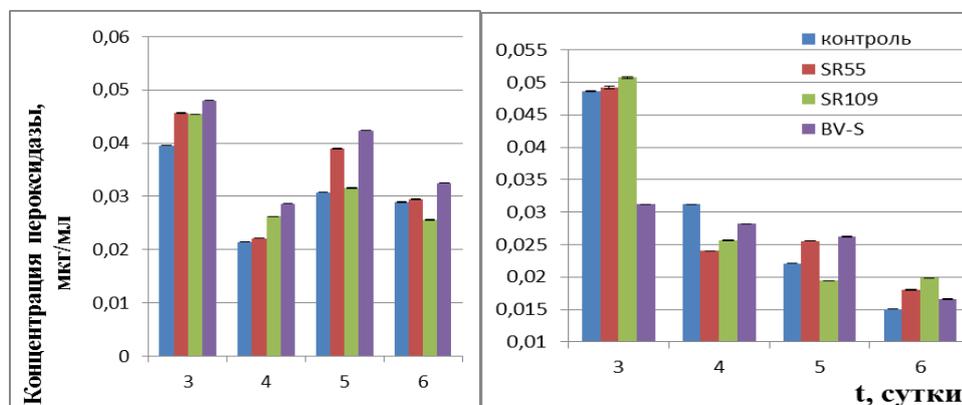
Рисунок 3 – Изменение концентрации пероксидаз в корнях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б).

На рисунке 3 (Б) показано, что общая картина динамики концентрации пероксидаз сохраняется, как и в случае с пшеницей сорта Саратовская-29. Хотя общая концентрация ее было несколько ниже.

Внесение ЛПС в среду прорастания зерновок пшеницы сорта Добрыня привело к количественным изменениям концентрации пероксидаз при сохранении общей динамики. Следует отметить, что в случае добавления ЛПС штамма SR55 концентрация пероксидаз возрасало на пятые сутки, но было ниже контрольных значений, и практически сравнилось с контрольным образцом на шестые сутки. При этом ЛПС штамма BV-S иначе влияли на динамику концентрации пероксидаз. На пятые сутки концентрация пероксидаз не изменялась, по сравнению с предыдущим 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 концентрации пероксидаз в стеблях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

На рисунке 4 показано изменение активности пероксидазы в стеблях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б). Общая динамика концентрации пероксидаз контрольных образцов в целом соответствовала предыдущим наблюдениям. Однако внесение ЛПС приводило к увеличению концентрации пероксидаз на третьи и четвертые по сравнению с контрольным образцом. При этом образцы, в которые добавляли ЛПС штаммов SR55 и SR109, содержали одинаковое количество пероксидаз на третьи сутки. На четвертые сутки общая концентрация пероксидаз в контроле было почти в два раза меньше, чем на третьи сутки.



А

Б

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

Рисунок 4 – Изменение концентрации пероксидаз в стеблях проростков пшеницы сортов Саратовская-29 (А) и Добрыня (Б).

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

Анализ концентрации пероксидаз в стеблях проростков пшеницы сорта Добрыня выявило иной характер динамики. Полученные данные представлены на рисунке 4 (Б).

В течение четырех суток мы наблюдали уменьшение концентрации пероксидазы в контрольных образцах. При добавлении ЛПС штамма BV-S наблюдалось аналогичное уменьшение концентрации пероксидаз, 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 концентрация пероксидаз была больше по сравнению с контролем. Добавление ЛПС штамма SR109 приводило к незначительному, но достоверному по сравнению с контролем увеличению активности пероксидаз 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.

Далее мы оценили динамику изменения концентрации NO в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

Было показано, ЛПС азоспирилл, практически не влияли на концентрацию оксида азота экстрактов, полученных из проростков пшеницы сорта Саратовская 29. Концентрация оксида азота при добавлении ЛПС штамма SR55 была постоянной и составляла  $\approx 2,60 \pm 0,0045$  мкг/мл экстракта.

Единственным исключением было небольшое увеличение концентрации NO под действием ЛПС бактерий штамма BV-S к концу эксперимента.

В проростках пшеницы сорта Добрыня начальная концентрация 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 концентрации NO в процессе прорастания зерновок. Кроме того, добавление в среду культивирования ЛПС бактерий не оказывало существенного влияния на концентрацию NO в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня, за исключением ЛПС сорта SR55, который вызвал увеличение концентрации на шестые сутки.

Была исследована динамика концентраций NO в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня.

На третьи сутки концентрация в контрольном образце составляла  $0,305 \pm 0,149$  мкг/мл экстракта. На четвертые сутки она снижалась на 10 %. Однако следует отметить, что все описанные изменения в контрольном эксперименте не превышали 10%, что свидетельствует об относительном постоянстве концентрации оксида азота в процессе прорастания зерновок. Кроме того, добавление в среду культивирования ЛПС бактерий не оказывало существенного влияния на концентрацию NO в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня, за исключением ЛПС сорта SR 55, который вызвал увеличение концентрации на шестые сутки.

Полученные нами результаты показывают, что ЛПС исследованных штаммов азоспирилл при воздействии на проростки пшеницы не приводили к значимым изменениям концентрации 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.

Нами было показано, что в стеблях проростков пшеницы сорта Саратовская-29 с добавлением ЛПС штамма SR55, и штамма SR109, вместе с контрольным образцом, сохраняется общая картина динамики как и в эксперименте с пероксидазой. Однако, ЛПС штамма SR109 вызывал увеличение концентрации NO на 4-е сутки, снижаясь на следующий день до значений ниже контрольных. В этот же временной период отмечен рост концентрации NO под действием ЛПС *A. thiophilum* BV-S.

Были выявлены незначительные колебания концентрации NO в стеблях проростков пшеницы сорта Добрыня. Образцы с добавлением ЛПС штамма SR55 не отличались по концентрации оксида азота от контроля. В случае добавления ЛПС штамма SR109 было отмечено резкое увеличение концентрации на шестые сутки, хотя во всех остальных случаях величина сохранялась в пределах контрольного образца.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами спектрофотометрии выявлены изменения активности фенольных соединений, пероксидаз и оксида азота в проростках пшеницы сортов Саратовская-29 и Добрыня.

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

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

Следует отметить, что внесение в среду прорастания зерновок пшеницы ЛПС азоспирилл приводило к количественным и качественным изменениям концентрации фенольных соединений в проростках 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 концентрации пероксидаз в проростках пшеницы сорта Саратовская-29, не влияя на волновой характер динамики при прорастании.
2. Показано, что концентрация пероксидаз в корнях проростков пшеницы сорта Добрыня на 10% ниже, а концентрация NO на 20% выше, чем у сорта Саратовская-29.
3. Обнаружено, что изменение концентрации 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 концентрации NO на 4% вызывал препарат ЛПС *A. brasilense* SR55.
4. Обнаружено, что препараты ЛПС *A. brasilense* SR55 и SR109 и BV-S приводят к качественным и количественным изменениям динамики концентрации фенольных соединений в проростках пшеницы.

