

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP7
НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И КАТАЛАЗЫ В КОРНЯХ
ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПО-, ГИПЕРТЕРМИИ
И ЗАСОЛЕНИИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 422 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Романова Никиты Ивановича

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

_____ Е.В. Глинская

Научный консультант:

к.б.н., с.н.с. лаборатории микробиологии

ИБФРМ РАН

_____ С.А. Аленькина

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор

_____ С.А. Степанов

Саратов 2016

Актуальность темы. Ассоциативные азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* – микроорганизмы, стимулирующие рост растений. Ростстимулирующий эффект бактерий связан со способностью к азотфиксации, продукции фитогормонов, улучшением водного и минерального статуса, продукции ряда соединений, увеличивающих мембранную активность и пролиферацию тканей корневой системы, способностью уменьшать влияние стрессоров на растение и осуществлять контроль многочисленных фитопатогенов [1].

Образование азотфиксирующих систем включает функционирование молекул белковой природы – лектинов. Долгое время считалось, что в системе углевод-белкового взаимодействия при формировании азотфиксирующих ассоциаций и симбиозов роль узнающих молекул выполняют лектины растений. Однако появление новых знаний относительно лектинов азотфиксирующих бактерий заставило внести коррективы в систему взглядов по лектин-углеводным взаимодействиям, реализуемым при возникновении азотфиксирующих ассоциаций с учетом роли бактериальных лектинов [2].

Лектины азоспирилл являются полифункциональными молекулами. Помимо адгезивной функции, они способны влиять на метаболизм растительной клетки - стимулировать прорастание семян, проявлять по отношению к растительной клетке митогенную и ферментмодифицирующую активности, изменять содержание стрессовых метаболитов в растительной клетке, что свидетельствует о способности лектинов выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы [3]. Также лектины принимают участие в работе стрессовых систем растения [4].

Воздействие на растения неблагоприятных температур и засоления являются одними из наиболее распространенных абиотических стрессоров [5].

Уникальным индикатором стрессового состояния растений служит пероксидазная система [6].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение действия кратковременной гипо- и гипертермии, а также засоления на активность пероксидазы и каталазы в корнях проростков пшеницы в присутствии лектина *A. brasilense* Sp7.

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи:

1. Определить влияние лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 на активность пероксидазы в корнях проростков пшеницы при температурных воздействиях.

2. Изучить воздействие лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 на активность каталазы в корнях проростков пшеницы при температурных воздействиях.

3. Выявить влияние лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 на активность пероксидазы и каталазы в корнях проростков пшеницы при засолении.

Материал и методы исследования. Работа проводилась на базе лаборатории микробиологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов).

Объектом исследования служил штамм азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7, полученный из Института микробиологии РАН (г. Москва).

В экспериментах использовали кристаллический препарат лектина, полученный после двукратного осаждения сульфатом аммония и спирто-ацетоновой смесью. Лектин *Azospirillum brasilense* Sp7 является гликопротеином, имеет молекулярную массу 36 кДа, проявляет специфичность к L-фукозе (1,87мМ) и к D-галактозе (20мМ).

В работе использовали 3-суточные проростки пшеницы. Для проведения экспериментов использовались семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Саратовская 29». Семена были получены из НИИ сельского хозяйства Юго-Востока (Саратов, Россия). Семена стерилизовали в течение 1 мин 70%-ным этанолом и проращивали на дистиллированной воде

при 22°C.

Способность лектина воздействовать на активность каталазы и пероксидазы оценивали после предварительной инкубации корней проростков пшеницы в растворе препарата лектина (концентрация лектина 5 - 40 мкг/мл, максимальное время инкубации – 1 ч) при температуре +5, +42 и с добавлением 1% NaCl.

Для определения активности пероксидазы по 10 корней проростков переносили в чашки Петри на раствор 0.01 М KCl (10 мл) и выдерживали не менее 4 ч для снятия раневого стресса.

Корни гомогенизировали в 0.15 М фосфатном буфере (pH 5.6). Гомогенат центрифугировали при 10000g, надосадочную жидкость использовали для определения активности пероксидазы.

Для определения активности пероксидазы использовали микрометод, основанный на окислении *o*-фенилендиамина (ОФД). Для этого в лунки плоскодонных планшетов для иммуноанализа («Nunc», США) добавляли по 50 мкл надосадочной жидкости, разбавленной фосфатным буфером (pH 5,6) в 20 раз, и по 25 мкл раствора ОФД в концентрации 0,5 мг/мл. Через 2 мин после внесения 25 мкл 0,43 мМ H₂O₂ развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 4N H₂SO₄. Поглощение образцов (при 492 нм) измеряли на иммуноферментном анализаторе АИФ-Ц-01С (ЗАО ИЛИП, Санкт-Петербург, Россия). Активность фермента выражали в относительных единицах.

Для определения активности каталазы корни после экспозиции с препаратом лектина гомогенизировали в 0,15 М фосфатном буфере (pH 7,8). Гомогенат центрифугировали при 7000g, надосадочную жидкость использовали для определения активности фермента по количеству неразложившейся перекиси водорода. Для сравнительного анализа вариантов активность выражали в относительных единицах.

Опыты проводили в 3-кратной биологической и 5-кратной аналитической повторностях. Цифровой материал обрабатывали

статистически с помощью программы «Анализ данных электронных таблиц Microsoft Excel».

Структура и объем работы. Работа изложена на 52 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 8 рисунками. Список использованных источников 76 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об истории открытия лектинов, их структуре и свойствах, особенностях лектинов бактериального происхождения, в том числе лектинов азоспирилл.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о влиянии лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 на активность пероксидазы и каталазы корней проростков пшеницы при гипо-, гипертермии и засолении.

Было установлено воздействие лектина *A. brasilense* Sp7 на активность пероксидазы корней проростков пшеницы, которое приводило к увеличению активности фермента после 30 и 60 мин инкубации для всех концентраций лектина, с максимальными значениями для 40 мкг/мл. В контроле активность фермента – $2,6 \pm 0,1$ ед/г сырой массы (рисунок 1).

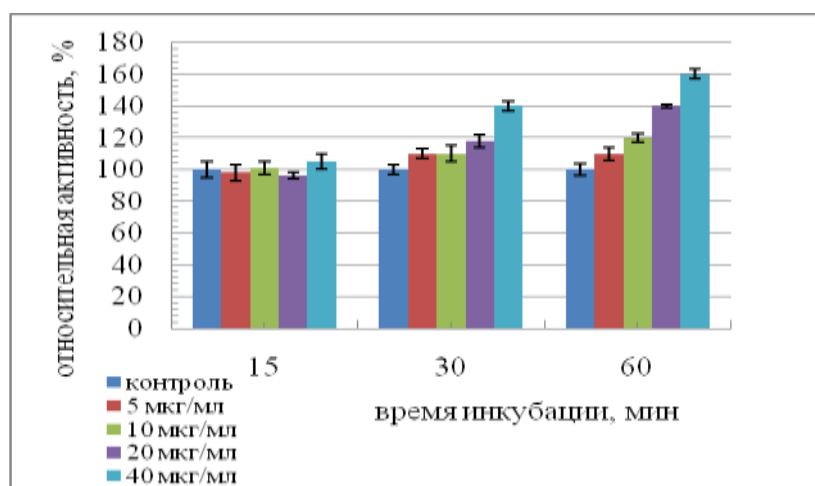


Рисунок 1 – Влияние лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 на активность пероксидазы корней проростков пшеницы

Воздействие лектина *A. brasilense* Sp7 при гипотермии (низких температурах) приводило к повышению активности фермента только после 30 мин инкубации. Увеличение было отмечено для всех концентраций лектина, но наибольшее наблюдалось для 20 и 40 мкг/мл.

В условиях гипертермии (повышенной температуры) также было отмечено увеличение активности фермента после 30 мин инкубации для всех концентраций лектина, с максимальными значениями для 20 и 40 мкг/мл.

При комбинированном воздействии лектина и 1% NaCl (засолении) после 30 мин инкубации происходило повышение активности фермента для концентраций лектинов 10-40 мкг/мл. После 60 мин инкубации наблюдалось достоверное увеличение активности пероксидазы при всех концентрациях лектина. При этом максимальное увеличение активности достигалось при 40 мкг/мл.

Одним из ферментов, ответственных за количественное содержание перекиси водорода в растительной клетке, является каталаза. Каталаза (КФ 1.11.1.6) представляет собой гемосодержащий фермент с Mg около 250 кДа, катализирующий разложение H_2O_2 на воду и молекулярный кислород. Этот фермент является одним из важнейших в системе антиоксидантной защиты большинства организмов. Он присутствует в различных компартментах растительных клеток.

Для определения активности этого фермента в корнях проростков пшеницы были взяты концентрации лектина 5, 10, 20 и 40 мкг/мл.

Воздействие изучаемого лектина на корни проростков пшеницы приводило к уменьшению активности фермента после 60 мин инкубации лектина с корнями. Самой эффективной явилась концентрация лектина 20 мкг/мл (рисунок 2).

Воздействие изучаемого лектина на корни проростков пшеницы при гипотермии (низких температурах) приводило к уменьшению активности фермента после 15 мин инкубации лектина с корнями. Самой эффективной явились концентрации лектина 5 и 20 мкг/мл.

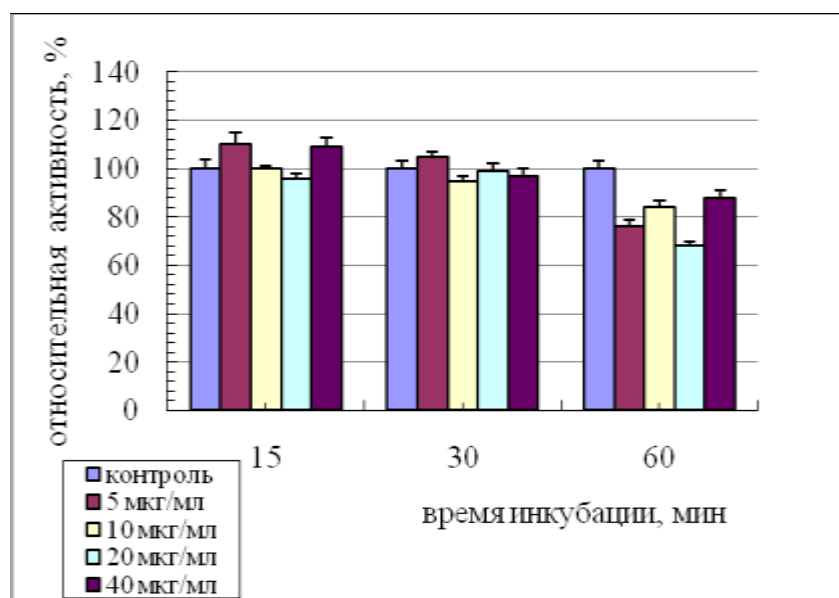


Рисунок 2 – Влияние лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 на активность каталазы корней проростков пшеницы

В условиях гипертермии (повышенной температуры) также было отмечено уменьшение активности фермента после 15 и 30 мин инкубации с лектином во всех концентрациях с максимальным значением для 5 мкг/мл.

При комбинированном воздействии лектина и 1% NaCl (засолении) происходило уменьшение активности фермента во всех вариантах. Максимально низкие значения были отмечены через 15 мин инкубации лектина с корнями проростков для концентраций лектина 5 и 10 мкг/мл.

Таким образом, в результате проведенных исследований была показана способность лектина *Azospirillum brasilense* Sp7 оказывать регулирующее воздействие на пероксидазу и каталазу корней проростков пшеницы в условиях гипо- и гипертермии, а также засолении.

Полученные результаты имеют практическую ценность, так как предобработка такого рода индукторами способствует формированию устойчивости растений, а, следовательно, ростстимулирующему эффекту. Не менее важно общебиологическое значение полученных данных, так как лектины содержатся во всех живых организмах и большинство их функций остаются дискуссионным.

Выводы

1. Показано, что лектин *A. brasilense* Sp7 увеличивал активность пероксидазы в корнях проростков пшеницы в условиях гипо- и гипертермии. Самыми эффективными концентрациями лектина явились 20 и 40 мкг/мл. Наибольший эффект был отмечен при 30 и 60 мин инкубации, с повышением активности до 260 % относительно контроля.

2. Лектин *A. brasilense* Sp7 оказывал ингибирующее воздействие на активность каталазы при абиотических стрессовых условиях. Эффект снижения отмечался для всех изучаемых концентраций лектинов и временных интервалов, доходя до 60% от первоначальной.

3. В условиях засоления лектин *A. brasilense* Sp7 увеличивал активность пероксидазы до 200% относительно контроля. Максимальный эффект наблюдался при 60 мин инкубации и концентрации лектина 40 мкг/мл. Солевой стресс (1% NaCl) приводил к уменьшению активности каталазы до 50% относительно контроля. Максимальный эффект наблюдался при 15 мин инкубации и концентрации лектина 10 мкг/мл.

Список использованных источников

1. Луцик, М. Д. Лектины / М. Д. Луцик, Е. Н. Панасюк, А. Д. Луцик. Львов: Вища шк, 1981. 156 с.
2. Королев, Н. П. Функции лектинов в клетках / Н. П. Королев // Итоги науки и техники. Сер. Общ. пробл. физ-хим. биологии. 1984. Т. 3, №1. С. 347-348.
3. Марков, Е. Ю. Лектины растений: предполагаемые функции / Е. Ю. Марков, Э. Е. Хавкин // Физиология растений. 1983. Т. 30, Вып. 5. С. 852 - 867.
4. Редькина, Т. В. Механизм положительного влияния бактерий рода *Azospirillum* на высшие растения / Т. В. Редькина. Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. М.: Наука, 1989. 157 с.
5. Козюкина, Ж. Т. Устойчивость растений к отрицательным факторам среды / Ж. Т. Козюкина. Днепропетровск: ДГУ, 1980. 104 с.
6. Якушина, Н. И. Физиология растений / Н. И. Якушина, Е. Ю. Бахтенко. Москва: Владос. 2005. 464 с.