

ORIGINAL ARTICLE

STUDY OF AZOSPIRILLUM LECTINS INFLUENCE ON HYDROGEN
PEROXIDE PRODUCTION IN WHEAT-ROOTS

Alen'kina S.A., Nikitina V.E.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of
Sciences, 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russian Federation*

E-mail: alenkina@ibppm.sgu.ru

Received August 10, 2009

It was found that two cell-surface lectins isolated from the nitrogen-fixing soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and from its mutant defective in lectin activity, *A. brasilense* Sp7.2.3 can stimulate rapid formation of hydrogen peroxide, associated with an increase in the activities of oxalate oxidase and peroxidase in the roots of wheat seedlings. The most advantageous and most rapidly induced pathway of hydrogen peroxide formation was the oxidation of oxalic acid by oxalate oxidase because in this case, a 10-min treatment of the roots with the lectins at $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ was sufficient. The data from this study attest that the *Azospirillum* lectins can act as inducers of adaptation processes in the roots of wheat seedlings.

key words: Azospirillum brasilense / lectins / oxalate oxidase / peroxidase / wheat-seedling roots.

ORIGINAL ARTICLE

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КОРНЯХ ПШЕНИЦЫ

Аленькина С.А., Никитина В.Е.

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049
Саратов, просп. Энтузиастов, 13*

E-mail: alenkina@ibppm.sgu.ru

тел. (8452)97-04-44, (8452)97-04-03

Поступила в редакцию 10 августа 2009

Изучали способность лектинов, выделенных с поверхности почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 и его мутанта по лектиновой активности *Azospirillum brasilense* Sp7.2.3 стимулировать быстрое образование перекиси водорода, связанное с повышением активности оксалаксоксидазы и пероксидазы корней проростков пшеницы. Было показано, что для образования перекиси водорода в корнях проростков пшеницы под действием лектинов наиболее быстро индуцируемым путем образования перекиси является окисление щавелевой кислоты оксалаксоксидазой, так как в данном случае достаточно 10-минутной обработки корней лектинами в концентрации 10 мкг/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что лектины азоспирилл способны выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы.

key words: Azospirillum brasilense/ лектины/ корни проростков пшеницы/ оксалаксоксидаза/ пероксидаза/.

Информации о функционировании ассоциативных симбиозов пока еще недостаточно для глубокого понимания этого явления, и многие вопросы остаются пока неясными. Одним из невыясненных вопросов является вопрос о том, какие молекулярные сигналы (растения к бактерии и наоборот) лежат в основе установления и эффективного функционирования ассоциативного симбиоза.

Показано, что многие биотические и абиотические воздействия могут вызывать резкое увеличение образования растительными клетками

перекиси водорода и других активных форм кислорода. Синтез перекиси водорода – один из наиболее быстрых ответов растительной клетки на индуцирующие воздействия. Считается, что основным источником перекиси водорода в клетках растений является дисмутация молекулы кислорода, катализируемая супероксид-дисмутазой (Chen et al., 1999; Дьяков и др., 2001). Однако в последнее время большой интерес вызывают альтернативные пути образования перекиси водорода. Пероксидазы классически рассматриваются в качестве антиоксидантов,

защищающих клетки от разрушительного действия перекиси водорода. Однако, помимо такой активности, пероксидазы могут проявлять и оксидазную активность с окислением железа гема из валентности 2 в валентность 3 и передачей электронов от НАДФН и НАДН на кислород (Frahry et al., 1998). Перекись водорода может образовываться также при окислении щавелевой кислоты и ее солей - оксалатов оксалатоксидазой. Среди индукторов, способных вызывать быструю продукцию H_2O_2 в клетках растений, наиболее хорошо исследована активность гликопротеинов, входящих в состав клеточных стенок многих фитопатогенных организмов (Lyon, 1995; Kaus et al., 1996). Обнаружено, что защитные реакции растений с участием пероксидазы и H_2O_2 могут индуцироваться хитином, хитозаном и хитоолигосахаридами фитопатогенных грибов, которые известны своей элиситорной активностью (Pearce et al., 1982). Вовлечение оксалатоксидазы в каскад защитных реакций показано при поражении грибными патогенами разных видов растений (Donaldson et al., 2001; Яруллина и др., 2003).

Для корней проростков пшеницы одним из биогенных факторов являются находящиеся в прикорневой зоне азотфиксирующие ассоциативные бактерии рода *Azospirillum*, стимулирующие рост и развитие растений. Было показано, что инициация взаимодействия бактерий с корнями происходит по принципу лиганд-рецепторного взаимодействия. Установлено, что со стороны азоспирилл в этом процессе, в числе других факторов, участвуют лектины, находящиеся на поверхности клетки (Никитина и др., 1996).

Целью исследований была оценка способности лектинов азоспирилл индуцировать активность пероксидазы и оксалатоксидазы в корнях проростков пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы лектины двух штаммов - *Azospirillum brasilense* Sp7, полученного из Института микробиологии РАН (г. Москва) и его мутанта, дефектного по лектиновой активности - *Azospirillum brasilense* Sp7.2.3 (Аленькина и др., 1998). Культуры азоспирилл выращивали на жидкой синтетической среде для флокуляции при 37°C в течение 18 ч (Sadasivan et al., 1985).

Выделение лектинов с поверхности клеток проводили методом Eshdat (Echdat et al., 1978).

В экспериментах использовали кристаллические препараты лектинов, полученные после двукратного осаждения сульфатом аммония и спирто-ацетоновой смесью.

Белок определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

В работе использовали 3-суточные проростки пшеницы Саратовская 29. Семена стерилизовали 1 мин 60%-ным этанолом и проращивали на дистиллированной воде при 22°C. Перед опытами у проростков удаляли эндосперм и промывали корни дистиллированной водой. После этого по 10 проростков переносили в чашки Петри на раствор 0.01 М КСl (10 мл) и выдерживали не менее 4 ч для снятия раневого стресса. Затем среду заменяли на свежую, содержащую 0.05%-ный *o*-фенилендиамин (ОФД). Сразу же после этого реакцию инициировали добавлением 1 мл 0.025 М щавелевой кислоты или перекиси водорода в конечной концентрации 0.01 мМ, перемешивали среду осторожными круговыми движениями в чашке Петри и с интервалом 2 мин отбирали по 0.2 мл среды. Аликвоты вносили в лунки плоскодонного планшета для иммуноанализа («Медполимер», Санкт-Петербург), куда предварительно добавляли 0.05 мл 4 М H_2SO_4 . Поглощение образцов (при 492 нм) измеряли на иммуноферментном анализаторе АИФ-Ц-О1С (ЗАО ИЛИП, Санкт-Петербург, Россия). Активность окисления ОФД выражали в

единицах поглощения на 1 г сырой массы корня. Для оценки способности лектинов индуцировать активность ферментов проростки 10 мин инкубировали в 0.01 М KCl, содержащем препараты лектинов и определяли активность окисления ОФД как описано выше (Хайруллин и др., 2001).

Результаты представлены как средние значения трех повторностей \pm стандартное отклонение. Статистические расчеты вели по методу Рокицкого (Рокицкий, 1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были исследованы лектины двух штаммов азоспирилл - *Azospirillum brasilense* Sp7 и мутант этого штамма *Azospirillum brasilense* Sp7.2.3. Лектин *A. brasilense* Sp7 - гликопротеин, выделенный с поверхности клеток с молекулярной массой 36 кДа и специфичностью к L-фукозе (1.87мМ) и к D-галактозе (20мМ) (Итальянская и др., 1989). Лектин мутантного штамма с той же молекулярной массой и углеводной специфичностью, что и родительский, но с измененными антигенными свойствами (Аленькина и др., 1998). Все предыдущие результаты исследований, связанные с изучением функций лектинов показали, что эти два лектина не только структурно различны, но обладают различной функциональной активностью.

Было показано, что лектины азоспирилл способны осуществлять наряду с другими факторами адгезию бактерий к корням растений, стимулировать прорастание семян, проявлять по отношению к растительной клетке митотическую и ферментмодифицирующую активность (Никитина и др., 2004; Чернышева и др., 2005; Alen'kina et al., 2006). Все эти факты свидетельствуют о возможной роли лектинов азоспирилл в адаптационных механизмах растений.

Среди факторов внешней среды, воздействующих на организм, особое внимание принадлежит группе факторов, приводящих к так называемому окислительному взрыву. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные дают основание полагать, что значительную роль в образовании перекиси водорода в ходе окислительного взрыва в растительной клетке играют пероксидазы и оксалактоксидазы, локализованные на внешней поверхности растительных клеток (Тарчевский, 2002).

Из литературы известно, что по мере роста корня активность этих ферментов может меняться и наибольшая активность наблюдается в корнях 2-3-суточных проростков (Хайруллин и др., 2001). В связи с этим для наших исследований были взяты корни 3-х суточных проростков пшеницы.

Оценивали три концентрации лектинов – 10, 20 и 40 мкг/мл. Об активности ферментов судили по интенсивности окисления ОФД. Для оценки способности лектинов оказывать влияние на пероксидазу в среду вносили перекись водорода в конечной концентрации 0.01 мМ. Добавление в среду H₂O₂ способствовало увеличению окисления ОФД для всех концентраций лектинов обоих штаммов по сравнению с контрольным вариантом, но только в том случае, когда время выдерживания корней с лектинами составляло 20 мин (изучались временные интервалы 10 и 20 мин). Самой эффективной концентрацией для обоих лектинов явилась концентрация 40 мкг/мл.

Как видно из таблицы 1, лектин родительского штамма вызывает увеличение пероксидазной активности в большей степени, чем лектин мутантного штамма.

Таблица 1. Влияние лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp7.2.3 на активность пероксидазы корней проростков пшеницы (ед. на 1 г сырой массы).

Вариант	2 мин	4 мин	6 мин	8 мин
контроль	2.0 ± 0.14	2.3 ± 0.09	2.5 ± 0.03	2.6 ± 0.2
<i>A. brasilense</i> Sp7	3.2 ± 0,2	3.6 ± 0.3	3.8 ± 0.06	4.2 ± 0.08
<i>A. brasilense</i> Sp7.2.3	2.6 ± 0.02	2.8 ± 0.06	3.0 ± 0.09	3.3 ± 0.06

В контроле проростки находились 10 мин в растворе 0.01 М KCl, в опыте – на той же среде, содержащей лектин (концентрация - 40 мкг/мл). Затем среду удаляли и к проросткам последовательно добавляли ОФД и H₂O₂, через указанное время определяли активность.

Таблица 2. Влияние лектинов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp7.2.3 на активность оксалаксоксидазы корней проростков пшеницы (ед. на 1 г сырой массы).

Вариант	2 мин	4 мин	6 мин	8 мин
контроль	1.2 ± 0.03	3.4 ± 0.09	4.5 ± 0.06	6.0 ± 0,.
<i>A. brasilense</i> Sp7	2.3 ± 0.15	5.4 ± 0.04	8.7 ± 0.06	11.2 ± 1.3
<i>A. brasilense</i> Sp7.2.3	1.6 ± 0.02	3.4 ± 0.06	5.6 ± 0.06	7.2 ± 0.5

В контроле проростки находились 10 мин в растворе 0.01 М KCl, в опыте – на той же среде, содержащей лектин (концентрация лектина родительского штамма – 10 мкг/мл, мутантного – 20 мкг/мл). Затем среду удаляли и к проросткам последовательно добавляли ОФД и ЩК, через указанное время определяли активность.

Как уже было отмечено, одним из альтернативных путей образования перекиси водорода в растениях может быть также окисление щавелевой кислоты оксалаксоксидазой, локализованной на поверхности корней (Hurkman et al, 1996). Оказалось, что 10-минутная обработка корней проростков растений препаратами лектинов вызывала активацию оксалаксоксидазы. Лектины родительского и мутантного штамма проявляли различия. Если лектин родительского штамма при указанной экспозиции вызывал эффект при концентрации 10 мкг/мл, лектин же мутантного штамма - при 20 мкг/мл. Так, активность для родительского и мутантного штаммов составила через 8 мин после инициации реакции 11.2 ± 1.3 и 7.2 ± 0.5 ед. на 1 г сырой массы, соответственно, в контрольных проростках, т.е. не инкубированных с лектинами она была 6.0 ± 0.2 ед. (табл. 2).

Таким образом, лектины азоспирилл способны регулировать в растениях уровень перекиси водорода благодаря повышению активности пероксидазы и оксалаксоксидазы. При действии лектинов преимущественным является окисление щавелевой кислоты оксалаксоксидазой. Полученные результаты показали, что лектин родительского штамма обладает большей регулирующей активностью в отношении обоих ферментов. Аналогичные результаты были получены и при изучении влияния лектинов на другие ферменты (Чернышева и др., 2005; Alen'kina et al, 2006). Это является еще одним подтверждением того, что лектины мутантного и родительского штаммов имеют не только структурные различия, но обладают различной степенью функциональной активности. В литературе имеются сведения об индукции метилсалициловой, абсцизовой кислотами и

ауксином синтеза перекиси водорода оксалатоксидазой в проростках ячменя. Однако время, необходимое для этого, измерялось несколькими часами (Hurkman et al., 1996). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что действие лектинов на активность оксалатоксидазы может быть более быстрым, и, возможно, связано не с экспрессией специфического гена, а, например, с конформационными перестройками молекул ферментов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что лектины азоспирилл – бактерий, улучшающих рост и развитие растений, способны увеличивать активность ферментов, которые участвуют в образовании перекиси водорода – одной из разновидностей активных форм кислорода, и таким образом влиять на адаптационные возможности растения, не вызывая его повреждения или гибели, как это происходит под влиянием индукторов при патогенезе.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ на поддержку молодых российских ученых и ведущих научных школ на выполнение научных исследований № НШ - 3171.2008.4

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

Аленькина, С.А., Петрова, Л.П., Никитина, В.Е. (1998) Получение и характеристика мутанта *Azospirillum brasilense* Sp7 по лектиновой активности. *Микробиология*, **67**, 782–787.

Дьяков, Ю.Т., Озерецковская, О.Л., Джавахия, В.Г., Багирова, С.Ф. (2001) Общая и молекулярная фитопатология. Москва, Общество фитопатологов.

Итальянская, Ю.В., Никитина, В.Е., Пономарева, Е.Г., Аленькина, С.А. (1989) Лектины

бактерий рода *Azospirillum*. *Ученые записки Тарт. Ун-та*. **35**, Р. 179.

Никитина, В.Е., Аленькина, С.А. Пономарева, Е.Г., Савенкова, Н.Н. (1996) Изучение роли клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы. *Микробиология*, **65**, 165–170.

Никитина, В.Е., Богомолова, Н.В., Пономарева, Е.Г., Соколов, О.И. (2004). Влияние лектинов азоспирилл на способность семян к прорастанию. *Известия АН. Серия биологическая*, **4**, 431–435.

Рокицкий, П.Ф. (1973) Биологическая статистика. Минск, Высшая школа.

Тарчевский, И. А. (2002) Сигнальные системы растений. Москва, Наука.

Чернышева, М.П., Аленькина, С.А., Никитина, В.Е., Игнатов, В.В. (2005) Внеклеточные протеолитические ферменты штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и регулирование их активности гомологичным лектином. *Прикл. биохимия и микробиология*. **41**, 444 – 448.

Яруллина, Л.Г., Трошина, Н.Б., Максимов, И.В., Хайруллин, Р.М. (2003) Неспецифичность участия оксалатоксидазы в защитной активации окисления *орто*-фенилендиамина в проростках пшеницы при стрессе. *Агрехимия*. **12**, 1–5.

Хайруллин, Р.М., Яруллина, Л.Г., Трошина, Н.Б., Ахметова, И.Э. (2001) Активация хитоолигосахаридами окисления *орто*-фенилендиамина проростками пшеницы в присутствии щавелевой кислоты. *Биохимия*. **66**, 354–358.

- Alen'kina, S.A., Payusova, O.A., Nikitina, V.E. (2006) Effect of *Azospirillum* lectins on the activities of wheat-root hydrolytic enzymes". *Plant and Soil*. **283**, 147–151.
- Bradford, M. (1976) M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Chen, S.-X., Schopfer, P. (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **260**, 726–735.
- Donaldson, P.A., Anderson, T., Lane, B.G., Davidson, A.L., Simmonds, D.H. (2001) Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**, 297–307.
- Echdat, Y., Ofek, I., Yachow-Yan, Y., Sharon, N., Mirelman, D. (1978) Isolation of mannose-specific lectin from *E.coli* and its role in the adherence of the bacterial to epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 1551–1559.
- Frahry, G., Schopfer, P. (1998) Hydrogen peroxide production by roots and its stimulation by exogenous NADH. *Physiol. Plantarum.* **103**, 395–404.
- Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. (1996) Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. *Plant Physiol.* **110**, 971–977.
- Kauss, H., Jeblik, W. (1996) Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. *Plant Physiol.* **111**, 755–763.
- Lyon, G.D., Reglinski, T., Newton, A.C. (1995) Novel disease control chemicals: The potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathol.* **44**, 407–427.
- Pearce, R.B., Ride, J.P. (1982) Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **20**, 119–123.
- Sadasivan, L., Neyra, C.A. (1985) Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* **163**, 716–723.