

УДК 581.14:579.2

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ БАКТЕРИЯМИ РОДА *AZOSPIRILLUM*

Н.В. ЕВСЕЕВА, Л.Ю. МАТОРА, Г.Л. БУРЫГИН, С.Ю. ЩЕГОЛЕВ

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

e-mail: evseeva@ibppm.sgu.ru

Исследовали физиолого-биохимические изменения в проростках пшеницы при инокуляции ассоциативными бактериями *A. brasilense* Sp7 и Sp245. Функциональную активность меристематических клеток корней оценивали по результатам определения митотического индекса (МИ) клеток и сравнительного иммунохимического анализа в них пролиферативного антигена инициалей (ПАИ). Установлено, что в ответ на обработку живыми бактериальными клетками *A. brasilense* Sp7 и Sp245 наблюдалось повышение МИ меристематических клеток корней и содержания в них ПАИ. При этом отмечено удлинение побега и корней проростков пшеницы. Масса сухого вещества побега и корней проростков увеличивалась незначительно. Живые энтеробактерии *E. coli* K12 не оказывали стимулирующего действия на растения. Предобработка бактериальных клеток *A. brasilense* Sp245 глутаровым альдегидом приводила к подавлению их стимулирующего действия на растения. Обсужден вопрос о связи ПАИ с трансдукцией гормонального сигнала в клетке. Полученные результаты дают возможность оценить информативность определения ПАИ в качестве показателя эффективности растительно-бактериальных взаимодействий.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasilense*, *Escherichia coli*, пролиферативный антиген инициалей, митотический индекс, антитела, иммуноферментный анализ.

Одной из актуальных проблем современной агробиологии является исследование физиолого-биохимических основ функционирования растительно-микробных симбиозов, среди которых важное место занимает высокоэффективное взаимодействие ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* с пшеницей. Получая от растения доступные органические вещества, азоспириллы, как и другие ростстимулирующие микроорганизмы, поставляют своим партнерам азотсодержащие соединения, способствуют повышению доступности фосфора в ризосфере, синтезируют фитогормоны и витамины, стимулирующие развитие растений, снижают численность и подавляют активность почвенных фитопатогенов [4, 19]. Принимая во внимание выявленные позитивные эффекты взаимодействия макро- и микропартнеров в ассоциативном симбиозе, заметим, что основная масса работ посвящена особенностям функционирования ризобактерий без детального рассмотрения фенотипа, физиолого-морфологических и биохимических изменений в растении-хозяине. А эти по-

казатели особенно важны при ассоциативном взаимодействии растений с бактериями, где нет четко выраженных атрибутов симбиоза, присущих, например, ризобиям. Поэтому актуальным остается выбор достаточно надежных физиолого-биохимических тестов, характеризующих эффективность этих взаимодействий. В частности, до сих пор мало внимания уделяется исследованиям особенностей функционирования апикальных меристем корня, являющихся образовательными и регулируемыми центрами растения-хозяина [3] и одним из основных мест локализации ассоциативных бактерий [13].

В ходе предварительных исследований было установлено, что меристематические клетки апекса стебля пшеницы характеризуются наличием белка-маркера, названного пролиферативным антигеном инициалей, содержание которого отражает функциональную активность этих клеток [10]. ПАИ локализуется в цитозоле клетки, обнаруживается в апикальных меристемах стебля и корня, зародыше и каллюсе пшеницы [9, 20]. Кроме того, в ходе исследований морфогенетических процессов в культуре *in vitro* пшеницы было показано, что содержание ПАИ в каллюсах положительно коррелирует с их эмбриогенной способностью [2]. Это дало нам основание предположить, что оценка содержания ПАИ может быть использована в качестве одного из биохимических критериев, характеризующих эффективность взаимодействия растений с ассоциативной микрофлорой.

Целью настоящей работы было исследование функциональной активности клеток корневых меристем проростков пшеницы сорта Саратовская 29 при инокуляции ассоциативными бактериями *A. brasilense* Sp7 и Sp245 с оценкой информативности определения ПАИ в качестве показателя эффективности растительно-бактериальных взаимодействий.

Методика

Инокуляция корневой системы проростков пшеницы суспензиями живых и инактивированных бактериальных клеток. Реакции растений на взаимодействие с ассоциативной микрофлорой исследовали в модельной системе азоспириллы—пшеница. В качестве растения-хозяина взят один из самых распространенных сортов яровой пшеницы на Юго-Востоке — Саратовская 29 (*Triticum aestivum* var. *lutescens*). Микросимбионтами служили модельный *A. brasilense* Sp245 и типовой *A. brasilense* Sp7 штаммы микроорганизмов [11].

Семена пшеницы тщательно промывали водой с моющим средством, выдерживали 2 мин в 70 %-м этаноле, затем обрабатывали 0,01 %-м раствором диацида в течение 5 мин. После этого семена промывали стерильной дистиллированной водой и оставляли в термостате (36 °С) на 1 ч для набухания. Для проращивания семена пшеницы раскладывали на стеклянные мостики, помещенные в пластиковые кюветы со стерильной дистиллированной водой. Кювету с семенами оставляли в термостате (25 °С) на 3 сут.

Бактериальную культуру выращивали на жидкой малатной среде [15] при 30 °С на круговой качалке при интенсивности перемешивания 120 об/мин до окончания экспоненциальной фазы роста (18 ч). Клетки осаждали центрифугированием (3000 g) и суспендировали в 0,12 М забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (рН 7,2) следующего состава, г/л: KH_2PO_4 — 0,43; Na_2HPO_4 — 1,68; NaCl — 7,20. Процедуру цен-

трифугирования азоспирилл в ЗФР повторяли дважды для отмывания бактерий от культуральной жидкости. Для инокуляции растений живыми интактными клетками использовали бактериальные суспензии с оптической плотностью $A_{550} = 0,1$. Чтобы получить нежизнеспособные клетки, бактерии помещали в ЗФР, содержащий 2 % глутарового альдегида (ГА), инкубировали в течение ночи (18 ч) при 4 °С, а затем дважды отмывали ЗФР.

Этиолированные 3-суточные проростки пшеницы инокулировали в течение 1 сут суспензией бактерий. По окончании инокуляции растения переносили в водную культуру и помещали в оранжерею (24 °С, влажность воздуха — 60 %, освещенность — 60 мкмоль/(м² · с)). Контролем в эксперименте служили необработанные растения, выращенные в водной культуре. Отбор проб осуществляли через 2 сут после инокуляции.

Экстракция суммарной фракции водорастворимых белков из апикальных меристем корня пшеницы. Фракцию водорастворимых белков экстрагировали из апикальных меристем корня проростков пшеницы. Для этого отделяли кончики корней (2—3 мм), растительную ткань разрушали в жидком азоте. Экстракцию проводили при 4 °С в буфере следующего состава: 0,05 М *трис*-HCl (pH 7,8), 0,001 М ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид). Соотношение навески растительного материала (мг) и объема среды выделения (мл) составляло 1 : 5. Гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали в экспериментах. Одна проба представляла собой совокупность кончиков корней, отделенных от 10 проростков.

Определение митотического индекса меристематических клеток. Митотический индекс клеток зоны меристемы корней пшеницы определяли согласно общепринятой методике [6]. Для этого кончики корней проростков (2—3 мм) фиксировали в смеси уксусной кислоты с этанолом (1 : 3). Материал окрашивали в ацетогематоксилине, затем кончики корней мацерировали с использованием фермента цитазы [5] и рассматривали при 600-кратном увеличении (микроскоп Leica DM 2500). Каждый опыт проводили в трех повторностях. По каждому варианту эксперимента анализировали кончики корней 5 проростков, в каждом кончике корня — не менее 1000 клеток.

Твердофазный иммуноферментный анализ. При проведении иммуноферментного анализа для оценки содержания ПАИ в растительных экстрактах в качестве твердой фазы использовали полистироловые 96-луночные планшеты («Медполимер», Санкт-Петербург). В каждую лунку вносили по 50 мкл последовательных двукратных разбавлений образцов (водорастворимых фракций меристематических белков, нормированных по концентрации суммарного белка). Сначала инкубировали на шейкере 1 ч при комнатной температуре, затем стационарно 18 ч при 4 °С. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл 0,05 %-го раствора полиэтиленгликоля-20000 для блокирования свободных связей на полистироле (на 1 ч). После этого раствор полиэтиленгликоля удаляли и добавляли по 50 мкл кроличьих поликлональных моноспецифических антител (АТ) к ПАИ, растворенных в ЗФР, содержащем 0,02 % твин-20 и 0,05 % ПЭГ (раствор 1) (конечная концентрация АТ 55 мкг/мл). После инкубирования с АТ при 37 °С в течение 1 ч лунки планшета трижды промывали ЗФР, содержащим 0,02 % твин-20 (раствор 2). Затем в лунки вносили по 50 мкл раствора 1, в который были добавлены меченые пероксидазой козы антикроличьи АТ («Sigma», США) (2 мкг/мл). Планшеты дважды

промывали раствором 2 и в лунки вносили по 50 мкл субстрата для оценки пероксидазной активности, представляющего собой смесь 0,03 % ортофенилендиамин и 0,02 % пероксида водорода в 0,1 М натрий-цитратном буфере (рН 4,5). Реакцию останавливали внесением в лунки планшетов по 100 мкл 1 н раствора серной кислоты. Интенсивность хромофорного ответа, прямо пропорциональную содержанию ПАИ в образце, определяли на иммуноферментном анализаторе АИФ-Ц-01С (ЗАО ИЛИП, Санкт-Петербург) при длине волны 490 нм.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [14].

Определение физиолого-морфологических параметров проростков пшеницы. Оценивали следующие показатели проростков пшеницы: масса сухого вещества побега и корней, длина главного корня, суммарная длина корней, длина побега одного проростка (среднее число из 30 значений). Для установления массы сухого вещества образцы помещали в фольгу и высушивали в сушильном шкафу при 105 °С до постоянной массы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Excel Microsoft Office 2003. Пробы взяты не менее чем в трех повторностях в независимых экспериментах. В таблицах и на гистограммах приведены средние значения анализируемых показателей и доверительный интервал.

Результаты и обсуждение

Функциональную активность меристематических клеток кончика корня проростков пшеницы оценивали двумя методами: по результатам определения МИ клеток и сравнительным иммунохимическим оценкам содержания ПАИ, рассматриваемого нами в качестве молекулярного маркера этих клеток. Такой комбинированный подход с использованием двух методов анализа дал возможность более надежно охарактеризовать изменение функциональной активности меристематических клеток корня пшеницы при взаимодействии их с бактериями.

Согласно полученным результатам, инокуляция корневой системы проростков штаммами *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 приводила к повышению МИ меристематических клеток корня соответственно при-

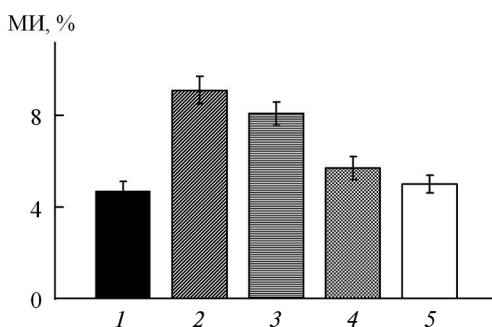


Рис. 1. Изменение митотического индекса (%) меристематических клеток корня 6-суточных проростков пшеницы. Здесь и на рис. 2:

1 — неинокулированные проростки; 2 — 4 инокулированные живыми бактериями растения (2 — *A. brasilense* Sp245; 3 — *A. brasilense* Sp7; 4 — *E. coli* K12); 5 — растения при взаимодействии с бактериями *A. brasilense* Sp245, обработанными ГА

мерно в 2 и 1,7 раза (рис. 1). В то же время содержание ПАИ при инокуляции этими штаммами увеличивалось примерно в 1,4 раза (рис. 2). В варианте взаимодействия корневой системы проростков с энтеробактериями *E. coli*, которые не являются ростстимулирующими ризобактериями, достоверных различий по МИ меристематических клеток корня и содержанию в них ПАИ по сравнению с контрольными растениями не наблюдалось (см. рис. 1, 2).

При взаимодействии проростков пшеницы с нежизнеспособными бактериями (обра-

ботанными ГА) МИ меристематических клеток корня и содержание в них ПАИ существенно не изменялись по сравнению с контрольным вариантом (см. рис. 1, 2). Полученные данные согласуются с результатами работы [12], где показано, что убитые прогреванием азоспириллы теряют способность к адсорбции, что свидетельствует о необходимости активного протекания метаболизма бактерий для прикрепления их к корням.

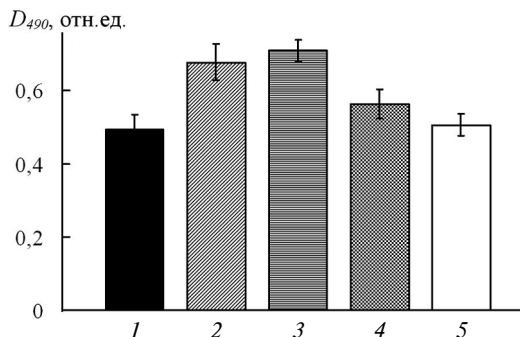


Рис. 2. Сравнение содержания пролиферативного антигена инициалей в меристематических клетках корня 6-суточных проростков пшеницы

Из литературных данных известно, что в прикреплении бактерий к корням задействованы как неспецифические механизмы, связанные с зарядом и гидрофобностью поверхности бактерий, так и специфические взаимодействия, которые на разных стадиях адсорбции опосредуются поверхностно локализованными белками или полисахаридами [18]. В наших экспериментах обработанные ГА бактерии, по-видимому, теряли способность к специфической адсорбции на поверхности корня, что приводило к отсутствию реакции со стороны растения.

Для оценки ростстимулирующего действия азоспирилл на растения были определены также физиолого-морфологические показатели проростков пшеницы. Установлено, что инокуляция корневой системы растений азоспириллами приводила к незначительному удлинению главного корня, а также к увеличению длины побега и корневой системы одного проростка соответственно примерно в 1,2 и 1,4 раза по сравнению с контрольными растениями. При этом масса сухого вещества побега и корней одного проростка возрастала незначительно. Обработка проростков живыми энтеробактериями *E. coli* или убитыми азоспириллами не приводила к существенным изменениям физиолого-морфологических показателей растений (таблица).

В литературе есть немногочисленные данные, свидетельствующие об активизации деления клеток в корневых меристемах растений при взаимодействии с ассоциативной микрофлорой [17]. Механизм этого процесса возможно связан с дополнительным синтезом азоспириллами ауксина и цитокинина [1] как ростстимулирующих гормонов, контролирующего функционирование апикальных меристем побега и корня [7, 21]. Известно, что в ответ на повышение концентрации указанных гормонов активизируются все звенья трансдукции гормонального сигнала в ядро растительной клетки, что приводит к активированию гормонспецифичных факторов транскрипции [8]. Все это наряду с фиксацией бактериями атмосферного азота возможно и приводит к хорошо известным ростстимулирующим эффектам в растении.

На основании полученных экспериментальных данных об одновременном повышении МИ меристематических клеток корней пшеницы и содержания в них ПАИ логично предположить, что ПАИ может выполнять функцию одной из протеинкиназ или быть одним из белковых факторов регуляции транскрипции. И те, и другие являются важнейшими унифицированными звеньями сигнальных систем растений [8].

*Физиолого-морфологические параметры 6-суточных проростков пшеницы при инокуляции корневой системы растений живыми бактериями *A. brasilense* Sp245, Sp7, *E. coli* и при обработке нежизнеспособными бактериями *A. brasilense* Sp245*

Вариант	Длина главного корня, мм	Длина побега, мм	Длина корней одного проростка, мм	Масса сухого вещества побега, мг	Масса сухого вещества корней одного проростка, мг
Контроль	68±3	100±4	178±10	8,0±0,4	4,7±0,3
Инокуляция <i>A. brasilense</i> Sp245	77±4	119±5	249±12	9,5±0,5	5,5±0,2
Инокуляция <i>A. brasilense</i> Sp7	75±3	117±4	239±12	9,6±0,4	5,0±0,3
Обработка бактериями <i>E. coli</i>	70±2	102±4	198±9	8,7±0,5	4,9±0,2
Обработка нежизнеспособными бактериями <i>A. brasilense</i> Sp245	67±3	100±5	192±7	7,4±0,2	4,7±0,2

В этом плане интересна также работа, в которой показано, что в корнях рапса, инокулированного бактериями *Pseudomonas*, усиливается экспрессия генов некоторых позитивнорегуляторных белков, участвующих в растяжении и делении клеток [16].

Таким образом, следует констатировать, что реакция растения, проявляющаяся в изменении его физиологических, биохимических и морфологических параметров, происходит только при воздействии активно функционирующих ризобактерий. Кроме того, учитывая соответствие изменений содержания ПАИ в меристематических клетках корня с их митотической активностью и физиолого-морфологическими параметрами проростков пшеницы, этот показатель можно использовать для характеристики эффективности растительно-бактериальных взаимодействий.

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И. и др. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. — 2006. — 53, № 4. — С. 567—574.
2. Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В. и др. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток в культуре *in vitro* пшеницы // Там же. — 2007. — 54, № 2. — С. 306—311.
3. Иванов В.Б. Меристема как самоорганизующаяся система: поддержание и ограничение пролиферации клеток // Там же. — 2004. — 51. — С. 926—941.
4. Игнатов В.В. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. — М.: Наука, 2005. — 262 с.
5. Иорданский А.Б. Применение питазы из улиток для микрорадиоавтографии // Цитология. — 1965. — № 7. — С. 120—122.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 207 с.
7. Романов Г.А. Модель гормонально-организуемого пролиферативного роста: аналогии с ростом растений // Онтогенез. — 1992. — 23. — С. 228—236.
8. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
9. Фадеева И.Ю. Проллиферативный антиген инициалей в исследовании морфогенетических процессов в культуре *in vitro* пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Саратов, 2007. — 20 с.
10. Фещенко В.В., Евсеева Н.В., Подольный В.З., Володарский А.Д. Исследование функционального состояния апикальных меристем у пшениц, различающихся по реакции на длинный и короткий световой день // Докл. РАН. — 1992. — 327, № 2. — С. 284—288.
11. Baldani V.L.D., Baldani J.I., Dobereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. — 1983. — 29. — P. 924—929.

12. *Bashan Y., Levany H., Klein E.* Evidens for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots // J. Gen. Microbiol. — 1986. — **132**. — P. 3069—3073.
13. *Bashan Y., Levany H.* Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat // Can. J. Microbiol. — 1989. — **35**. — P. 936—944.
14. *Bradford M.N.* The rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
15. *Dobereiner J., Day J.M.* Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites // Proc. Symp. Nitrogen Fixation. — Washington: Washington State Univ. Press, 1976. — P. 518—538.
16. *Hontzeas N., Saleema S., Glick B.R.* Changes in gene expression in canola roots induced by ACC-deaminase-containing plant-growth-promoting bacteria // MPMI. — 2004. — **17**. — P. 865—871.
17. *Levanony H., Bashan Y.* Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd // Can. J. Bot. — 1989. — **67**. — P. 2213—2216.
18. *Michiels K.W., Croes C.L., Vanderleyden J.* Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots // J. Gen. Microbiol. — 1991. — **137**. — P. 2241—2246.
19. *Steenhoudt O., Vanderleyden J.* *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. — 2000. — **24**. — P. 487—506.
20. *Sumaroka M.V., Dykman L.A., Bogatyrev V.A. et al.* Use of the dot-blot immunogold assay to identify a proliferative of the initial cells of a wheat stem meristem // J. Immunoassay. — 2000. — **21**. — P. 401—410.
21. *Werner T., Motuka W., Laucou V. et al.* Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // Plant Cell. — 2003. — **15**. — P. 2532—2550.

Получено 29.03.2010

ФИЗИОЛОГО-БИОХІМІЧНІ ЗМІНИ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ ЗА ІНОКУЛЯЦІЇ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *AZOSPIRILLUM*

H.B. Євсєєва, Л.Ю. Матора, Г.Л. Бурюгін, С.Ю. Шеголеєв

Інститут біохімії та фізіології рослин і мікроорганізмів Російської академії наук, Саратов

Досліджували фізіолого-біохімічні зміни в проростках пшениці за інокуляції асоціативними бактеріями *A. brasilense* Sp7 і Sp245. Функціональну активність клітин коренів оцінювали за результатами визначення мітогічного індексу (МІ) та порівняльного імунохімічного аналізу в них проліферативного антигену ініціалей (ПАІ). Встановлено, що у відповідь на обробку живими бактеріальними клітинами *A. brasilense* Sp7 і Sp245 спостерігалось підвищення МІ меристематичних клітин коренів і вмісту в них ПАІ. При цьому відзначено подовження пагона і коренів проростків пшениці. Маса сухої речовини пагона і коренів проростка збільшувалась незначно. Живі ентеробактерії *E. coli* K12 не чинили стимулювальної дії на рослини. Попередня обробка бактеріальних клітин *A. brasilense* Sp245 глутаровим альдегідом призводила до пригнічення їх стимулювальної дії на рослини. Обговорено питання про зв'язок ПАІ з трансдукцією гормонального сигналу в клітині. Отримані результати дають можливість оцінити інформативність визначення ПАІ як показника ефективності рослинно-бактеріальних взаємодій.

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHANGES IN WHEAT SEEDLINGS INOCULATED WITH *AZOSPIRILLUM* BACTERIA

N.V. Evseeva, L.Yu. Matora, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences

13 Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia

Physiological-biochemical changes in wheat seedlings inoculated with the associative bacteria *Azospirillum brasilense* Sp7 and Sp245 were investigated. The functional activity of root meristem-

atic cells and the plants' physiological-morphological parameters were determined. Meristematic cell activity was revealed by the results of determination of the cells' mitotic index and by the results of comparative immunochemical estimation of the content in these cells of the proliferative antigen of initials (PAI). It was found that in response to treatments with living cells of *A. brasilense* Sp7 and Sp245, the mitotic index of the root meristematic cells increased approximately 2-fold and PAI content in these cells increased almost 1.5-fold. The shoots and roots length increased 1.2 and 1.4-fold, respectively. The dry weight of the shoots and roots increased insignificantly. Living *Escherichia coli* K12 enterobacteria had no stimulatory effect on the plants. Pretreatment of cells of *A. brasilense* Sp245 with glutaraldehyde suppressed their stimulatory effect on the plant. We also discuss the relation between PAI and hormonal signal transduction in the cell. The obtained results give grounds to assess the informational value of PAI determination as an indicator of the effectiveness of plant-bacterial interactions.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasilense*, *Escherichia coli*, proliferative antigen of initials, mitotic index, antibodies, enzyme immunoassay.