

УДК 339.13.012

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*

Н. И. Старичкова¹, В. В. Дмитриенко²

¹ *Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского*
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83
E-mail: natstar-12@mail.ru

² *АО «Клиника доктора Парамонова»*
Россия, 410012, Саратов, Чапаева В. И., 90

Поступила в редакцию 24.07.2017 г.

Изменение физиолого-морфологических параметров проростков пшеницы при действии липополисахарида бактерий рода *Azospirillum*. – Старичкова Н. И., Дмитриенко В. В. – В работе исследовалось действие липополисахарида (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий рода *Azospirillum brasilense* Sp245 на митотическую активность меристематических клеток корня проростков пшеницы. Действие этого мажорного компонента клеточной поверхности азоспирилл сравнивали с воздействием живых бактерий. Результаты сравнивались с воздействием ЛПС и целых клеток *Escherichia coli* K12 и *Rhizobium leguminosarum* 249. Полученные результаты показали, что ЛПС азоспирилл положительно влияет на функциональную активность меристематических клеток корня, а также на физиолого-морфологические параметры проростков пшеницы. Это действие было сопоставимо с влиянием живых бактерий. Полученные результаты дают основание рассматривать ЛПС в качестве одного из активных компонентов клеточной поверхности азоспирилл, не только определяющего их контактные взаимодействия с корнями пшеницы, но и участвующего в индукции ответных реакций растений на эти взаимодействия.

Ключевые слова: липополисахарид, мембрана, грамотрицательные бактерии, митотическая активность, меристематические клетки, проростки пшеницы.

The changes of the physiological and morphological parameters of wheat seedlings under the action of lipopolysaccharide in bacteria of the genus *Azospirillum*. – Starichkova N. I., Dmitrienko V. V. – The authors investigated

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

the effect of lipopolysaccharide (LPS) outer membrane of gram-negative bacteria of the genus *Azospirillum brasilense* Sp245 on mitotic activity of meristematic cells of root of wheat seedlings. The effect of this major component of the cell surface of *Azospirillum* compared with the effects of living bacteria. The results were compared with the effects of LPS and whole cells of *Escherichia coli* K12 and *Rhizobium leguminosarum* 249. The results showed that LPS of azospirill a positive effect on the functional activity of meristematic cells of the root, as well as on physiological and morphological parameters of wheat seedlings. This action was comparable to the effect of live bacteria. The obtained results give grounds to consider LPS as one of the active components of the cell surface azospirill, not only determining their contact interaction with the roots of wheat, but also involved in the induction of responses of plants to these interactions.

Key words: lipopolysaccharide, membrane, gram-negative bacteria, the mitotic activity of meristematic cells of wheat seedlings.

DOI: 10.18500/1682-1637-2017-15-3-66-73

Азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* являются признанным модельным объектом в исследовании феномена растительно-микробной ассоциативности. Скрытый характер взаимодействия ассоциативных бактерий с растением в значительной мере затрудняет изучение физиолого-биохимических и генетических механизмов, определяющих его эффективность. В связи с этим, большое значение имеет выявление активных компонентов партнеров-ассоциантов, характеризующих эффективность их взаимодействий. Было показано, в частности, что при ассоциативных взаимодействиях бактерий с корнями злаков важную роль играет липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий рода *Azospirillum*. Установлено, что ЛПС азоспирилл приводит к увеличению синтеза мажорных белков в апопласте клеток корня пшеницы, что было сравнимо с действием интактных бактериальных клеток (Matora et al., 1995).

Следует заметить, что в настоящее время мало внимания уделяется функционированию апикальных корневых меристем растений при их взаимодействии с микроассоциантами, хотя именно эти органы являются образовательными и регулируемыми центрами растения-хозяина, а также представляют собой одно из основных мест локализации ассоциативных бактерий (Bashan et al., 1986).

Цель исследования – определить митотический индекс клеток корневых меристем и физиолого-морфологические параметры проростков пшеницы при обработке их ЛПС бактерий *A. brasilense* Sp245,

Escherichia coli K12, *Rhizobium leguminosarum* 249 и при инокуляции целыми бактериальными клетками этих бактерий.

Материал и методы

Проращивание семян. В качестве растения-хозяина был взят сорт яровой пшеницы Саратовская 29 (*Triticum aestivum lutescens* L.), который является одним из самых распространенных сортов сильной яровой пшеницы на Юго-Востоке. Семена пшеницы тщательно отмывали водой с моющим средством и выдерживали 1 мин. в 70%-ном этиловом спирте. Затем семена обрабатывали раствором диацида (1:1000) (этанолртутихлорид – 16.5 мг / 50 мл и цетилпиридинийхлорид – 33 мг / 50 мл) в течении 5 мин. После этого семена многократно промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в термостат на 1 ч. при 36 °С для набухания. Для проращивания семена пшеницы раскладывали на стеклянные мостики, помещенные в пластиковые кюветы с стерильной дистиллированной водой. Кювету с семенами ставили в термостат при 25 °С на 3 суток.

Инокуляция корневой системы проростков живыми бактериальными клетками. В качестве микроассоцианта был взят штамм *A. brasilense* Sp245, который является факультативным эндофитом и представляет собой один из модельных объектов в исследовании феномена ассоциативности. В качестве сравнения были использованы энтеробактерии штамма *E. coli* K12 и штамма *R. leguminosarum* 249, являющегося специфическим симбионтом растений семейства бобовых.

Этиолированные трехсуточные проростки пшеницы инокулировали в течение суток в суспензии бактерий (выращенных до логарифмической фазы роста) с концентрацией 10^8 кл/мл (суспензии бактерий были предоставлены сотрудниками лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН, г. Саратов). По окончании инокуляции растения переносили в водную культуру и помещали на свет ($t = 25$ °С, влажность воздуха – 60%, освещенность – 60 мкМ/м²/с). Контролем в эксперименте служили необработанные растения, выращенные в водной культуре. Пробы отбирали через двое суток после инокуляции.

Обработка корневой системы проростков бактериальным липополисахаридом. Этиолированные трехсуточные проростки пшеницы инокулировали в течение суток в растворе ЛПС бактерий *A. brasilense*

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Sp245 в концентрациях 1, 10 и 150 мкг/мл, а также в растворах ЛПС энтеробактерий *E. coli* K12 и ЛПС специфического симбионта бобовых *R. leguminosarum* 249 в концентрации 10 мкг/мл (препараты бактериальных ЛПС были выделены из наружной мембраны исследуемых бактерий сотрудниками лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН). Контролем в эксперименте служили необработанные растения, выращенные в водной культуре. По окончании инкубирования растения переносили в водную культуру и помещали в оранжерею (24 °С, влажность воздуха – 60%, освещенность – 60 мкМ/м²/с). Отбор проб осуществляли через двое суток после обработки.

Определение митотического индекса клеток корневых меристем проростков пшеницы проводили согласно общепринятой методике с некоторыми модификациями (Паушева, 1988). Пробы для подсчета митотического индекса брали в помещении, где температура была не менее 25 °С. Фиксацию проводили смесью 96% этилового спирта и уксусной кислоты 1 : 3 (фиксатор Карнуа) в течении суток. Фиксированные корни помещали последовательно: 1N раствор HCl на 10 минут; 50%-ный раствор HCl на 20 минут; H₂O дистиллированная; 45%-ая уксусная кислота на 20 минут; ацетогематоксилин 50 минут; H₂O дист. (3 раза); цитаза (фермент виноградных улиток) – 50 минут; H₂O дист. (3 раза).

Для приготвления препарата корень помещали в каплю раствора на предметном стекле, содержащего 70% хлоралгидрат и 45% уксусную кислоту (1:1), и смотрели под микроскопом, чтобы отделить кончик корня (1-3мм) от клеток зоны растяжения. После этого препарат покрывали покровным стеклом. Затем проводили подсчет делящихся и покоящихся клеток при 600-кратном увеличении (микроскоп фирмы Leica DM 2500). Митотический индекс рассчитывали по формуле: $M. I. = N_d / N_{общ} \times 100$, где: N_d – количество делящихся клеток; $N_{общ}$ – общее количество клеток. Каждый опыт проводили в трех повторностях. По каждому варианту эксперимента анализировали кончики корней от 5-ти проростков. В каждом кончике корня анализировали не менее 1000 клеток.

Определяли следующие физиолого-морфологические параметры проростков пшеницы: сухая масса побегов и корней; суммарная длина корней и длина побега одного проростка (среднее число из 30 значе-

ний). Для определения сухой массы образцы помещали в фольгу и высушивали в сушильном шкафу при $t = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянной массы.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции (версия 2.09; отдел статистического анализа РАСХН). Кроме того, полученные данные ранжировали согласно тесту Дункана при уровне значимости ≤ 0.05 . В таблицах и на гистограммах показана величина наименьшей существенной разницы ($\text{НСР}_{0.05}$). Все эксперименты были проведены в трехкратных повторностях.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что инокулированные проростки пшеницы визуально отличались от контрольных вариантов по длине побега только при инокуляции бактериями штамма *A. brasilense* Sp245.

В ответ на инокуляцию азоспирами митотический индекс меристематических клеток корня увеличивался в 2 раза (рис. 1).

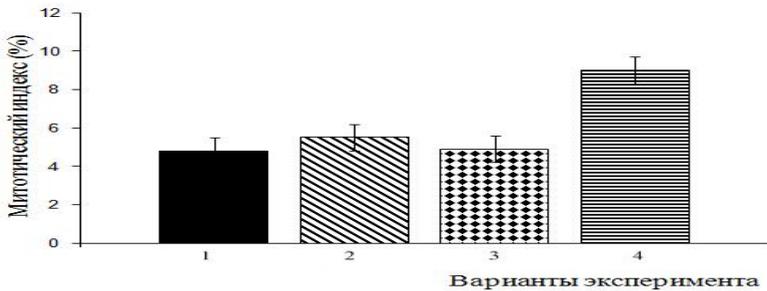


Рис. 1. Изменение митотического индекса меристематических клеток 6-суточных проростков пшеницы при инокуляции бактериями: 1 – контроль; 2 – *E. coli* K12; 3 – *R. leguminosarum* 249; 4 – *A. brasilense* Sp245. На гистограммах показано значение наименьшей существенной разницы при уровне значимости ≤ 0.05 ($\text{НСР}_{0.05}$)

Напротив, взаимодействие корневой системы проростков с бактериями *E. coli*, которые не относятся к ростстимулирующим ризобактериям, приводило к незначительным различиям в митотическом индексе по сравнению с контрольными растениями (см. рис. 1). При исполь-

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

зовании специфического симбионта бобовых *R. leguminosarum* 249 в качестве инокулянта митотическая активность меристематических клеток не изменялась (см. рис. 1). Изменение функциональной активности корневых меристем приводило к изменению физиолого-морфологических параметров проростков пшеницы при инокуляции бактериями *A. brasilense* Sp245 в сравнении с обработкой бактериями *R. leguminosarum* 249 и *E. coli* K12. Контроль – неинокулированные растения (табл. 1).

Таблица 1

Физиолого-морфологические параметры 6-суточных проростков пшеницы

Обработка	Длина корней 1-го проростка, мм	Длина побега, мм	Сухая масса корней 1-го проростка, мм	Сухая масса побега, мм
Контроль	193 <i>a</i>	87 <i>a</i>	2.5 <i>a</i>	7.2 <i>a</i>
<i>E. coli</i> K12	187 <i>a</i>	90 <i>ab</i>	2.6 <i>a</i>	7.1 <i>a</i>
<i>R. leguminosarum</i> 249	201 <i>a</i>	93 <i>b</i>	2.8 <i>a</i>	8.6 <i>bc</i>
<i>A. brasilense</i> Sp245	242 <i>b</i>	101 <i>c</i>	5.4 <i>b</i>	9.0 <i>c</i>
НСР _{0.05}	26.6	3.1	0.6	0.9

Приведены средние значения анализируемых показателей и наименьшая существенная разница при уровне значимости ≤ 0.05 (НСР_{0.05}).

При инокуляции корневой системы проростков азоспирамилами увеличивались длина и сухая масса корней приблизительно в 1.3 и 2.2 раза, соответственно. Длина и сухая масса побега увеличивались в 1.2 и 1.3 раза, соответственно. Напротив, взаимодействие с *E. coli* and *R. leguminosarum* не приводило к существенным изменениям в длине побега и корней проростка. Сухая масса побега достоверно увеличивалась только после инокуляции *R. leguminosarum*.

Исследование физиолого-морфологических параметров проростков пшеницы при обработке их ЛПС *A. brasilense* Sp245 (концентрация 10 мкг/мл) показало, что ЛПС не влиял на длину побега проростков пшеницы. В то же время под влиянием ЛПС увеличивался митотический индекс клеток корневых меристем в 1.8 раза.

При обработке корневой системы проростков ЛПС, выделенных из наружной мембраны *E. coli* and *R. leguminosarum* 249, не наблюдалось достоверных различий в значении митотического индекса меристематических клеток проростков пшеницы (рис. 2).

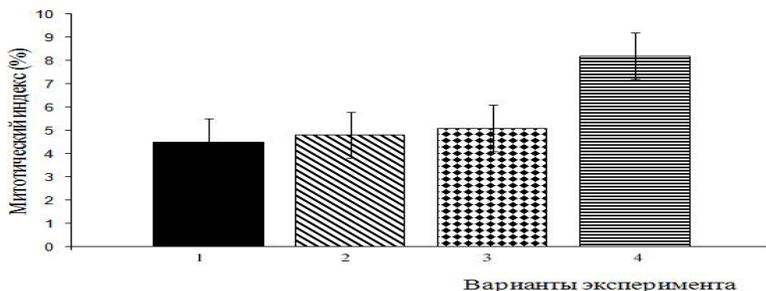


Рис. 2. Изменение митотического индекса меристематических клеток 6-суточных проростков пшеницы при обработке бактериальным ЛПС: 1 – контроль; 2 – ЛПС *E. coli* K12; 3 – ЛПС *R. leguminosarum* 249; 4 – ЛПС *A. brasilense* Sp245. На гистограммах показано значение наименьшей существенной разницы при уровне значимости ≤ 0.05 (НСР_{0.05})

При обработке растений ЛПС исследуемых бактерий изменялись также физиолого-морфологические параметры проростков пшеницы (табл. 2).

Таблица 2
Физиолого-морфологические параметры 6-суточных проростков пшеницы после обработки корней бактериальным ЛПС

Обработка	Длина кор-ней одного проростка, мм	Длина побега, мм	Сухая масса корней одного проростка, мм	Сухая масса побега, мм
Контроль	178 a	90 a	3.0 b	8.3 b
<i>E. coli</i> K12	180 a	90 a	2.3 a	8.5 b
<i>R. leguminosarum</i> 249	188 b	92 a	2.9 b	8.0 a
<i>A. brasilense</i> Sp245	213 c	91 a	4.1 c	8.8 c
НСР _{0.05}	7.2	–	0.4	0.3

Приведены средние значения анализируемых показателей и наименьшая существенная разница при уровне значимости ≤ 0.05 (НСР_{0.05}).

В частности, длина и сухая масса корней достоверно увеличивались только при действии ЛПС *A. brasilense* Sp245 в 1.2 и 1.4 соответственно. В то же время сухая масса побега в расчете на один проросток

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

достоверно увеличивалась только при действии ЛПС *A. brasilense* Sp245, в то время как длина побега при этом не изменялась в отличие от действия живых бактериальных клеток.

Таким образом, можно констатировать, что ЛПС азоспирилл в концентрации 10 мкг/мл приводит к увеличению митотического индекса меристематических клеток корней пшеницы, что сравнимо с действием живой бактериальной культуры. В связи с этим, ЛПС можно рассматривать в качестве одного из активных компонентов клеточной поверхности азоспирилл не только определяющего их контактные взаимодействия с корнями пшеницы (Федоненко с соавт., 2001), но участвующего также в процессах, индуцирующих ответные реакции растений на эти взаимодействия.

Список литературы

Bashan Y., Levanyon H., Klein E. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots // *J. Gen Microbiol.* 1986. Vol. 132. P. 3069 – 3073.

Matora L. Yu., Solovova G., Serebrennikova O., Selivanov N., Shchyogolev S. Immunological properties of *Azospirillum* cell surface: the structure of carboglycane antigens and evaluation of their involvement in bacteria-plant contact interaction // *Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology* / Eds. I. Fendrik, M. del Gallo, M. De Zamaroczy, J. Vanderleyden. Berlin: Springer, 1995. P. 377 – 382.

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 153 с.

Fedonenko Yu. P., Egorenkova I. V., Konnova S. A., Ignatov V. V. Involvement of the Lipopolysaccharides of *Azospirilla* in the Interaction with Wheat Seedling Roots // *Microbiology (Moscow).* 2001. Vol. 70, № 3. P. 384 – 390.