

УДК 579.22,581.1

ПРОБИОТИКИ ДЛЯ РАСТЕНИЙ: NO-ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ЛАКТОБАЦИЛЛЫ ЗАЩИЩАЮТ РАСТЕНИЯ ОТ ЗАСУХИ

© 2014 г. Д. Р. Яруллина, Е. В. Асафова, Ю. Е. Картунова,
Г. К. Зиятдинова, О. Н. Ильинская

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань 420008

e-mail: kasfes@gmail.com

Поступила в редакцию 4.06.2013 г.

После инокуляции корней пшеницы суспензией бактерий *Lactobacillus plantarum* в листьях обнаружено нивелирование окислительного стресса, регистрируемого по накоплению H_2O_2 и малонового диальдегида. При определении вклада бактериального NO в развитие стресс-реакции растений выявлены активация каталазы и повышение интегральной антиоксидантной емкости в проростках, обработанных лактобациллами с индуцированным синтезом NO. Таким образом, впервые показано, что лактобациллы оказывают влияние на защитно-приспособительные реакции растений при стрессе, в том числе при участии оксида азота.

DOI: 10.7868/S0555109914020196

Оксид азота (NO) играет важную роль в защитных реакциях растений на стресс, вызванный абиотическими факторами, в частности обезвоживанием [1, 2]. Абиотические стрессоры нарушают внутриклеточный редокс-гомеостаз, что ведет к образованию активных форм кислорода (АФК) и развитию окислительного стресса [3]. При этом в растениях увеличивается синтез оксида азота, который связывает АФК и таким образом снижает последствия окислительного стресса. Кроме того, NO способен регулировать экспрессию генов стресс-ответа, прежде всего антиоксидантных ферментов [2]. В связи со стресс-лимитирующей ролью NO, экзогенные доноры оксида азота, например нитропруссид натрия, применяются в качестве элиситоров для повышения устойчивости растений к засухе [4, 5].

Микроорганизмы прикорневой зоны растений (ризосферы) также оказывают на растения протекторное действие, механизмы которого могут быть различны. Стимулирующие рост растений ризобактерии (plant growth-promoting rhizobacteria, или PGPR) способствуют более высокой устойчивости растений к засухе за счет активности 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазы, снижающей в растениях уровень “стрессового” этилена [6]. Бактерии *Paenibacillus polymyxa* активируют в растениях *Arabidopsis thaliana* экспрессию генов стресс-ответа *ERD15* и *RAB18* [7]. У ряда микроорганизмов обнаружена способность образовывать фитогормоны, аналогичные тем, которые регулируют устойчивость растений к воздействию неблагоприятных факторов среды: ауксины (например, индолил-3-уксусную кислоту), абсцизовую кислоту, цитокинины

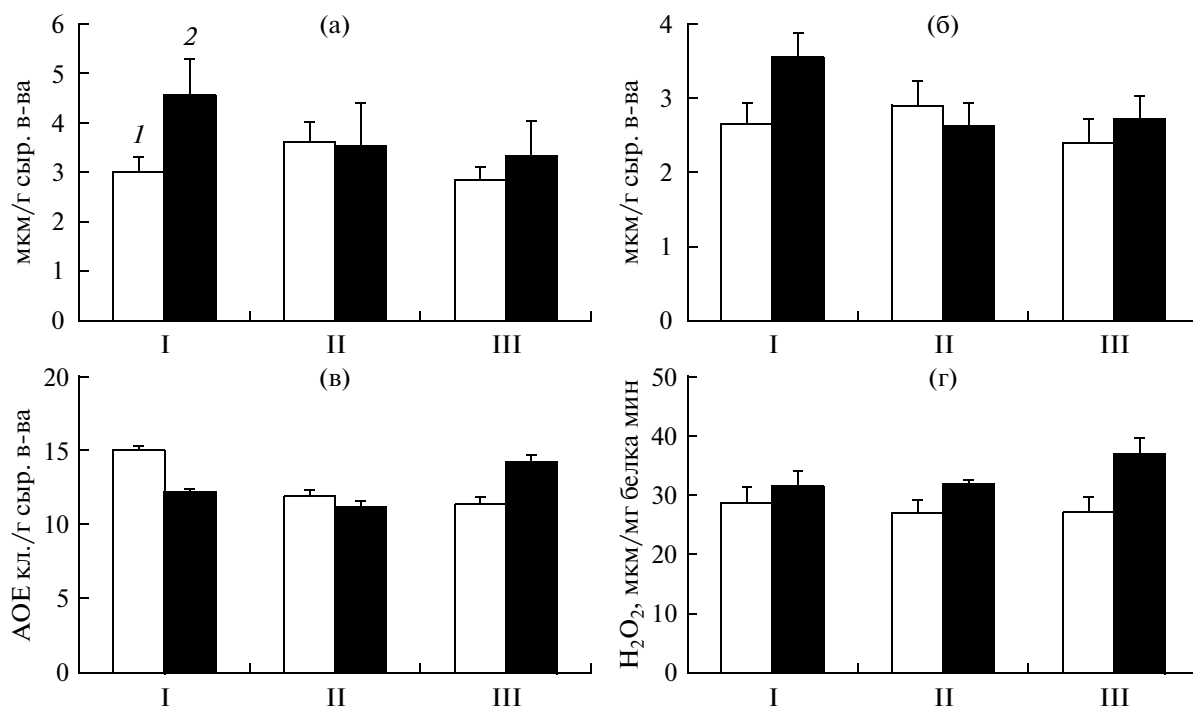
и гиббереллины [8]. Индуцированная стресс-устойчивость растений может быть опосредована такими свойствами PGPR, как способность фиксировать молекулярный азот атмосферы, трансформировать труднорастворимые соединения почвы, прежде всего минеральные фосфаты, изменять проницаемость мембран клеток корневых тканей, тем самым увеличивая поглощательную способность корней растений, и др. [6].

Известно, что бактериальный NO легко преодолевает межклеточные барьеры и вовлечен в симбиотические отношения растений и ризосферных микроорганизмов: так, оксид азота, синтезируемый *Azospirillum brasilense*, индуцирует образование латеральных корней у томата [9, 10]. В настоящей работе впервые продемонстрировано влияние бактериального оксида азота на вызванный обезвоживанием окислительный стресс в растениях пшеницы. Поскольку в качестве биогенного источника NO выбраны бактерии *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, полученные результаты открывают потенциальную возможность применения пробиотических лактобацилл в растениеводстве в виде бактериальных препаратов.

Цель работы – выяснение влияния *L. plantarum* 8P-A3 как источника NO на особенности протекания окислительного стресса в растениях пшеницы при обезвоживании.

МЕТОДИКА

Растения яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Дебют выращивали при $23 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенности 10 клюкс и 12-часовом фотопериоде в течение 7 сут в кюветах на водопроводной воде. Для



Изменение содержания пероксида водорода (а), малонового диальдегида (б), уровня интегральной антиоксидантной емкости (в) и активности каталазы (г) в листьях яровой пшеницы под влиянием обезвоживания. I – растения, в которых был индуцирован стресс обезвоживания (3 ч, 26–28°C), 2 – контрольные растения, не подверженные стрессу обезвоживания. I – корни растений предварительно выдерживали 2 ч в дистиллированной воде; II – то же в суспензии бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 плотностью 10^9 кл./мл в 0.9%-ном растворе NaCl, III – то же в суспензии бактерий, в которых синтез NO был активирован L-аргинином.

обработки растений в качестве донора NO использовали бактерии *L. plantarum* 8P-A3, выделенные из препарата “Лактобактерин сухой” (ФГУП “Пермское НПО “Биомед”). Бактерии выращивали в пробирках объемом 50 мл, содержащих 30 мл среды DeMan-Rogosa-Sharp (MRS), в течение 24 ч. Для активации биосинтеза NO в среду культивирования лактобацилл добавляли 100 мкМ L-аргинин. По истечении времени инкубации клетки осаждали центрифугированием, трижды отмывали от питательной среды 0.9%-ным раствором NaCl и ресуспендировали в том же растворе до конечной плотности 10^9 кл./мл [11]. Корни проростков помещали на 2 ч в суспензию лактобацилл или в дистиллированную воду. Для индукции стресса обезвоживания отсеченные листья пшеницы подсушивали в световой камере “Биотрон-3” (Россия) при $t = 26–28^\circ\text{C}$ и постоянном освещении 10 клюкс в течение 3 ч. Навеску листьев 0.2 г растирали со средой для гомогенизации, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7.8, 1 мМ аскорбата, 1 мМ ЭДТА, 10%-ный сорбит. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 13000 об/мин и 5°C . Интегральную антиоксидантную емкость (АОЕ) супернатанта (далее растительного экстракта) определяли методом кулонометрического титрования электрогенериро-

ванным бромом [12]. Активность каталазы в супернатанте оценивали по снижению поглощения при 240 нм, вызванному разложением H_2O_2 , и выражали в мкмоль восстановленного H_2O_2 ($\varepsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) за 1 мин на мг белка. В качестве индикаторов окислительного стресса использовали H_2O_2 и стабильный продукт перекисного окисления липидов малоновый диальдегид (МДА). Количество МДА в растительных тканях определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой и рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции $\varepsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, выражая в мкмоль/г сырой массы [13]. Содержание H_2O_2 в листьях определяли с помощью красителя Xylenol Orange (“Sigma”, США) и выражали в мкмоль/г сырой массы [14]. Статистическую обработку результатов проводили в программе “Microsoft Excel”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе предпринята попытка предотвратить развитие окислительного стресса в проростках пшеницы при обезвоживании, воздействуя на их корни суспензией бактерий *L. plantarum* 8P-A3. Лактобациллы этого вида наиболее часто обнаруживаются на растениях [15], однако их значение для макросимбионта неизвестно. Ра-

нее нами было показано, что данные микроорганизмы способны образовывать NO, причем при добавлении субстрата NO-синтазы аминокислоты L-аргинина, в соответствии с “парадоксом L-аргинина”, продукция NO увеличивалась более чем в 2 раза [11]. Результаты данной работы впервые показали, что, аналогично NO растительных клеток, оксид азота бактериального происхождения оказывает стресс-лимитирующее действие на растения, в связи с чем его продуценты – лактобактерии *L. plantarum* 8P-A3 можно рассматривать как перспективный бактериальный препарат для сельского хозяйства.

Инокуляция проростков пшеницы суспензией лактобацилл не влияла на содержание в них H₂O₂ и МДА, а также на активность каталазы, но приводила к снижению интегральной АОЕ на 21–25% по сравнению с растениями, не обработанными бактериями (рисунок, а–г, I). Наши данные согласуются с недавно опубликованными результатами, демонстрирующими снижение активности антиоксидантных ферментов у кукурузы [16] и ячменя [17] после обработки микроорганизмами группы PGPR. По-видимому, данный эффект можно считать универсальным для растений, которые вследствие инокуляции PGPR менее подвержены действию стресс-факторов и, соответственно, системы антиоксидантной защиты в них не индуцированы, в отличие от необработанных бактериями растений.

Обезвоживание приводило к увеличению содержания H₂O₂ и МДА (рисунок а, б, I) в клетках необработанных бактериями растений, что отражает естественный процесс развития окислительного стресса в растениях при засухе [3]. АОЕ растительных экстрактов при этом закономерно снижалась, а активность каталазы существенно не изменялась (рисунок в, г, I). Мы впервые показали, что обработка таких растений лактобациллами снимала окислительный стресс: уровень H₂O₂ и МДА в обработанных лактобациллами и подверженных высушиванию проростках не отличался от такового в интактных, не подвергшихся высушиванию растениях (рисунок а, б, II, III). Выявленный эффект подтверждает концепцию “эффективных микроорганизмов”, разработанную Т. Хига и постулирующую положительную роль молочнокислых бактерий для растений [18]. Лактобациллы эффективны против биотических стрессоров благодаря своей высокой антагонистической активности в отношении растительных патогенов [19]. Участие активных метаболитов лактобацилл в реакции растений на окислительный стресс показано нами впервые. Одним из факторов стресс-лимитирующей активности лактобацилл определенно является NO, который снижал уровень опасных последствий обезвоживания, что зарегистрировано нами по увеличе-

нию суммарной АОЕ (рисунок в) и активности каталазы (рисунок г). Важно отметить, что в растениях, подвергшихся обработке суспензией лактобацилл с базальным уровнем биосинтеза NO, при обезвоживании активность каталазы и уровень АОЕ не отличались от таковых контрольных растений, не подвергшихся высушиванию (рисунок в, г, II). Напротив, в проростках пшеницы, прединкубированных в суспензии лактобацилл с повышенным синтезом NO, величина этих параметров была значительно повышена (рисунок в, г, III), что можно объяснить известным механизмом активации оксидом азота синтеза ферментов антиоксидантной защиты [2, 4].

Таким образом, в настоящее время накоплено достаточное количество свидетельств стресс-лимитирующего действия NO в живых организмах разного уровня организации: бактериях [20–22], растениях [1, 2, 4, 5, 23], животных и человеке [24]. Выявленное нами участие бактериального оксида азота в ответе растений на стресс по типу обезвоживания указывает на универсальность механизмов стресс-ответа всех живых клеток и ключевую роль в них оксида азота.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (12-04-01226а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Qiao W., Fan L.M. // J. Integr. Plant Biol. 2008. V. 50. № 10. P. 1238–1246.
2. Siddiqui M.H., Al-Wahaibi M.H., Basalah M.O. // Protoplasma. 2011. V. 248. № 3. P. 447–455.
3. Miller G., Susuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. // Plant Cell Environ. 2010. V. 33. P. 453–467.
4. Fan Q.-J., Liu J.-H. // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 145–154.
5. Garcia-Mata C., Lamattina L. // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 1196–1204.
6. Bianco C., Defez R. // Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations / Eds. A. Shanker, B. Venkateswarlu. N.Y.: InTech, 2011. Chapter 7. P. 143–170.
7. Timmusk S., Wagner E.G.H. // Mol. Plant-Microbe Interact. 1999. V. 12. № 11. P. 951–959.
8. Baca B.E., Elmerich C. Microbial Production of Plant Hormones / Eds. C. Elmerich, W.E. Newton. Dordrecht: Springer, 2007. Chapter 6. P. 113–143.
9. Creus C.M., Graziano M., Casanovas E.M., Pereyra M.A., Simontacchi M., Puntarulo S., Barassi C.A., Lamattina L. // Planta. 2005. V. 221. № 2. P. 297–303.
10. Cohen M.F., Lamattina L., Yamasaki H. // Nitric Oxide in Plant Physiology / Eds. S. Hayat, M. Mori, J. Pichtel, A. Ahmad. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. Chapter 11. P. 161–172.
11. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 4. С. 570–572.
12. Ziyatdinova G.K., Budnikov H.C., Pogorel'tzev V.I., Ganeev T.S. // Talanta. 2006. V. 68. № 3. P. 800–805.

13. Heath R.L., Packer L. // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189–198.
14. Gay C., Gebicki J.M. // Anal. Biochem. 2000. V. 284. № 2. P. 217–220.
15. Mundt J.O., Hammer J.L. // Appl. Microbiol. 1968. V. 16. № 9. P. 1326–1330.
16. Sandhya V., Ali Sk.Z., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B. // Plant Growth Regul. 2010. V. 62. P. 21–30.
17. Omar M.N.A., Osman M.E.H., Kasim W.A., Abd El-Daim I.A. // Tasks for Vegetation Science. 2009. V. 44. P. 133–147.
18. Higa T. // EM World J. 2000. V. 1. P. 1–6.
19. Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Непрусов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3. С. 259–274.
20. Gusarov I., Nudler E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 39. P. 13855–13860.
21. Shatalin K., Gusarov I., Avetissova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 1009–1013.
22. Смоленцева О.А., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. № 1. С. 25–29.
23. Бояришинов А.В., Асафова Е.В. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 6. С. 891–897.
24. Мальшев И.Ю., Манухина Е.Б. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 992–1006.

Probiotics for Plants: NO-Producing Lactobacilli Protect Plants from Drought

D. R. Yarullina, E. V. Asafova, J. E. Kartunova, G. K. Ziyatdinova, and O. N. Il'inskaya

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

e-mail: kasfes@gmail.com

Received June 4, 2013

Abstract—After the inoculation of wheat roots with a suspension of the bacterium *Lactobacillus plantarum*, leveling of oxidative stress detected by the accumulation of H₂O₂ and MDA was found in leaves. Activation of catalase and increased integral antioxidant capacity in seedlings treated with NO-producing lactobacilli were detected during the determination of the contribution of bacterial NO to the plant stress reaction. Thus, for the first time, we have demonstrated that lactobacilli affect plant adaptive responses to stress by the involvement of nitric oxide.