

УДК 581.138.1

ВЛИЯНИЕ ПАРАКВАТА И ОКСИДА АЗОТА (NO) НА СИМБИОТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С КОРНЯМИ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

© 2007 г. **А. К. Глянько, Н. Б. Митанова, А. А. Ищенко,
Г. Г. Васильева, Л. Е. Макарова**

Сибирский институт физиологии и биохимии растений

Сибирского отделения Российской академии наук

(Иркутск, Россия)

В лабораторных опытах изучали влияние гербицида параквата (метилвиологена) и оксида азота (NO) на установление симбиотических взаимоотношений между клубеньковыми бактериями и корневыми волосками корней этиолированных проростков гороха. С помощью световой микроскопии установлено негативное влияние указанных соединений на длину корневых волосков и образование в них инфекционных нитей. Результаты обсуждаются в связи с влиянием на эти процессы активных форм кислорода и азота.

Ключевые слова: *Pisum sativum L., Rhizobium leguminosarum bv. viceae, паракват, оксид азота, симбиоз, корневые волоски*

Ризосфера - околокорневое почвенное пространство, которое изобилует различными веществами как биологического происхождения, так и вносимыми извне человеком, характеризуется высокой биологической активностью и повышенным содержанием в ней микроорганизмов, взаимодействующих с корневой поверхностью. Среди микроорганизмов особый интерес представляют микробы и грибная микориза, вступающие в симбиотические отношения с растениями. Наряду с полезными веществами, выделяемыми корнями растений, как, например, флавоноидами бобовых растений, необходимыми для экспрессии бактериальных *Nod*-генов, ответственных за бобоворизобиальный симбиоз, в ризосфере могут присутствовать вещества, оказывающие отрицательный эффект на симбиотическое взаимодействие организмов.

Из них следует отметить поллютанты антропогенного происхождения, например, такие как неселективный контактный гербицид паракват (метилвиологен) - чрезвычайно токсичное соединение для растений, микробов и живот-

ных организмов [9, 17]. Полагают, что токсический эффект параквата на растения и другие организмы связан с усилением образования в клетках активных форм кислорода (АФК) [11, 23]. В нашей работе [1] показано ингибирующее влияние параквата на рост этиолированных проростков гороха и увеличение содержания в тканях корней одного из АФК - пероксида водорода, который может оказывать негативное влияние на установление бобоворизобиального симбиоза [2]. С другой стороны, внесение в почву азотных удобрений усиливает активность почвенных денитрифицирующих и нитрифицирующих бактерий, в результате чего образуются газообразные соединения азота: оксид азота (NO) и закись азота (N₂O). По данным Scibe et al. [18], при внесении в почву (NH₄)₂SO₄ в дозе 100 кг N /га эмиссия NO из почвы увеличивалась с 2,4 до 46,9, а N₂O - с 0,95 до 7,4 нг/м²/с. Эти результаты свидетельствуют об интенсивном образовании NO и N₂O в почве при внесении азотных удобрений. Из газообразных N-соединений важное значение имеет NO, который является многофункциональной сигнальной молекулой, управляющей внутриклеточными и межклеточными процессами в растительных, животных и бактериальных клетках и оказывающей положительное или отрицательное влияние на жизнедеятель-

ность организмов [7, 14]. Результаты нашей работы показали, что NO отрицательно влияет на адгезию и проникновение клубеньковых бактерий в ткани корня, а также на рост проростков гороха [5]. Таким образом, паракват и оксид азота могут присутствовать в ризосфере и влиять на взаимодействие микроорганизмов и растений.

Цель настоящей работы - исследование с помощью световой микроскопии эффекта действия параквата и оксида азота на взаимодействие клубеньковых бактерий с корневыми волосками корней этиолированных проростков гороха для оценки влияния этих соединений на формирование бобово-ризобияльного симбиоза на начальных его этапах.

МЕТОДИКА

В исследовании использовали этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский усатый). Отобранные семена гороха перед опытом промывали теплой мыльной водой и затем поверхностно стерилизовали 3%-ным раствором пероксида водорода в течение 15 мин с последующим промыванием их дистиллированной водой. Подготовленные таким образом семена проращивали в течение двух сут на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, в пластмассовых кюветках при постоянной температуре 22°C в темноте. Для исследований отбирали проростки с длиной корня 2,4 – 3,0 см, которые помещали в кюветы на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой (контроль), растворами параквата в концентрациях 10^{-3} и 10^{-7} М (фирма "Serva", Германия) или нитропруссид натрия в концентрации 2 мМ (фирма "MP", США), являющегося донором NO. В отдельных опытах использовали также гемоглобин из эритроцитов лошади (фирма "MP", США). Одновременно с воздействием на проростки указанных веществ проводили инокуляцию проростков суспензией клеток эффективного производственного штамма клубеньковых бактерий (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм CIAM 1026) в концентрации 2×10^8 кл. / мл (объем суспензии 1 мл / корень). Штамм клубеньковых бактерий получен из ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург).

После инокуляции и воздействия различными соединениями проростки выдерживали в термостате при постоянной температуре 22°C в темноте в течение двух сут. Контролем служили одновозрастные инокулированные проростки, растущие на воде. Микроскопический ана-

лиз проводили через 1 сут после инокуляции. Использовали целые корни, окрашенные витальным красителем крезоловым голубым (фирма "Merck", Германия) для контрастирования корневых клеток [4]. Изменения у корневых волосков, вызываемые действием испытуемых соединений, наблюдали под световым микроскопом ("Peraval Interphako", "Carl Zeiss", Jena). Снимки получали с помощью цифрового фотоаппарата "Sony" (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что начальные этапы взаимодействия клубеньковых бактерий с корнями бобового растения характеризуются искривлением корневых волосков и образованием в них инфекционных нитей. В местах искривления корневых волосков происходит "размягчение" клеточной стенки, проникновение ризобий через корневые волоски в ткани и их дальнейшее передвижение внутри по образовавшейся инфекционной нити к клеткам коры. Эти два морфо-анатомических ответа растения на ризобияльную инфекцию мы попытались оценить с помощью световой микроскопии в зависимости от присутствия в среде испытуемых соединений.

В контрольном варианте (без добавления изучаемых соединений) корневые волоски были длинными (300 - 430 мкм), с хорошо выраженными искривлениями и инфекционными нитями (рис. 1а). Добавление в среду нитропруссид натрия в концентрации 2 мМ вело к образованию коротких (до 90 мкм) корневых волосков, с булавовидными утолщениями на конце (рис. 1б). При этом искривление корневых волосков было выражено слабо, инфекционные нити встречались намного реже, чем в контрольном варианте. Это свидетельствовало о нарушении процесса взаимодействия симбионтов под влиянием нитропруссид натрия, являющегося донором NO.

Для того, чтобы убедиться, что именно оксид азота (NO) оказывал отрицательный эффект на взаимодействие симбионтов был использован гемоглобин из эритроцитов лошади. Известно, что гемоглобин связывает свободный NO с образованием нитрозилгемоглобина [10]. Опыты показали, что добавление в среду с нитропруссидом натрия гемоглобина в концентрации 2 мкМ способствовало более выраженному искривлению корневых волосков, увеличению их длины (до 120-490 мкм) и длины находящихся в них инфекционных нитей (рис. 1, в). Это свидетельствовало о частичном снятии Ге

ВЛИЯНИЕ ПАРАКВАТА И ОКСИДА АЗОТА

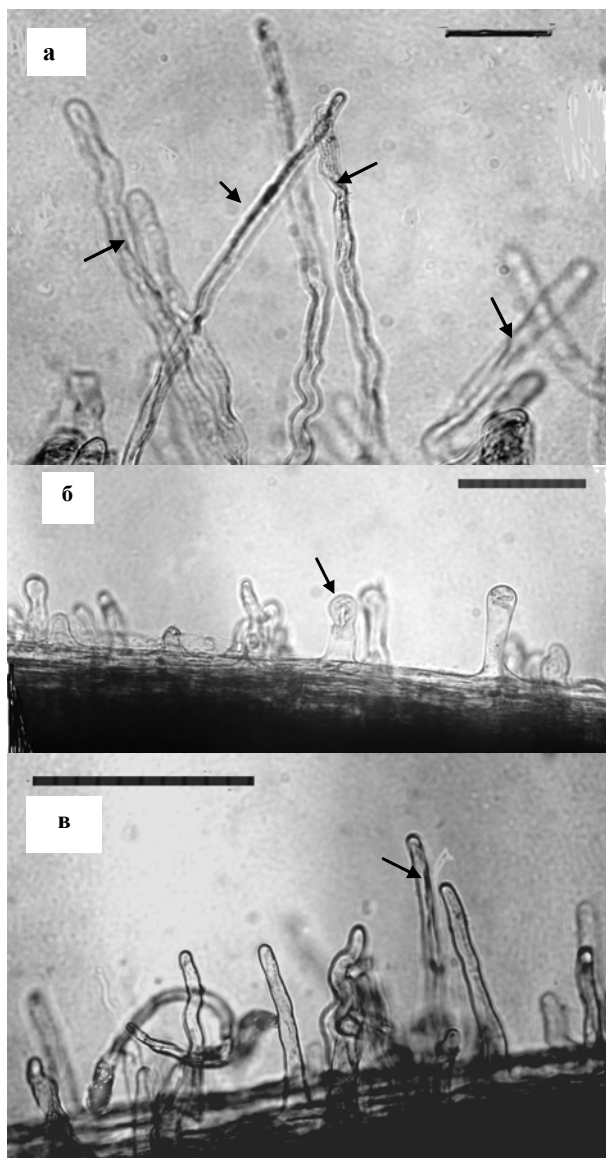


Рис. 1. Реакция корневых волосков корней проростков гороха через 24 ч после инокуляции *Rhizobium leguminosarum* при выращивании на воде (а), на растворах нитропруссид натрия (2 мМ) (б) и нитропруссид натрия (2 мМ) + гемоглобин (2 мкМ) (в).

*Снимки получены на расстоянии 25 (а), 21 (б) и 35 (в) мм от кончика корня. Длина корней составляла 55, 52 и 70 мм соответственно.

Стрелками указаны инфекционные нити внутри корневых волосков. Отрезки прямых линий в углах снимков соответствуют 100 мкм.

моглобином токсического действия нитропруссид натрия на взаимодействие симбионтов.

В опытах с влиянием параквата на начальные этапы взаимодействия симбионтов испытывали две концентрации гербицида: 10^{-3} М и 10^{-7} М. При обеих концентрациях параквата существенно уменьшалась длина корневых во-

локов, изменялась их форма (булавовидные утолщения на концах), отсутствовали искривления волосков, инфекционные нити в них не образовывались (рис. 2, а и 2, б). Таким образом, паракват, как и оксид азота, оказал отрицательное влияние на начальные этапы взаимодействия симбионтов.

Обсуждая полученные результаты, следует остановиться на возможных физиолого-биохимических причинах токсического действия параквата и оксида азота на клубеньковые бактерии и проростки гороха, что приводит к нарушению взаимодействия симбионтов. Известно, что паракват в незеленых органах растений действует на редокс-систему митохондрий и микросом, активируя образование АФК [19, 23]. Такой же механизм, по-видимому, наблюдается и при действии параквата на клубеньковые бактерии. Накопление АФК в количествах, не соответствующих потенциальным возможностям антиоксидантной системы ризобий и растения-хозяина, ведет к деградиационным процессам у организмов, что блокирует начальные этапы взаимодействия симбионтов.

Как уже было отмечено, оксид азота является сигнальной молекулой и может оказывать, как положительное, так и отрицательное влияние на жизнедеятельность организмов. Эта молекула является нормальным продуктом обмена веществ и образуется у животных организмов из аргинина в реакции, катализируемой синтазой оксида азота [6]. У растительных и бактериальных организмов NO может продуцироваться при редукции нитратов с участием нитрат- и нитритредуктаз [11, 25]. По данным Stohr [20] у табака при высокой концентрации нитратов в среде повышается активность нитратредуктазы, связанной с мембранами клеток. В то же время активность цитозольной нитратредуктазы в этих условиях не изменяется. Stohr et al. [21] показали усиление ферментативного образования NO из нитритов в мембранах клеток корня табака.

Доказано участие NO во многих жизненных процессах у животных организмов [6]. В растениях выяснена роль NO в процессах роста и развития, при действии абиотических и биотических факторов, особенно при патогенезе [3, 14, 22]. Окислительный стресс, сопровождаемый аккумуляцией АФК, вызывает также накопление NO [22], а взаимодействие этой молекулы с кислородными радикалами, например с O_2^- , ведет к образованию пероксинитрита - более токсичного азотного радикала [16].

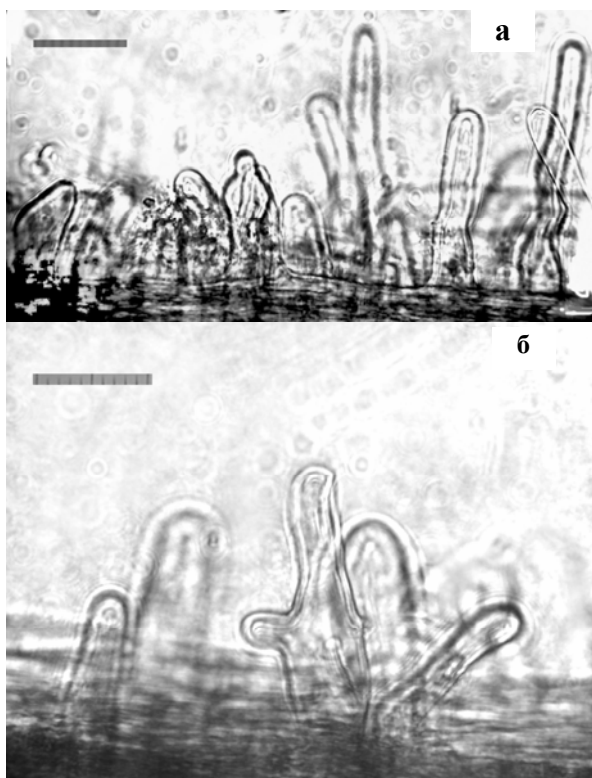


Рис. 2. Реакция корневых волосков корней проростков гороха через 24 ч после инокуляции *Rhizobium leguminosarum* при выращивании на растворах параквата: а - концентрация 10^{-3} М, б - концентрация 10^{-7} М.

*Снимки получены на расстоянии 19 (а) и 37 (б) мм от кончика корня. Длина корней составляла 43 и 50 мм соответственно. Отрезки прямых линий в углах снимков соответствуют 100 мкм.

Высокие концентрации NO могут оказывать отрицательное действие на микроорганизмы и наносить вред растительной клетке. Среди негативных эффектов оксида азота - перекисное окисление липидов, окисление тирозина и S-нитрозилирование. Взаимодействие NO с железосодержащими белками ведет к ингибированию ферментов, таких, например, как цитохром с оксидаза в митохондриальной дыхательной цепи [26]. Избыток NO в клетках может устраняться путем связывания его различными соединениями. Из них следует отметить ураты, связывающие пероксинитрит [8]. Важную роль в детоксикации NO в растительных клетках играет несимбиотический гемоглобин [10, 15, 24], что дает возможность говорить о положительной роли гемоглобинов в симбиотической и микоризной инфекции, когда связывание NO гемоглобином ведет к уменьшению экспрессии генов защиты под влиянием оксида азота и благоприятствует развитию симбиоза.

Таким образом, паракват (в концентрациях 10^{-3} и 10^{-7} М) и нитропруссид натрия в концентрации 2 мМ (эквивалентно 4,5 мкМ NO [12]) оказали отрицательное влияние на начальные этапы взаимодействия клубеньковых бактерий с корневыми волосками корней гороха. Это проявилось в существенном укорочении длины корневых волосков, изменении их формы, уменьшении искривлений волосков и количества инфекционных нитей в них. Возможными причинами отрицательного влияния указанных соединений на симбиоз является образование активных форм кислорода и азота. Эти соединения могут действовать на симбиотические организмы как в ризосфере, так и в клетках растения-хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ищенко А.А., Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Глянько А.К. Влияние гербицида параквата на рост, содержание пероксида водорода и активность каталазы в корнях проростков гороха при инокуляции клубеньковыми бактериями // Агрехимия. - 2006. - № 8. - С. 47-51.
2. Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Лузова Г.Б., Глянько А.К. Влияние инокуляции азотфиксирующими бактериями разной эффективности и совместимости на содержание перекиси водорода и активность каталазы в проростках гороха // Там же. - 2004. - № 6. - С. 68-73.
3. Дмитриев А.П. Сигнальная роль оксида азота у растений // Цитология и генетика. - 2004. - Т. 38, № 4. - С. 67-75.
4. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. Влияние температуры на локализацию "свободных" фенольных соединений в тканях корней и деформацию корневых волосков у инокулированных *Rhizobium* проростков гороха // Цитология. - 2005. - Т. 47, № 6. - С. 519-525.
5. Митанова Н.Б., Глянько А.К., Васильева Г.Г. Влияние азотных соединений на адгезию и проникновение клубеньковых бактерий в ткани корней и рост этиолированных проростков гороха // Агрехимия. - 2006. - № 10. - С. 52-55.
6. Проскуряков С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Биология окиси азота // Успехи соврем. биологии. - 1999. - Т. 119, № 4. - С. 380-395.
7. Реутов В.Н., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине // Там же. - 2005. - Т. 125, № 1. - С. 41-65.
8. Alamillo J.M., Garcia-Olmedo F. Effects of urate, a natural inhibitor of peroxy-nitrite - mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the

ВЛИЯНИЕ ПАРАКВАТА И ОКСИДА АЗОТА

- bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* // Plant J. - 2001. - V. 25, N 5, - P.529-540.
9. Babbs C.F., Pham J.A., Coolbanch R.S. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants // Plant Physiol. - 1989. - V. 90, N 4. - P. 1267-1270.
 10. Dordas C., Rivoal J., Hill R.D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxia stress // Ann. Bot. - 2003. - V. 91, N 2. - P. 173-178.
 11. Fujii T., Yokoyama E., Inoue K., Sakurai H. The sites of electron donation of photosystem I to methylviologen // Biochem. Biophys. Acta. -1990. - V. 1015, N 1. - P. 41-48.
 12. Murphy M.E., Noack E. Nitric oxide assay using hemoglobin method // Methods Enzymol. - 1994. - V. 233. - P. 240-250.
 13. Modolo L.V., Augusto O., Almeida I.M.G. et al. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae* // FEBS Lett. - 2005. - V. 579, N 17. - P. 3814-3820.
 14. Neil S.J., Desikan R., Hancock J.T. Nitric oxide signalling in plants // New Phytol. - 2003. -V. 159, No 1. - P. 11-35.
 15. Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M.C et al. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin *AHb1* modulates nitric oxide bioactivity // Plant Cell. - 2004. - V. 16, N 10. - P. 2785-2794.
 16. Romero N., Denicola A., Radi R. Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite // IUBMB Life. - 2006. - V. 58, N 10. - P. 572-580.
 17. Sata T., Takeshige K., Takayanagi R., Minakami S. Lipid peroxidation by bovine heart submitochondrial particles stimulated by 1,1'- dimethylbipyridy (paraquat) // Biochem. Pharmacol. - 1983. - V. 32, N 1. - P. 13-19.
 18. Scibe U., Smith K.A., Fowler D. Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil // Soil Biol. Biochem. - 1993. - V. 25, N 11. - P. 1527-1536.
 19. Stejner D., Popovic M., Stejner M. Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves // Biol. Plant. - 2003. - V. 47, N 4. - P.575-579.
 20. Stohr S. Relationship of nitrate supply with growth rate plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase, and tissue nitrate content in tobacco plants // Plant Cell Environ. - 1999. -V. 22, N 2. - P. 169-177.
 21. Stohr C., Strube F., Marx G., Ulrich W.P., Rockel P. A plasma-membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyzes the formation of nitric oxide from nitrite // Planta. - 2001. -V. 212, N 5-6. - P. 835-841.
 22. Stohr C., Stremlau S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots // J. Exp. Bot. - 2006. - V. 57, N 3. - P. 463-470.
 23. Vicente J.A.F., Peixoto F., Lopes M.L., Madeira V.M.C. Differential sensitivities of plant and animal mitochondria to the herbicide paraquat // J. Biochem. Mol. Toxicol. - 2001. -V. 15, N 6. - P. 322-330.
 24. Vieweg M.F., Hohnjec N., Kuster H. Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula* // Planta. - 2005. - V. 220, N 5. - P. 757-766.
 25. Yamasaki H., Sakihama Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species // FEBS Lett. - 2000. - V. 468, N 1. - P. 89-92.
 26. Yamasaki H., Shimoji H., Ohshiro Y., Sakihama Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria // Nitric Oxide. - 2001. -V. 5, N 2. - P. 261-270.

Поступила в редакцию
27.06.2007 г.

INFLUENCE HERBICIDE PARAQUAT AND NITRIC OXIDE (NO) ON SYMBIOTIC INTERACTION NODULE BACTERIA WITH ROOTS OF PEA SEEDLINGS

A. K. Glyan'ko, N. B. Mitanova, A. A. Ischenko, G. G. Vasil'eva and L. E. Makarova

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry,
Siberian Division, Russian Academy of Sciences
(Irkutsk, Russia)*

In laboratory experiences studied influence of herbicide paraquat and nitric oxide (NO) on the establishment of symbiotic mutual relations between nodule bacteria and hairs roots of etiolated pea seedlings. With the light microscopy negative influence of the indicated compounds on the initial stages

symbiotic interactions is established. It was showed in reduction of length root hairs, change of their morphological form, reduction of curvatures hairs and amounts of infection threads in them. Results are discussed in connection with influence on these processes of reactive oxygen and nitrogen species.

Key words: *Pisum sativum L., Rhizobium leguminosarum bv. viceae, paraquat, nitric oxide, symbiosis, root hairs*

ВПЛИВ ПАРАКВАТУ І ОКСИДУ АЗОТУ (NO) НА СИМБІОТИЧНУ ВЗАЄМОДІЮ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ З КОРЕНЯМИ ПРОРОСТКІВ ГОРОХУ

А. К. Глянько, Н. Б. Мітанова, А. А. Іщенко, Г. Г. Васильєва, Л. Є. Макарова

*Сибірський інститут фізіології і біохімії рослин
Сибірського відділення Російської академії наук
(Іркутськ, Росія)*

У лабораторних дослідах вивчали вплив гербіциду параквату (метилвіологену) і оксиду азоту (NO) на встановлення симбіотичних взаємовідносин між бульбочковими бактеріями і кореневими волосками коренів етіолованих проростків гороху. За допомогою світлової мікроскопії встановлений негативний вплив вказаних сполук на довжину корневих волосків і утворення в них інфекційних ниток. Результати обговорюються у зв'язку з впливом на ці процеси активних форм кисню й азоту.

Ключові слова: *Pisum sativum L., Rhizobium leguminosarum bv. viceae паракват, оксид азоту, симбіоз, кореневі волоски*