

ЦИТОКИНИНОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СУММАРНОЙ ФРАКЦИИ ПЕПТИДОВ ПШЕНИЦ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Н. В. Терлецкая, Л. К. Мамонов, Ф. А. Полимбетова, А. Б. Рысбекова,
А. Ж. Бейсенова, М. Камунур

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы

Поступила в редакцию 01.08.2011 г.

Аннотация. Установлено наличие цитокининоподобной активности у суммарных препаратов пептидов, выделенных из листьев и из корней различных видов рода *Triticum*. Отмечена дозозависимость активности, характерная для веществ с гормоноподобными свойствами. Выявлена тенденция превышения в стрессовых условиях цитокининоподобной активности экстрактов пептидов тетраплоидных видов пшениц по сравнению с гексаплоидными. Наиболее высокой цитокининоподобной активностью при осмотическом стрессе характеризовались суммарные препараты пептидов засухоустойчивого вида *T. aethiopicum* Jakubz. Отмечено, что возрастание относительной цитокининоподобной активности пептидов в условиях солевого стресса имело отрицательную зависимость от их солеустойчивости.

Ключевые слова: пшеница, осмотический стресс, солевой стресс, пептиды цитокининоподобная активность.

Abstract. Revealed the presence of the similar to cytokinin activity in preparations of total peptides isolated from the leaves and from the roots of various species of genus *Triticum*. Marked dose response of activity characteristic of hormone-like substances with properties. The tendency of the excess in a stressful environment the similar to cytokinin activity extracts of peptides tetraploid wheat species than hexaploid. The highest the similar to cytokinin activity in osmotic stress were characterized by the total drought-resistant species products of peptides by drought-resistant species *T. aethiopicum* Jakubz. It is noted that the increase in the relative the similar to cytokinin activity of peptides under salt stress had a negative dependence on their salt tolerance.

Keywords: wheat, osmotic stress, salt stress, peptides, similar to cytokinin activity.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение совокупности адаптивных процессов, развивающихся в растении в ответ на повреждающие стрессовые воздействия, позволяет выделить общие неспецифические физиолого-биохимические защитные реакции, к числу которых можно отнести изменения в балансе гормонов и гормоноподобных веществ, способствующие переключению функциональной активности клеток на так называемые стрессовые подпрограммы [1, 2].

Гормоны и гормоноподобные вещества, к которым можно отнести и пептиды, способны в крайне низких концентрациях с высокой эффективностью регулировать активность метаболических процессов, индуцируя при этом устойчивость растительных организмов к широкому спектру стрессовых воздействий [3—5]. При этом цитокинины и многие другие соединения вторичного метаболизма, обладающие цитокининоподобной активностью,

оказывают влияние на деление клеток, их рост растяжением и процесс дифференциации, действуя на мембранный аппарат клеток, активно участвуют в разворачивании ранних стрессовых реакций [2, 6].

Однако, вопрос изменения гормоноподобной активности пептидов в условиях таких абиотических стрессов, как засуха и засоление, остается открытым, хотя он, безусловно, представляет научный интерес.

Поэтому целью данной работы было изучение изменения цитокининоподобной активности суммарной фракции пептидов при осмотическом и солевом стрессах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для исследований служили виды пшениц: *T. polonicum* L. (AⁿAⁿBB), *T. aethiopicum* Jakubz. (AⁿAⁿBB), *T. macha* L. (AⁿAⁿBB), *T. compactum* L. (AⁿAⁿBBDD), *T. aestivum* L. (AⁿAⁿBBDD) (сорт Саратовская-29).

При создании стрессовых условий за основу были взяты апробированные методики исследова-

© Терлецкая Н. В., Мамонов Л. К., Полимбетова Ф. А., Рысбекова А. Б., Бейсенова А. Ж., Камунур М., 2012

ний устойчивости растений к засолению и засухе [7]. Проростки 7 суток выращивали в водной культуре, затем в течение 72 часов подвергали действию стресса. Солевой стресс создавали, экспонируя проростки в растворе 1,68 % NaCl, а искусственную засуху — в растворе 16,7 % сахарозы. Эти концентрации наглядно дифференцируют образцы по росту и накоплению биомассы, снижение которых у менее устойчивых сортов доходит до 50 %. Контролем служили проростки, выращиваемые на воде.

Выделение суммарных препаратов пептидов проводилось из гомогенизированной сырой массы корней и из гомогенизированной сырой массы листьев растений [8]. Средой для выделения служила охлажденная до 2°C смесь 96 % этилового спирта с 0,5 % раствором уксусной кислоты в соотношении 7:2. Полученный гомогенат отжимался, фильтровался и охлаждался. Осадок белка отделялся центрифугированием при 10000g в течение 15 минут, а надосадочная жидкость, содержащая сумму пептидов, пропускалась через колонку с капроновым порошком и выпаривалась на ротонном испарителе марки Lobsonco при температуре 40—45 °C. Количество пептидов определялось по методу Лоури [9]. Цитокининоподобная активность

пептидов определялась на семядолях редиса [10].

Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам [11, 12]. Значками *, *** в таблицах отмечена достоверность различий по отношению к контролю при 0,05 и 0,001 уровнях значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование суммарных фракций препаратов пептидов выявило, что все изучаемые препараты обладали цитокининоподобной активностью во всех вариантах опыта у всех изучаемых форм пшеницы.

На пресном фоне цитокининоподобная активность пептидов, выделенных из листьев, как правило, была выше таковой у фракций, полученных из корней (табл. 1).

В условиях осмотического стресса цитокининоподобная активность суммарной фракции пептидов у изучаемых форм пшениц изменялась. Так, у всех форм, кроме *T. polonicum* и *T. macha* наблюдалась тенденция к ее снижению. У *T. polonicum* и *T. macha* цитокининоподобная активность пептидов, выделенных из листьев, при минимальной концентрации несколько повышалась с последующим снижением при увеличении концентрации

Таблица 1

Цитокининоподобная активность пептидов, выделенных в отсутствие стресса, в системе биотеста (по приросту биомассы семядолей редиса, мг.)

Геномный состав	Вид	Концентрации раствора пептидов		
		0,0001 %	0,001 %	0,01 %
суммарный экстракт пептидов из листьев				
A ^a A ^a BB	<i>T. polonicum</i>	8,3 ± 0,8	7,7 ± 1,6	7,1 ± 0,4
A ^a A ^a BB	<i>T. aethiopicum</i>	10,3 ± 0,5	9,6 ± 0,8	9,0 ± 0,4
A ^a A ^a BB	<i>T. macha</i>	11,8 ± 0,5	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,2
A ^a A ^a BBDD	<i>T. compactum</i>	8,9 ± 0,7	8,5 ± 0,3	8,2 ± 1,0
A ^a A ^a BBDD	<i>T. aestivum</i>	9,6 ± 0,5	7,7 ± 0,1	7,4 ± 0,8
суммарный экстракт пептидов из корней				
A ^a A ^a BB	<i>T. polonicum</i>	5,1 ± 1,4	4,2 ± 0,1	4,1 ± 0,6
A ^a A ^a BB	<i>T. aethiopicum</i>	7,2 ± 0,4	6,9 ± 0,6	5,5 ± 0,4
A ^a A ^a BB	<i>T. macha</i>	6,3 ± 1,5	5,4 ± 1,2	3,9 ± 0,1
A ^a A ^a BBDD	<i>T. compactum</i>	6,4 ± 1,9	4,8 ± 0,3	4,7 ± 0,7
A ^a A ^a BBDD	<i>T. aestivum</i>	5,8 ± 1,6	4,3 ± 0,2	2,7 ± 0,8

Цитокининоподобная активность пептидов, выделенных в условиях осмотического стресса, в системе биотеста (по приросту биомассы семян редиса, мг)

Геномный состав	Вид	Концентрации раствора пептидов					
		0,0001 %		0,001 %		0,01 %	
		мг	% к контр	мг	% к контр	мг	% к контр
суммарный экстракт пептидов из листьев							
A ^a A ^a BB	<i>T. polonicum</i>	10,3 ± 0,5	124,1	6,7 ± 0,6	87,0	5,3 ± 0,9	74,7
A ^a A ^a BB	<i>T. aethiopicum</i>	10,1 ± 0,1	98,1	6,6 ± 0,5*	68,8	6,5 ± 0,4*	72,2
A ^a A ^a BB	<i>T. macha</i>	12,1 ± 1,5	102,5	6,9 ± 0,8	116,9	6,6 ± 0,8	115,8
A ^a A ^a BBDD	<i>T. compactum</i>	8,8 ± 0,9	98,9	7,4 ± 0,2	87,1	6,3 ± 0,5	76,9
A ^a A ^a BBDD	<i>T. aestivum</i>	7,3 ± 0,8	76,0	6,9 ± 0,9	89,6	6,8 ± 0,8	91,9
суммарный экстракт пептидов из корней							
A ^a A ^a BB	<i>T. polonicum</i>	4,1 ± 0,1	80,4	3,7 ± 0,1	88,1	3,6 ± 0,1	87,8
A ^a A ^a BB	<i>T. aethiopicum</i>	13,4 ± 0,4***	186,1	9,6 ± 0,7*	139,1	6,4 ± 0,8*	116,4
A ^a A ^a BB	<i>T. macha</i>	6,3 ± 0,5	100,0	5,0 ± 1,0	92,6	3,4 ± 0,8	87,2
A ^a A ^a BBDD	<i>T. compactum</i>	5,3 ± 0,9	82,8	4,3 ± 0,7	89,6	3,7 ± 0,5	78,7
A ^a A ^a BBDD	<i>T. aestivum</i>	4,5 ± 0,2	77,6	4,0 ± 0,3	93,0	2,5 ± 0,5	92,6

суммарной фракции у *T. polonicum* и возрастом активности при более высоких концентрациях — у *T. macha*. В корнях же существенное увеличение цитокининоподобной активности пептидов наблюдалось только у вида *T. aethiopicum*, но — при всех изучаемых концентрациях (см. табл. 2).

Солевой стресс практически не оказывал воздействия на цитокининоподобную активность суммарной фракции пептидов, выделенных из корней изучаемых форм пшениц во всех экспериментальных концентрациях, лишь при минимальной концентрации наблюдалось некоторое снижение данного показателя у видов *T. macha* и *T. compactum*, и при повышении концентрации — у *T. polonicum*. У *T. aestivum* максимальная цитокининоподобная активность пептидов корневой системы достигалась при их максимальной концентрации (см. табл. 3).

Однако, в соответствии с данными табл. 3, изменялась активность пептидов, выделенных из листьев изучаемых форм, выращенных при солевом стрессе. У *T. aethiopicum* она существенно снижалась относительно контроля во всех эксперимен-

тальных концентрациях. У *T. macha* и *T. aestivum* — только при минимальной концентрации, причем у *T. macha* отмечено некоторое возрастание активности по отношению к контролю с увеличением концентрации суммарной фракции. А у *T. compactum* и у *T. polonicum* цитокининоподобная активность при стрессе, напротив, несколько возросла при минимальной концентрации, а снижалась по отношению к контролю лишь при увеличении концентрации раствора пептидов.

В целом же, в соответствии с данными таблиц, в эксперименте у изучаемых суммарных препаратов пептидов проявлялась дозозависимость, характерная для веществ с гормоноподобными свойствами с резким переходом от стимулирующей при малых концентрациях препаратов (0,0001 %) к ингибирующей активности при их увеличении (0,01 %), наблюдаемая практически у всех изучаемых форм пшениц.

Если рассмотреть изменение цитокининоподобной активности суммарной фракции пептидов, полученной в условиях осмотического стресса и засоления в концентрации 0,0001 %, наиболее су-

Цитокининоподобная активность пептидов, выделенных в условиях солевого стресса, в системе биотеста (по приросту биомассы семян редиса, мг)

Геномный состав	Вид	Концентрации раствора пептидов					
		0,0001 %		0,001 %		0,01 %	
		мг	% к контр	мг	% к контр	мг	% к контр
суммарный экстракт пептидов из листьев							
A ^a A ^a BB	<i>T. polonicum</i>	10,5±0,3*	126,5	7,0±0,2	90,9	6,4±1,0	90,1
A ^a A ^a BB	<i>T. aethiopicum</i>	7,2±0,7*	69,9	6,8±0,4*	70,8	6,1±0,9*	67,8
A ^a A ^a BB	<i>T. macha</i>	7,1±1,6*	60,1	6,6±0,6	111,9	6,2±0,3	108,8
A ^a A ^a BBDD	<i>T. compactum</i>	10,3±0,1	115,7	8,5±0,9	100,0	7,0±0,8	85,4
A ^a A ^a BBDD	<i>T. aestivum</i>	6,7±1,0*	69,8	6,6±0,5	85,7	6,2±1,6	83,8
суммарный экстракт пептидов из корней							
A ^a A ^a BB	<i>T. polonicum</i>	5,6±1,2	109,8	3,7±1,1	88,1	2,9±0,1	70,7
A ^a A ^a BB	<i>T. aethiopicum</i>	7,5±1,0	104,2	6,0±0,6	87,0	5,3±1,0	96,4
A ^a A ^a BB	<i>T. macha</i>	5,6±1,6	88,9	5,0±0,9	92,6	3,7±0,3	94,9
A ^a A ^a BBDD	<i>T. compactum</i>	5,0±1,4	78,1	4,9±0,2	102,1	3,8±0,1	80,9
A ^a A ^a BBDD	<i>T. aestivum</i>	5,3±0,8	91,4	4,2±0,3	97,7	4,0±0,8	148,2

щественно стимулирующей эту активность по отношению к активности пептидов, полученных без воздействия стресса, то нами отмечены некоторые закономерности.

Так, относительная цитокининоподобная активность суммарной фракции пептидов, выделенных из корней в условиях осмотического стресса, была несколько выше у тетраплоидных пшениц (*T. polonicum*, *T. aethiopicum*, *T. macha*), чем у гексаплоидных (*T. compactum*, *T. aestivum*), тогда как по активности суммарной фракции пептидов, выделенных из листьев, такой закономерности отмечено не было. Наибольшая относительная цитокининоподобная активность суммарной фракции пептидов корневой системы при осмотическом стрессе характерна для засухоустойчивого вида *T. aethiopicum*.

В условиях солевого стресса относительная цитокининоподобная активность суммарной фракции пептидов, выделенных из корней тетраплоидных пшениц (*T. polonicum*, *T. aethiopicum*, *T. macha*), также в целом превышала относительную активность пептидов, выделенных из корней гексаплоидных форм (*T. compactum*, *T. aestivum*), при этом наблюдаемая при минимальной концентрации от-

носительная цитокининоподобная активность суммарной фракции пептидов корневой системы была тем выше, чем менее солеустойчивой — по результатам более ранних исследований ростовых и цитогенетических параметров — была изучаемая форма [13, 14]. Так, проростки вида *T. aethiopicum* характеризовались меньшим линейным приростом как листа, так и корней в стрессовых условиях по сравнению с *T. aestivum* и *T. compactum* (лист — 59,4; 60,8; 80,9 % к контролю, корень — 54,9; 58,6; 62,1 % к контролю соответственно) [13]. По относительной активности пептидов, выделенных из листьев, такой зависимости нами выявлено не было, что может быть связано с проявлением влияния как осмотического, так и токсического действия солевого стресса прежде всего на корневую систему растений.

Кроме того, полученные данные по различиям цитокининоподобной активности при осмотическом и солевом стрессах могут свидетельствовать об изменении в составе фракций и отдельных пептидов в суммарных экстрактах [8], а еще — о различии проявлений механизмов стрессоустойчивости у разных видов пшениц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии у суммарных препаратов пептидов, выделенных из листьев и из корней различных видов пшениц, гормоноподобной, в данном случае — цитокининоподобной активности, которая четко проявляется при выращивании растений на пресном фоне. Отмечена дозозависимость, характерная для веществ с гормоноподобными свойствами с резким переходом от стимулирующей при малых концентрациях препаратов (0,0001 %) к ингибирующей активности при их увеличении (0,01 %), наблюдаемая практически у всех изучаемых форм пшениц.

Выявлены изменения цитокининоподобной активности пептидов в условиях осмотического и солевого стрессов. Показано, что суммарные препараты пептидов, выделенные из корней изучаемых видов пшениц в системах биотестов, в стрессовых условиях выявили повышенную цитокининоподобную активность по приросту биомассы семян редиса, мг (экстракт из листьев, осмотический стресс — 10,2—12,1 мг; солевой стресс — 7,1—10,5 мг; экстракт из корней, осмотический стресс — 4,1—13,4 мг; солевой стресс — 5,6—7,5 мг) у тетраплоидных видов пшениц — *T. polonicum*, *T. aethiopicum*, *T. tacha* — по сравнению с гексаплоидными — *T. compactum*, *T. aestivum* — 7,3—8,8; 6,7—10,3 и 4,5—5,3; 5,0—5,3 мг соответственно).

Наиболее высокой стимулирующей цитокининоподобной активностью при осмотическом стрессе характеризовались суммарные препараты пептидов корневой системы засухоустойчивого вида *T. aethiopicum* (186,1—139,1—116,4 % к контролю в зависимости от концентрации экстракта), что может свидетельствовать о важности цитокининов и цитокининоподобных веществ в защите от осмотического стресса.

При этом отмеченное в эксперименте возрастание цитокининоподобной активности пептидов корневой системы пшениц в условиях солевого стресса имело тенденцию отрицательной зависимости от солеустойчивости изучаемых видов, что подтверждает более сложные механизмы воздействия на растения солевого стресса, в котором помимо осмотической, значительную роль играет токсическая компонента.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения углубленных исследований в данном направлении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция / Ф. М. Шакирова. — Уфа: Гилем, 2001. — 160 с.
2. Мамонов Л. К. Физиологические свойства пептидов растений // В кн.: Состояние и перспективы физиологии растений в Казахстане. — Алматы: Срочная типография, 2009. — С. 38—66.
3. Kcripach V. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century / V. Kcripach, V. Zhabinskii, A. de Groot // Annals. Bot. — 2000 — V. 86, Issue 3. — P.441—447.
4. Yakovleva L. A. Cytokinin and cytokinin-binding sites in transgenic potato plants / L. A. Yakovleva, E. P. Cheredova, N. N. Karavaiko // Plant Growth Reg. — 1997 — V. 21, № 1. — P.71—73.
5. Пустовойтова Т. Н. Использование трансгенных растений для выяснения роли цитокининов в устойчивости к засухе / Т. Н. Пустовойтова, Т. В. Баврина, В. Н. Ложникова, Н. Е. Жданова // Докл. РАН. — 1997. — №354. — С.702—704.
6. Садовниченко Ю. А. Действие высокой температуры на динамику цитокининов и ростовые процессы пшеницы / Ю. А. Садовниченко // Материалы докладов VII Съезда Общества физиологов России «Физиология растений — фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международной научной школы «Инновация в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции» 4—10 июля 2011 г., ННГУ им. Н. И. Лобачевского, — Нижний Новгород, 2011. — С. 602—603.
7. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям: Методич. Руководство / Под ред. Г. В. Удовенко. — Л.: ВИР, 1988—268 с.
8. Клышев Л. К. Биохимические механизмы интоксикации растений при засолении среды / Л. К. Клышев [и др.]. — Алматы: Наука, 1979. — 170 с.
9. Строгонов Б. П. Проблемы солеустойчивости растений / Б. П. Строгонов [и др.]. — Ташкент: ФАН, 1989. — 184 с.
10. Lowry O. N. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. N. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951 — Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
11. Введение в фитохимические исследования и выявление биологической активности веществ растений / Под ред. Л. К. Мамонова и Р. А. Музычкиной. — Алматы: Школа XXI века, 2008. — 216 с.
12. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) — 5-е изд., доп. и перераб. / Б. А. Доспехов. — М.: Агропромиздат, 1985—351 с., ил.
13. Terletskaya N. Saline Stress Response of Plantlets of Common Wheat (*Triticum Aestivum*) and Its Wild Congeners / N. Terletskaya [et al.] // Journal of Agricultural Science and Technology. — 2011. — В1, №2 — P. 198—204.

14. Терлецкая Н. В. Влияние солевого стресса на клетки первичных корешков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и дикорастущих видов пшеницы / Н. В. Терлецкая, Н. А. Хайленко // Ботанические сады в современном мире: теоретические и прикладные исследования. Ма-

териалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 80-летию со дня рождения академика Л. Н. Андреева (5—7 июля 2011 г., Москва). — М.: Товарищество научных изданий КМК. — 2011 — С. 634—638.

Терлецкая Нина Владимировна — ведущий научный сотрудник, к.б.н., РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы; e-mail: teni02@mail.ru

Terletskaia Nina — leader scientist, PhD, Institute of Plant Biology, and Biotechnology Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan, Almaty; e-mail: teni02@mail.ru

Мамонов Леонид Кириллович — главный научный сотрудник, д.б.н., профессор, РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы; e-mail: gen_maleo@yahoo.com

Mamonov Leonid — chief scientist, Professor, Institute of Plant Biology, and Biotechnology Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan, Almaty; e-mail: gen_maleo@yahoo.com

Полимбетова Фатима Абулхаировна — главный научный сотрудник, д.б.н., профессор, академик НАН РК, РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы; e-mail: zamandas@mail.ru

Polimbetova Fatima A. — head scientist, Professor, Academician of the Kazakh Academy of Sciences, Institute of Plant Biology, and Biotechnology Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan, Almaty; e-mail: zamandas@mail.ru

Рысбекова Айман Бокеновна — к.б.н., научный сотрудник, РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы, Алматы; e-mail: aiman@mail.ru

Rysbekova Aiman — scientist, PhD, Institute of Plant Biology, and Biotechnology Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan, Almaty; e-mail: aiman@mail.ru

Бейсенова Айжан Жумагазыевна — научный сотрудник, РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы, Алматы; e-mail: aizhan.beisenova@mail.ru

Beisenova Aizhan — scientist, Institute of Plant Biology, and Biotechnology Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan. Almaty; e-mail: aizhan.beisenova@mail.ru

Камунур Мадияр — стажер-исследователь, РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, г. Алматы, Алматы; e-mail: kamu_madi@mail.ru

Kamunur Madiyar — trainee-researcher, Institute of Plant Biology and Biotechnology, Ministry of Education and Science Republic of Kazakhstan, Almaty; e-mail: kamu_madi@mail.ru