

УДК 581.1+57.04

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЛЕКТИНОВ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТЕВИОЗИДА И ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2018 г. А. Л. Михайлов¹, О. А. Тимофеева¹, Ю. Ю. Невмержицкая^{1,*},
член-корреспондент РАН В. Ф. Миронов²

Поступило 11.12.2017 г.

Изучали влияние дитерпенового гликозида стевиозида и высоких концентраций тяжёлых металлов на молекулярную гетерогенность лектинов у проростков озимой пшеницы сорта Казанская 560. Стевиозид индуцировал появление нового лектина Мг 45 кДа. Выращивание проростков пшеницы в растворах CdSO₄ и ZnSO₄ привело к появлению белка с Мг 88 кДа. При совместной обработке стевиозидом и тяжёлыми металлами мы обнаружили наличие обоих лектинов в проростках.

DOI: 10.7868/S0869565218100250

На сегодняшний день вещества, выделяемые из растений, являются чрезвычайно перспективной основой для дизайна новых биологически активных соединений, проявляющих чётко выраженный антистрессовый эффект. Их применение даёт возможность повысить устойчивость и урожайность растений при действии стрессовых факторов [1].

Среди таких соединений особое внимание привлекают производные каурена, к которым относится тетрациклический дитерпеноид стевиол, являющийся агликоном гликозидов, получаемых из экстракта травы *Stevia Rebaudiana* Bertoni. Одним из гликозидов данного растения является стевиозид.

Ранее [2–4] нами было установлено, что стевиозид в концентрации 10⁻⁸ М активировал рост и повышал морозоустойчивость растений озимой пшеницы, уменьшал негативное влияние кадмия и цинка на рост растений, а также изменял активность лектинов. Поскольку для лектинов установлена роль в регуляции роста и развития растений и выполнение защитной функции при биотических и абиотических стрессовых условиях [5–8], целью настоящей работы было выяснение молекулярной гетерогенности лектинов клеточной стенки растений озимой пшеницы при обработке стевиозидом и тяжёлыми металлами (ТМ).

Объектом исследования служили корни проростков озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казанская 560. Стевиозид был получен из растительного сырья – стеви – в ИОФХ им. А. Е. Арбузова (КНЦ РАН, Казань). Растения выращивали в лабораторных условиях в кюветах, содержащих водопроводную воду, при освещении 10 000 лк, 12-часовом фотопериоде и температуре 23 °С в течение 7 сут. В опытных вариантах растения росли в растворе стевиозида (10⁻⁸ М). Оптимальная концентрация стевиозида была подобрана в предварительных экспериментах [2]. Выделение лектинов клеточной стенки проводили по методу, описанному ранее [9]. Для анализа молекулярной гетерогенности лектинов использовали гель-фильтрационную хроматографию. В качестве сорбента применяли Sephadex G-150 fine (“Sigma-Aldrich”, США). В собираемых фракциях (по 1 мл) определяли содержание белка по методу Лоури и активность лектинов с помощью реакции гемагглютинации с эритроцитами крови группы I [10].

Как видно из рис. 1, добавление в инкубационную среду стевиозида привело к снижению активности лектинов клеточной стенки. Для более детального выяснения этого вопроса мы исследовали возможные различия в молекулярной массе лектинов клеточной стенки.

В контрольном варианте (выращивание без стевиозида) среди полученных после хроматографии белковых фракций лектиновую активность мы обнаружили в белках с Мг 93, 77, 63, 36 и 19 кДа (рис. 2).

Белок 36 кДа, предположительно, может быть классическим лектином пшеницы – агглютинином

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет

² Институт органической и физической химии

им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра

Российской Академии наук, Казань

*E-mail: nui76@mail.ru

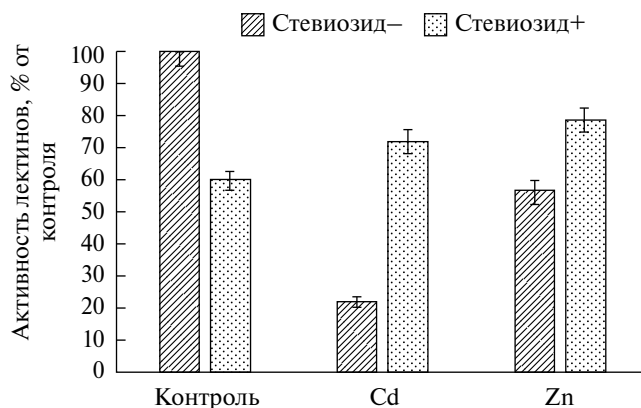


Рис. 1. Влияние стевиозида (10^{-8} М) и тяжёлых металлов (CdSO_4 , ZnSO_4) на активность лектинов клеточной стенки в корнях озимой пшеницы. $M \pm m$, $n = 3$.

зародыша пшеницы (АЗП). Известно, что АЗП кроме цитоплазмы может находиться в пространстве между плазмалеммой и клеточной стенкой. Этот агглютинин, резкое накопление которого происходит при разных неблагоприятных условиях, относится к экскретируемым белкам [11].

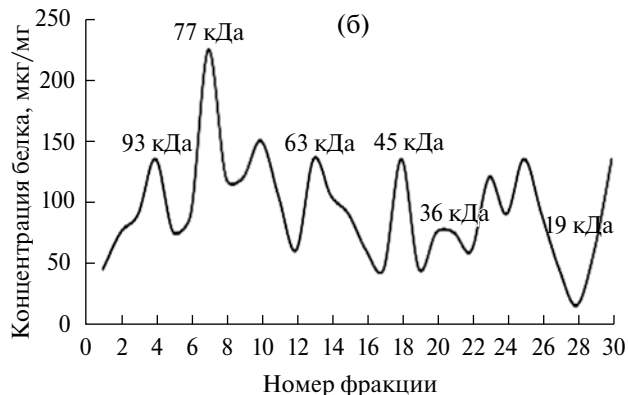
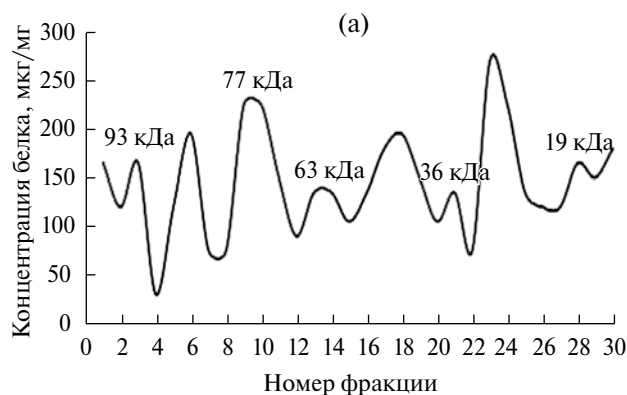


Рис. 2. Профиль элюции при гель-хроматографии белков клеточной стенки проростков озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казанская 560. (а) – контроль, (б) – под действием стевиозида (10^{-8} М).

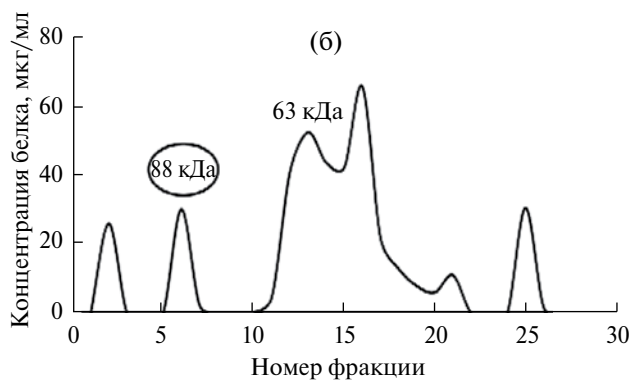
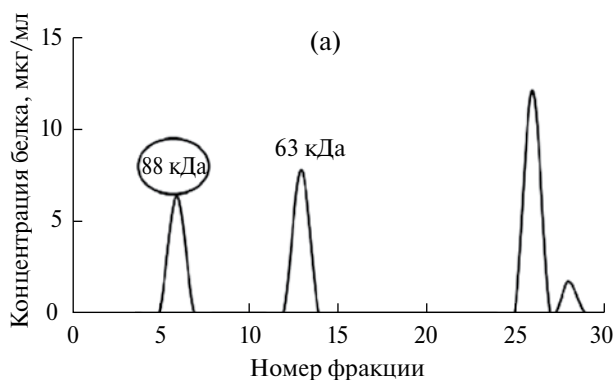


Рис. 3. Профиль элюции при гель-хроматографии белков клеточной стенки проростков озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казанская 560. (а) – выращенные в среде с 1 мМ CdSO_4 , (б) – выращенные в среде с 1 мМ ZnSO_4 .

Стевиозид вызывал появление лектиновой активности во фракции 45 кДа (рис. 2).

При выращивании растений в растворе кадмия отсутствовали при сравнении с контрольным вариантом (рис. 2) практически все лектины, кроме 63 кДа, но зато появлялся новый лектин 88 кДа (рис. 3). Аналогичный лектин с Мг 88 кДа появлялся при выращивании растений в среде, содержащей цинк (рис. 3).

Возможно, исчезновение ряда лектинов при выращивании растений в среде с ТМ связано с их секрецией в ризосферу, где они могут связывать ТМ, препятствуя их поступлению в растение. Кроме того, наблюдаемое изменение профиля элюции белков клеточных стенок может быть обусловлено изменением лигандсвязывающих свойств лектинов клеточной стенки, вызванного взаимодействием белков с ионами ТМ.

Другой способ защиты растений от действия ТМ заключается в компартментализации ТМ, в частности, в клеточной стенке. По-видимому, появление лектина 88 кДа обусловлено его участием в адсорбции ТМ на поверхности клетки.

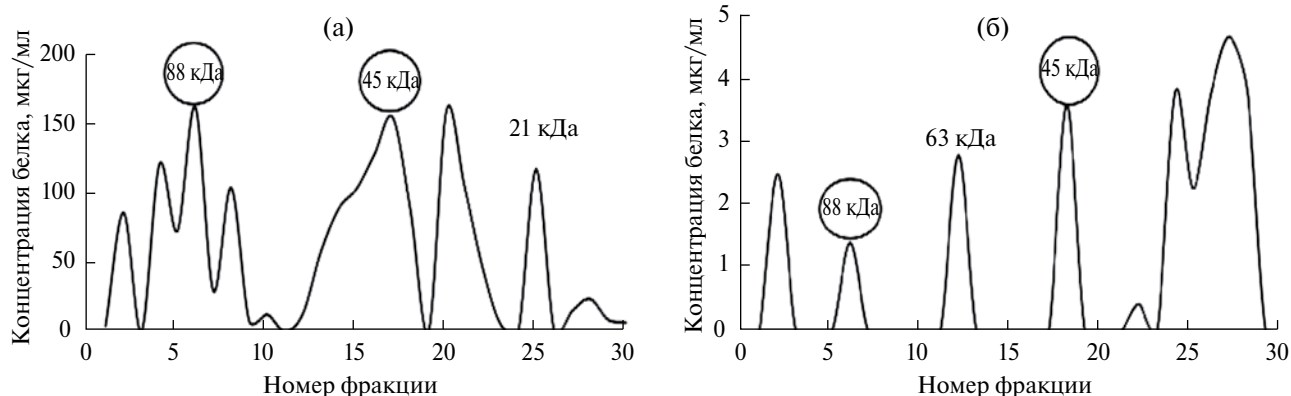


Рис. 4. Профиль элюции при гель-хроматографии белков клеточной стенки проростков озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казанская 560. (а) – предварительно обработанных 10^{-8} М стевииозидом и выращенных в среде с 1 мМ CdSO_4 , (б) – предварительно обработанных 10^{-8} М стевииозидом и выращенных в среде с 1 мМ ZnSO_4 .

Известно, что клеточная оболочка способна связывать ионы ТМ, снижая их токсичность и задерживая поступление в клетку [12]. В настоящее время установлено, что вклад клеточной стенки в детоксикацию ТМ может быть гораздо значительнее, чем вклад других клеточных компартментов [13]. Показано, что доля кадмия, локализованного в клеточной стенке листьев салата, составила 64% от общего содержания в клетке, а доля цинка, прочно связанного в клеточной стенке листьев ячменя, оказалась ещё выше – 77% [14].

Предобработка стевииозидом уменьшила влияние поллютантов на активность лектинов (рис. 1). При совместной обработке стевииозидом и кадмием (рис. 4) появлялся лектин 88 кДа (как и при действии одного кадмия) и 45 кДа (индуцирован стевииозидом). Аналогичную картину мы наблюдали и при исследовании совместного действия цинка и стевииозидом.

Таким образом, в профиле элюции белков у проростков, выросших в растворах CdSO_4 и ZnSO_4 в концентрации 1 мМ, был обнаружен белок с молекулярной массой 88 кДа, который сохранился и в вариантах с обработкой стевииозидом. Возможно, появление этого белка связано с формированием механизмов детоксикации поллютантов в клеточной стенке растений.

Обработка дитерпеновым гликозидом стевииозидом приводит к уменьшению негативного влияния ТМ на морфо-физиологические параметры растительного организма [3]. Можно предположить, что защитное действие стевииозидом проявляется в индукции ряда новых белков в клеточной стенке, стимулирующих формирование устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. В частности, таким белком может быть лектин 45 кДа.

Полученные результаты, по нашему мнению, значительно углубляют наши знания о биологической активности стевииозидом, указывают на необходимость продолжения изучения механизма его действия и на возможность применения стевииозидом в будущем в биотехнологии с целью повышения продуктивности растений в неблагоприятных условиях произрастания.

Работа была выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шакирова Ф.М., Хлебникова Т.Д., Сахобутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Чанышева К.В., Кильдибекова А.Р., Токунова Э.Ф., Аллагулова Ч.Р. // Агрехимия. 2004. № 5. С. 54–58.
2. Тимофеева О.А., Невмерзжичкая Ю.Ю., Мифтахова И.Г., Стробыкина А.С., Михайлов А.Л., Стробыкина И.Ю., Миронов В.Ф. // ДАН. 2010. Т. 435. № 2. С. 282–285.
3. Невмерзжичкая Ю.Ю., Тимофеева О.А., Михайлов А.Л., Стробыкина А.С., Стробыкина И.Ю., Миронов В.Ф. // ДАН. 2013. Т. 452. № 3. С. 346–349.
4. Nevmerzhitskaya J., Mikhailov A., Strobyskina A., Timofeeva O. // Biol. and Med. 2014. V. 6. № 3. P. 97–101.
5. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 2. С. 98–114.
6. Van Damme E.J., Lannoo N., Peumans W.J. // Adv. Bot. Res. 2008. V. 48. № 5. P. 107–209.

7. *De Hoff P.L., Brill L.M., Hirsch A.M.* // Mol. Genet. and Genom. 2009. V. 282. № 12. P. 1–15.
8. *Kovalchuk N.V., Melnykova N.M., Musatenko L.I.* // Biopolymers and Cell. 2012. V. 28. № 7. P. 171–180.
9. *Тимофеева О.А., Гараева Л.Д., Чулкова Ю.Ю., Хохлова Л.П.* // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 3. С. 368–373.
10. *Roopashere S., Singh S.A., Gowda L.R., Rao A.G.A.* // Biochem. J. 2006. V. 395. № 3. P. 629–639.
11. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и её регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 159 с.
12. *Haynes R.J.* // Biol. Rev. 1980. V. 46. № 1. P. 75–99.
13. *Vázquez S., Goldsbrough P., Carpena R.O.* // Physiol. Plant. 2006. V. 128. № 7. P. 487–495.
14. *Brune A., Urbach W., Dietz K.-J.* // Plant Cell Environ. 1994. V. 17. № 3. P. 153–162.