

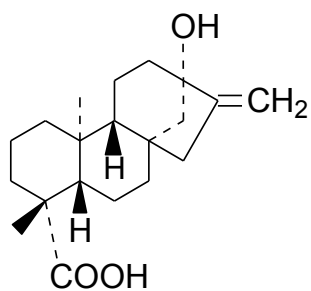
Общая биология

581.1; 57.04

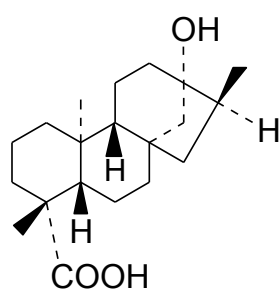
Производные дитерпеноида стевиола регулируют рост и повышают морозоустойчивость озимой пшеницы

Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю., Мифтахова И.Г, Стробыкина А.С., Михайлов А.Л., Стробыкина И.Ю., член-корреспондент РАН Миронов В.Ф.

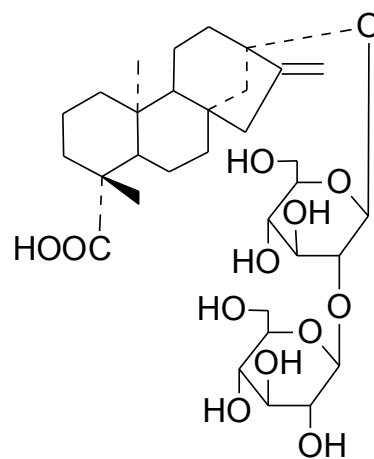
К числу приоритетных направлений исследований в современном растениеводстве относится изучение механизмов регуляции роста и устойчивости растений к разным по природе неблагоприятным факторам среды под влиянием перспективных соединений, обладающих широким спектром действия. Дитерпеноиды представляют собой огромное семейство природных соединений, имеющих разнообразную геометрию сочлененных углеводородных циклов. Они проявляют биологическую активность самых разнообразных типов. Среди тетрациклических соединений особо следует отметить производные каурена, к которым принадлежит дитерпеноид стевиол (1). В настоящее время уже совершенно очевидно, что стевиол является предшественником гибберелловой кислоты, являющейся известным регулятором роста растений, и участвует в ее биосинтезе благодаря трем своим структурным особенностям: цис-сочленению циклов В и С, карбоксильной группе при атоме углерода C_4 , которая вовлекается в ферментативный биосинтез на его начальной стадии и гидроксильной группе при атоме углерода C_{13} , которая вовлекается в ферментативный биосинтез на его последней стадии [1].



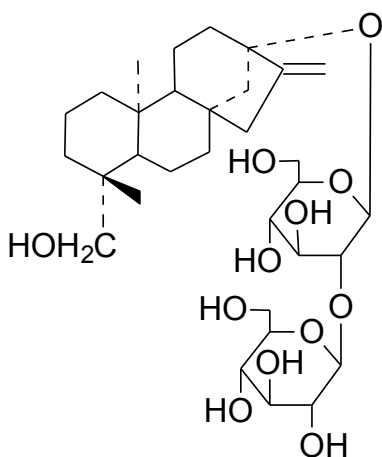
1



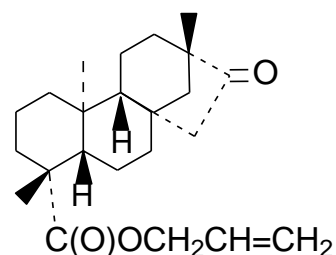
2



3



4



5

В своих экспериментах мы использовали производные стевiola – дигидростевиол (2), стевиолбиозид (3), спирт стевиолбиозид (4), и аллиловый эфир изомера стевiola – дитерпеноида изостевiola (5), синтезированные в ИОФХ им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН по известным методикам [2, 3, 4]. До настоящей работы росторегулирующая активность этих соединений не изучалась. В связи с этим цель работы заключалась в изучении влияния производных дитерпеноида стевiola (2–5) на биохимические и физиологические показатели озимой пшеницы.

Объектом исследования служили растения озимой пшеницы Мироновская 808. Растения выращивали в лабораторных условиях в кюветах на растворах производных стевиола при освещении 100 Вт/м^2 и 12-часовом фотопериоде при температуре 23°C . В опытах с закаливанием 7-дневные проростки помещали в низкотемпературную камеру и далее выращивали при температуре 2°C в течение 7 сут. Данный подход позволяет моделировать первую фазу закаливания растений в лабораторных условиях. Активность амилаз в суточных проростках определяли по [5]. Растворимые лектины экстрагировали 0.05 н HCl, лектины клеточной стенки - 0.9% NaCl и 0.05% раствором тритона X-100 [6]. Лектиновую активность определяли по реакции гемагглютинации с эритроцитами 1 группы крови [7]. Белок определяли по методу Bradford [8]. Морозоустойчивость тестировали по выходу электролитов [9]. Опыты проводили в 3-х биологических повторностях.

На первом этапе работ необходимо было подобрать оказывающие рострегулирующее действие концентрации изучаемых соединений. Как оказалось, аллиловый эфир изостевиола (5), стевиолбиозид (3) и спирт стевиолбиозида (4) в основном рост листьев увеличивали, а корней – замедляли. Наиболее выраженным этот эффект был при концентрациях стевиолбиозида (3) и аллилового эфира изостевиола (5) – 10^{-8} M , а спирта стевиолбиозида (4) – 10^{-7} M (табл.1.). Дигидростевиол (2) подавлял рост и корней, и листьев, особенно при концентрации 10^{-7} M (табл.1.). В молекуле дигидростевиола восстановлена экзоциклическая двойная связь, которая, как предполагают, ответственна за ростстимулирующую активность гибберелловой кислоты. Вероятно, поэтому данное соединение замедляло рост всего растения.

Одним из наиболее хорошо изученных свойств природных гиббереллинов является их способность индуцировать синтез и секрецию алейроновым слоем α -амилазы при прорастании семян. Было показано, что стевиол, изостевиол и некоторые их производные в более низких концентрациях и с большей эффективностью, по сравнению с гибберелловой

кислотой, активируют α -амилазы, удлиняют гипокотиль салата-латука и повышают урожайность винограда [10]. В наших экспериментах суммарная активность амилаз незначительно различалась между вариантами и была несколько выше контроля (табл. 2). Однако активность α -амилазы в основном была ниже, чем в контрольных растениях (табл.2).

Как известно, механизм действия фитогормонов прежде всего связан с изменением экспрессии генов и синтеза белка. При этом большое значение отводят влиянию гормонов на активность и содержание фитоагглютининов. Показано влияние гибберелловой кислоты на экспрессию гена, кодирующего лектин БКС30 массой 30 кДа. Этот белок синтезируется в корнях огурца (*Cucumis sativus*) и в дальнейшем транспортируется с ксилемным соком в надземные органы растения, где вовлекается в процессы регуляции роста и дифференцировки тканей листа [11]. Имеются данные о способности лектинов, помимо углеводов, связываться с молекулами фитогормонов. Так, лектин пшеницы АЗП обладает высоким сродством к целому ряду фитогормонов, таких, как ауксины, цитокинины и гибберелловая кислота [13]. Можно предположить, что комплекс лектины - фитогормоны участвует в запасании гормонов и регуляции роста растений [12].

В следующей серии экспериментов мы изучали влияние производных стевиола на активность лектинов. Значительное повышение активности растворимых лектинов у незакаленных растений происходило под воздействием аллилового эфира изостевиола (5) (рис. 1а). Такой же эффект аллилового эфира изостевиола наблюдали через 3 сут закаливания. Следует отметить, что именно это соединение вызывало наиболее значительное увеличение длины листьев (табл. 1). В литературе обсуждается возможность участия лектинов в регуляции клеточного деления и, как следствие, в реализации ростовых процессов клеток [13]. Ранее в наших работах было показано, что при обработке растений пшеницы регулятором роста цитокининового типа действия картолином наибольшее увеличение активности растворимых лектинов у незакаленных растений сорта Альбидум

114, по сравнению с другими сортами, сопровождалось наиболее значительным повышением митотического индекса корневых меристем [6, 14].

Почти все исследуемые соединения (за исключением аллилового эфира изостевиола (5)) повышали активность лектинов клеточной стенки у незакаленных растений. При этом наибольшее влияние на активность этой фракции белков оказывал дигидростевиол (2), действие которого сохранялось и через 3 сут воздействия низких температур (рис.1б). Ранее нами было установлено [14], что более высокий уровень активности лектинов клеточной стенки у незакаленных растений коррелирует и с большей морозоустойчивостью растений озимой пшеницы.

Как видно из табл. 2, все исследованные соединения повышали морозоустойчивость у незакаленных растений, но в разной степени. Наибольший эффект на показатель LT_{50} , как и на активность лектинов клеточной стенки, оказал дигидростевиол. После семисуточного закаливания также происходило увеличение морозоустойчивости растений. Следовательно, вызванное дитерпеноидами увеличение активности лектинов клеточной стенки в наших экспериментах соответствует и более высокому уровню морозоустойчивости растений.

Таким образом, среди проанализированных соединений (2) - (5) наиболее выраженный рострегулирующий эффект проявляет аллиловый эфир изостевиола (5). Тем не менее, эти соединения, по-видимому не обладают всем спектром действия гиббереллинов, поскольку нами не было обнаружено их влияния на активность α -амилазы. По-видимому, у исследованных соединений произошла потеря некоторых свойств, присущих гибберелинам, при этом у некоторых из них, в частности, у дигидростевиола, усилилась способность оказывать защитное действие на растения при неблагоприятных воздействиях, в данном случае, в условиях низких температур.

Литература

1. Hanson J.R. //Nat. Prod. Rep. 1992. V.9, N.2. P. 139-151.
2. Wood H.B. Allerton R. Diehl H.W. Fletcher H.G. // J. Org. Chem. – 1955. V. 20, № 7. P. 875–883.
3. Хайбуллин Р.Н. Стробыкина И.Ю..Катаев В.Е, Лодочникова О.А. Губайдуллин А.Т..Мусин Р.З. // Журн. Общей химии. 2009. Т.79, Вып.5. С.795-799.
4. Р.Р.Шарипова, И.Ю.Стробыкина, В.Е.Катаев, О.А.Лодочникова, А.Т.Губайдуллин // Журн. общей химии. 2009. Т.79, Вып. 12. С. 2058-2061.
5. Практикум по физиологии растений/Под ред. Третьякова Н.Н. – М.: Колос, 1982. – 271 с.
6. Тимофеева О.А. Гараева Л.Д., Чулкова Ю.Ю., Хохлова Л.П.// Физиология растений. 2008. Т.55, №3. С.368-373.
7. Roopashere S., Singh S.A., Gowda L.R., Rao A.G.A. //Biochem. J. 2006. 395, №3. P. 629-639.
8. Bradford M.A. // Anal. Biochem. 1976. V.72. P.248-254.
9. Uemura M., Steponkus P.L.//Plant Physiol. 1989.V.91, №3. P.961-969.
- 10.Oliveria B.H., Stiirmer J.C., Filho J.S., Ayub R.A.// Phytochemistry. 2008. V. 69, N. 7. P. 1528-1533.
- 11.Oda A., Sakuta C., Masuda S. et al. //Plant Physiol. 2003. V.133, № 4. P.1779-1790.
- 12.Bogoeva V.P., Radeva M.A., Atanasova L.Y., Stoitsova L.Y., Boteva R.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1698, №2. P. 213-218.
- 13.Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. // Журнал общей биологии. 2007. Т.68, № 1. С.98-114.
- 14.Тимофеева О. А. Лектины как активные компоненты адаптивных реакций озимой пшеницы к неблагоприятным условиям среды. Автореф. дисс. ...докт. биол. наук. – Уфа, 2009. - 38 с.

Табл. 1. Влияние производных стевиола на длину корней и листьев 7-суточных проростков озимой пшеницы Мироновская 808

Вариант опыта	Длина листьев, % от контроля	Длина корней, % от контроля
Дигидростевиол, 10^{-7} М	$95,0 \pm 3,1$	$87,1 \pm 3,0$
Стевиолбиозид, 10^{-8} М	$104,7 \pm 3,2$	$78,8 \pm 3,2$
Спирт стевиолбиозид, 10^{-8} М	$107,6 \pm 3,1$	$86,5 \pm 3,1$
Аллиловый эфир изостевиола, 10^{-8} М	$109,1 \pm 3,1$	$85,4 \pm 3,0$

Табл. 2. Влияние производных стевиола (2) – (5) на активность амилаз и морозоустойчивость озимой пшеницы Мироновская 808

Вариант опыта	Суммарная активность амилаз, мг крахмала/мг белка/ч	Активность α -амилазы, мг крахмала/мг белка/ч	LT ₅₀ , °С, незакаленные растения	LT ₅₀ , °С, закаленные растения
Контроль	$0,955 \pm 0,003$	$0,059 \pm 0,001$	$-9,2 \pm 0,2$	$-11,1 \pm 0,1$
Дигидростевиол, 10^{-7} М, 7 сут	$1,198 \pm 0,006$	$0,034 \pm 0,002$	$-10,2 \pm 0,1$	$-12,0 \pm 0,1$
Стевиолбиозид, 10^{-8} М, 7 сут	$1,232 \pm 0,004$	$0,043 \pm 0,003$	$-9,9 \pm 0,1$	$-11,9 \pm 0,2$
Спирт стевиолбиозид, 10^{-8} М, 7 сут	$1,313 \pm 0,005$	$0,044 \pm 0,003$	$-9,9 \pm 0,1$	$-12,0 \pm 0,2$
Аллиловый эфир изостевиола, 10^{-8} М, 7 сут	$1,310 \pm 0,003$	$0,052 \pm 0,002$	$-9,7 \pm 0,2$	$-11,7 \pm 0,1$

Подписи к рисункам

Рис. 1.

Влияние производных стевиола (2) – (5) на активность растворимых (а) и связанных с клеточной стенкой (б) лектинов незакаленных и закаленных растений озимой пшеницы Мироновская 808. 1. 7 суток при 23⁰ С; 2. 7 суток при 23⁰ С и 3 суток при 2 – 3⁰ С; 3. 7 суток при 23⁰ С и 7 суток при 2 – 3⁰ С;

(а)

