

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1:577.122:577.175.1

РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЙ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТЫ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА НА РАСТЕНИЯ ФАСОЛИ

І. ВЛИЯНИЕ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА НА РОСТ И ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ

© 2009 г. А. Р. Лубянова, Р. А. Фатхутдинова,
М. В. Безрукова, Ф. М. Шакирова

Институт биохимии и генетики

Уфимского научного центра Российской академии наук

(Уфа, Россия)

Исследовали влияние экзогенной обработки фитогемагглютинином (ФГА) на баланс фитогормонов и рост корней проростков фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.). ФГА, являющийся собственным лектином фасоли, индуцировал сдвиги в гормональном статусе корней, обусловленные первоначально быстрым обратимым подъемом содержания абсцизовой кислоты и последующим относительно стабильным возрастанием уровня индолилуксусной кислоты и особенно цитокининов. Предполагается, что вызванные обработкой ФГА изменения в состоянии гормональной системы лежат в основе реализации его ростстимулирующего эффекта на проростки фасоли, который проявлялся в увеличении линейных размеров корней и митотической активности клеток апикальной меристемы корней. Полученные данные свидетельствуют о возможном вовлечении ФГА в гормональную регуляцию роста растений.

Ключевые слова: *Phaseolus vulgaris* L., фитогемагглютинин, митотический индекс, относительная скорость роста, индолилуксусная кислота, цитокинины, абсцизовая кислота

Многие углевод-связывающие белки растений (фитолектины) синтезируются и аккумулируются в активно растущих меристематических тканях (Королев, 1984). Так, известно, что основным местом локализации агглютинина зародыша пшеницы (АЗП) в вегетирующих растениях пшеницы являются меристематические ткани корней, побегов и основания стебля (Cammue et al., 1989; Stinissen et al., 1985). Похожую локализацию имеют иммунологически родственные с АЗП лектины в вегетирующих растениях некоторых злаковых культур, таких как ячмень и рис (Peumans, 1984; Raikhel et al., 1993). Это стало основанием для предположе-

ния об участии АЗП и АЗП-подобных лектинов в регуляции деления меристематических клеток (Шакирова, 2001; Rudiger, 1997; Sharon, Lis, 2004). Действительно, нами был выявлен стимулирующий эффект АЗП на митотическую активность меристемы корней пшеницы, опосредованный его активным воздействием на гормональный статус растений (Безрукова и др., 2004; Shakirova et al., 2004). В меньшей мере изучены свойства лектина фасоли фитогемагглютинина (ФГА) на растения фасоли, хотя впервые именно для ФГА было обнаружено свойство стимулировать деление клеток животных (Mirkov, Chrispeels, 1993; Zhao et al., 2001).

Цель данной работы состояла в исследовании влияния ФГА на рост и гормональный статус корней и оценке его участия в сигналь-

ной регуляции ростовых процессов растений фасоли.

МЕТОДИКА

Работу проводили на 4-5-суточных проростках фасоли сорта Белозерная. Семена после стерилизации раствором перманганата калия проращивали в течение 3-х суток в кюветах на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой, при 21-23°C, 16-часовом световом дне и освещенности 15 клк. После отделения семядолей проростки корнями помещали в раствор 2%-ной сахарозы в качестве питательного раствора на сутки для снятия раневого эффекта (Шакирова, Безрукова, 1998). Затем 4-суточные проростки фасоли выдерживали на смеси 2% сахарозы с 1 мг/л ФГА в течение 24 ч. Контролем служили растения, инкубированные на растворе 2% сахарозы. Через определенные промежутки времени корни опытных и контрольных проростков фиксировали для оценки характера изменений различных физиолого-биохимических показателей.

Митотический индекс (МИ) апикальной меристемы корней фасоли определяли согласно (Howell et al., 2007). Для этого кончики корней фиксировали в смеси уксусной кислоты с этанолом (1:3) в течение 4-х ч, отмывали дистиллированной водой и проводили мацерацию в смеси 5%-ной пектиназы и 5%-ной целлюлазы (1:1) при 37°C в течение 1 ч. Временные давленные препараты окрашивали ацетокармином. В каждом варианте опыта исследовали по 2000 клеток меристемы корней с целью расчета процента делящихся клеток к общему числу проанализированных клеток, а также оценки количества делящихся клеток, находящихся на стадиях профазы, метафазы, анафазы и телофазы митоза (Howell et al., 2007). Каждый опыт проводили в трех повторностях, включающих не менее 40 корней.

Концентрацию свободных форм цитокининов, индолилуксусной (ИУК) и абсцизовой (АБК) кислот в одной растительной навеске

определяли методом иммуноанализа (Shakirova et al., 2004). Навеску растительного материала, состоящую из 10 корней, растирали в жидком азоте и экстрагировали фитогормоны 80%-ным этанолом в течение 16 ч при 4°C. После центрифугирования при 18000 g супернатант упаривали в токе воздуха до водного остатка, в аликвоте которого определяли суммарное содержание свободных форм цитокининов иммунореактивных к кроличьей сыворотке, полученной к зеатинрибозиду. Из оставшегося водного остатка ИУК и АБК экстрагировали серным эфиром, метилировали их диазометаном и после упаривания сухой остаток растворяли в 80%-ном этаноле, в аликвоте которого определяли концентрацию этих гормонов.

На рисунке представлены средние арифметические трех независимых опытов, каждый из которых проведен в трех-четырех аналитических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально важно было исследовать влияние экзогенного воздействия лектина фасоли на рост растений. Данные, представленные в табл. 1, демонстрируют явный ростстимулирующий эффект ФГА, о чем свидетельствует удлинение главного корня проростков. Это, в свою очередь, отражается в увеличении относительной скорости роста корня за сутки воздействия лектина: у корней контрольных растений этот показатель составил 0,48, тогда как у подвергнутых воздействию 1 мг/л ФГА в течение 24 ч – 0,7.

Рост растений, как известно, является интегральным процессом. Основываясь на выявленной ранее способности ФГА проявлять митогенные свойства в гетерологичных системах (Zhao et al., 2001), важно было выяснить, проявляется ли это свойство в растениях фасоли, для которых этот лектин является эндогенным. В связи с этим нами были проведены опыты по оценке митотического индекса корней под влиянием ФГА. Учитывая сведения о том, что не-

Таблица 1

Изменение длины (см) главного корня 4-суточных проростков фасоли в ходе обработки фитогемагглютинином в концентрации 1 мг/л

Вариант	Время воздействия ФГА, ч		
	0	16	24
Контроль	3,10±0,14	4,30±0,20	4,60±0,22
ФГА	3,10±0,15	4,81±0,21	5,26±0,25

Эффект обработки 1 мг/л ФГА на митотический индекс и количество клеток корней 4-суточных проростков фасоли, находящихся в разных фазах митоза*

Вариант	МИ, %	Клетки в состоянии				
		интерфазы	профазы	метафазы	анафазы	телофазы
Контроль ФГА	3,00±0,09	1929	2 ч 26	18	9	18
	3,30±0,10		32			
Контроль ФГА	3,00±0,11	1936	4 ч 21	17	9	17
	4,10±0,14		35			
Контроль ФГА	3,00±0,12	1937	6 ч 20	18	10	15
	4,60±0,16		41			

*В каждом варианте анализировали 2000 клеток

которые неблагоприятные факторы среды могут увеличить МИ по сравнению с контролем вследствие нарушений перехода клеток от одних стадий митоза к другим (Нефедьева, Хрянин, 2000), важно было проанализировать также фактическое число клеток, находящихся на разных стадиях митоза, являющегося очень чувствительным и информативным показателем степени благоприятности воздействия внешних факторов на растения (Howell et al., 2007).

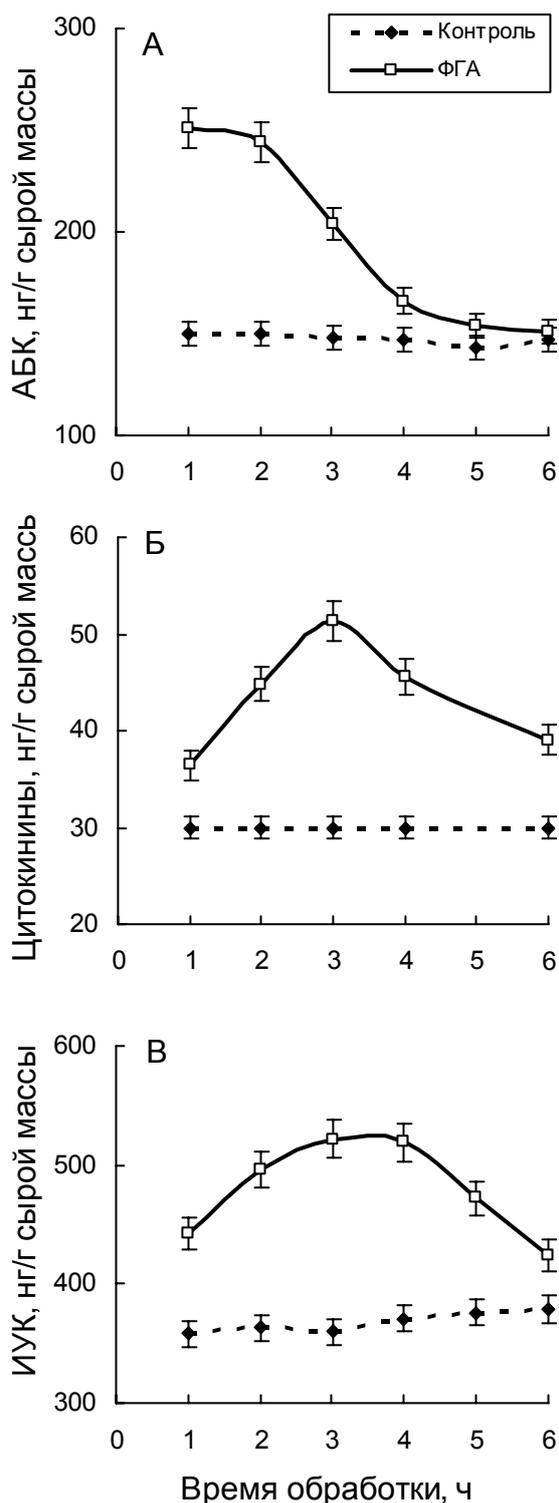
Из табл. 2 видно, что ФГА уже через два часа от начала воздействия вызывал некоторое повышение МИ корней, главным образом, за счет увеличения числа клеток на начальном этапе клеточного митоза – профазе. Через четыре часа воздействия лектина МИ корней опытных проростков фасоли возрос почти на 40% по сравнению с контрольными растениями, при этом существенно увеличилась доля клеток, находящихся в состоянии профазы и телофазы. За следующие два часа МИ корней под влиянием 1 мг/л ФГА увеличился еще более чем на 10% по сравнению с 4-часовой экспозицией, а доля клеток, вступивших в стадию профазы и телофазы, завершающей фазы клеточного цикла, возросла в 2 раза относительно контроля (табл. 2). В то же время соотношение количества клеток, находящихся на стадиях метафазы и анафазы, в кончиках корней обработанных ФГА растений сохранялось примерно на том же уровне, что и контрольных. Интересно, что аналогичные данные об индукции увеличения количества клеток корней, находящихся в состоянии профазы и анафазы клеточного цикла, были получены при исследовании влияния оптимальной в стимуляции роста концен-

трации 24-эпибрассинолида на растения лука (Howell et al., 2007).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об активации под влиянием ФГА митотической активности клеток апикальной меристемы корней, что вносит важный вклад в проявление ростстимулирующего действия этого лектина на проростки фасоли.

Как известно, рост растений находится под контролем гормональной системы. В связи с выявлением ростстимулирующего действия ФГА на растения фасоли, можно было ожидать его активного воздействия на гормональный статус проростков фасоли. При этом следует отметить, что одновременный анализ нескольких групп фитогормонов в одних и тех растениях позволяет получить комплексную картину изменений в состоянии гормональной системы в ответ на внешние факторы.

Действительно, детальный анализ динамики содержания фитогормонов выявил значительные ФГА-индуцированные сдвиги в балансе фитогормонов в корнях проростков фасоли (рисунок). Как видно, сначала (1 ч) наблюдалось обратимое накопление АБК и последующее постепенное снижение содержания этого гормона до контрольного уровня (рисунок: А). Такая реакция эндогенной АБК, по-видимому, не может рассматриваться в качестве стрессового ответа растений на обработку ФГА, напротив, она была вполне благоприятной, судя по увеличению МИ корней под влиянием лектина. Тем более, в последнее время все больше внимания уделяют АБК в связи с ее участием в регуляции формирования корневой системы растений не только в стрессовых, но и в нор-



Влияние 1 мг/л ФГА на динамику содержания абсцизовой кислоты (А), цитокининов (Б) и индолилуксусной кислоты (В) в корнях 4-суточных проростков фасоли.

мальных условиях произрастания (Vysotskaya et al., 2008; Wasilewska et al., 2008).

Одновременно под влиянием обработки ФГА происходило транзитное накопление цитокининов и ауксина в корнях проростков с

максимумом, приходящимся на 3 ч (рисунок: Б, В). Роль этих фитогормонов в регуляции деления меристематических клеток общепризнана (Hartig, Beck, 2006). Можно полагать, что именно с ФГА-индуцированным повышением содержания этой пары гормонов, в первую очередь, связано выявленное нами ускорение прохождения фаз митоза и усиление роста корней проростков фасоли. В связи с этим важно упомянуть полученные нами ранее данные о взаимодействии лектина пшеницы и фитогормонов при активации митотической активности клеток апикальной меристемы корней пшеницы (Shakirova et al., 2004).

Таким образом, способность ФГА вызывать быстрые перестройки в состоянии гормональной системы растений фасоли может свидетельствовать в пользу совместной с эндогенными фитогормонами регуляции ФГА пролиферации клеток корней. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении разных фитолектинов в регуляцию такого важного физиологического процесса растений, как рост.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта НШ-915.2008.4.

ЛИТЕРАТУРА

Безрукова М.В., Кильдибекова А.Р., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М. Участие агглютинина зародыша пшеницы в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней проростков // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 1. – С. 35-38.

Королев Н.П. Функции лектинов в клетках // Итоги науки и техники. Сер. общие проблемы физико-химической биологии. – М.: ВИНТИ, 1984. – Т. 1. – 351 с.

Нефедьева Е.Э., Хрянин В.Н. Динамика митотического индекса корневых меристем проростков гречихи, развивающихся из семян, подвергнутых импульсному давлению // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 4. – С. 412-419.

Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.

Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Изменение содержания АБК и лектина в корнях проростков пшеницы под влиянием 24-эпибрассинолида и засоления // Физиология растений. – 1998. – Т. 45. – С. 451-455.

Cammue B.P.A., Broekaert W.F., Kellens J.T.C. et al. Stress-induced accumulation of wheat germ agglutinin and abscisic acid in roots of wheat seedlings // Plant Physiol. – 1989. – V. 91. – P. 1432-1435.

РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЙ И ЗАЩИТНЫЙ

- Hartig K., Beck E. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in plant cell cycle // *Plant Biol.* – 2006. – V. 8, № 3. – P. 389-396.
- Howell W.M., Keller G.E., Kirkpatrick J.D. et al. Effects of the plant steroidal hormone, 24-epibrassinolide, on the mitotic index and growth of onion (*Allium cepa*) root tips // *Gen. Mol. Research.* – 2007. – V. 6. – P. 50-58.
- Mirkov T.E., Chrispeels M.J. Mutation of Asn128 to Asp of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) eliminates carbohydrate-binding and biological activity // *Glycobiology.* – 1993. – V. 3, № 6. – P. 581-587.
- Peumans W.J. Biochemistry, cell-biology, physiology, biosynthesis and function of gramineae lectins. – Proefschrift Leuven: Katholike Univ., Lab. voor Pflatenbiochemie. – 1984. – 211 p.
- Raikhel N.V., Lee H.-I., Broekaert W.F. Structure and function of chitin-binding proteins // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1993. – V. 44. – P. 591-615.
- Rudiger H. Structure and Function of Plant Lectins. *Glycosciences. Status and Perspectives.* / Eds.: H.-J. Gabius and S. Gabius. – London-Glasgow-Weihem-NewYork-Tokyo-Melbourne-Madras: Chapman & Hall ITPC, 1997. – P. 415-438.
- Shakirova F.M., Kildibekova A.R., Bezrukova M.V., Aval'baev A.M. Wheat germ agglutinin regulates cell division in wheat seedling roots // *Plant Growth Regul.* – 2004. – V. 42, № 2. – P. 175-180.
- Sharon N., Lis H. Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules: a hystorical overview // *Glycobiology.* – 2004. – V. 14. – P. 53-62.
- Stinissen H.M., Chrispeels M.J., Peumans W.J. Biosynthesis of lectin in roots of germinating and adult cereal plants // *Planta.* – 1985. – V. 164. – P. 278-286.
- Vysotskaya L., Korobova A., Kudoyarova G. Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: its impact on the differential growth of roots and shoots // *J. Plant Physiol.* – 2008. – V. 165. – P. 1274-1279.
- Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C. et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more... // *Molecular Plant.* – 2008. – V. 1, № 2. – P. 198-217.
- 1.Zhao R., Guerrah A., Tang H., Zhao Z.J. Cell surface glycoprotein PZR is a major mediator of concanavalin A-induced cell signaling // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 277, № 10. – P. 7882-7888.

Поступила в редакцию
19.12.2008 г.

GROWTHSTIMULATING AND PROTECTIVE EFFECTS OF PHYTOHEMAGGLUTININ ON PLANTS OF COMMON BEAN

I. THE PHYTOHEMAGGLUTININ INFLUENCE ON GROWTH AND HORMONAL STATUS IN ROOTS

A. R. Lubyanova, R. A. Fatkhutdinova, M. V. Bezrukova, F. M. Shakirova

*Institute of Biochemistry and Genetics
of Ufa Scientific Center of Russian Academy of Sciences
(Ufa, Russia)*

The effect of exogenous treatment of phytohemagglutinin (PHA) on phtotohormones content and root growth has been investigated in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. PHA being common bean's lectin induced fast transit abscisic acid accumulation and subsequent stable increase in indole-3-acetic acid and cytokinins levels. These PHA-induced changes of phytohormones content are supposed to stimulate growth of common bean seedlings. The growth stimulation is shown by both the increase of linear sizes of roots and the activation of mitotic activity of apical root cells. The data proves the PHA involvement in the hormonal regulation of plant growth.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., phytohemagglutinin, mitotic index, relative growth rate, indole-3-acetic acid, cytokinins, abscisic acid

ЛУБЯНОВА и др.

**РІСТСТИМУЛЮЮЧИЙ І ЗАХИСНИЙ ЕФЕКТИ
ФІТОГЕМАГГЛЮТИНІНУ НА РОСЛИНИ КВАСОЛІ**

**I. ВПЛИВ ФІТОГЕМАГГЛЮТИНІНУ
НА РІСТ І ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАТУС КОРЕНІВ ПРОРОСТКІВ**

А. Р. Лубянова, Р. А. Фатхутдінова, М. В. Безрукова, Ф. М. Шакірова

*Інститут біохімії і генетики
Уфимського наукового центру Російської академії наук
(Уфа, Росія)*

Досліджували вплив екзогенної обробки фітогемагглютиніном (ФГА) на баланс фітогормонів і ріст коренів проростків квасолі (*Phaseolus vulgaris* L.). ФГА, який є власним лектином квасолі, індукував зрушення у гормональному статусі коренів, обумовлені первинно швидким оборотним підйомом вмісту абсцизової кислоти і подальшим відносно стабільним зростанням рівня індолілоцтової кислоти і особливо цитокінінів. Припускається, що викликані обробкою ФГА зміни у стані гормональної системи лежать в основі реалізації його рістстимулюючого ефекту на проростки квасолі, який виявлявся у збільшенні лінійних розмірів коренів і мітотичної активності клітин апікальної меристеми коренів. Одержані дані свідчать про можливу участь ФГА у гормональній регуляції росту рослин.

Ключові слова: *Phaseolus vulgaris* L., фітогемагглютинін, мітотичний індекс, відносна швидкість росту, індолілоцтова кислота, цитокініни, абсцизова кислота