

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1:577.122:577.175.1:631.524.85

РОСТСТИМУЛІРУЮЩИЙ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТЫ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА НА РАСТЕНИЯ ФАСОЛИ

II. ВЛИЯНИЕ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА НА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ

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

Институт биохимии и генетики

*Уфимского научного центра Российской академии наук
(Уфа, Россия)*

Исследовали влияние обработки фитогемагглютинином (ФГА) до воздействия 1,5% NaCl и в постстрессовый период на баланс фитогормонов и рост корней проростков фасоли. Выявлено, что предобработка проростков фасоли ФГА предотвращала вызванное засолением торможение митотической активности клеток апикальной меристемы корней, тогда как обработка проростков этим лектином в постстрессовый период ускоряла репарацию ростовых процессов корней. Проявление защитного действия ФГА на рост клеток корней фасоли обусловлено его воздействием на состояние гормональной системы проростков. Засоление вызывало быстрые сдвиги в балансе фитогормонов, связанные с обратимым накоплением АБК и уменьшением уровня ИУК и цитокининов в проростках фасоли. Предобработка ФГА способствовала поддержанию гормонального статуса корней в условиях засоления на уровне контрольных растений, о чем судили по коэффициентам отношения ИУК к АБК и цитокининов к АБК. Обработка проростков ФГА в постстрессовый период способствовала ускорению накопления ИУК и цитокининов, что отразилось в повышении относительно контроля коэффициентов ИУК/АБК и цитокинины/АБК. Полученные результаты указывают на важную роль ФГА-индуцированных перестроек гормональной системы в регуляции роста растений фасоли в стрессовых условиях.

Ключевые слова: *Phaseolus vulgaris L., фитогемагглютинин, митотический индекс, индолуксусная кислота, цитокинины, абсцизовая кислота*

Познание механизмов устойчивости растений к изменяющимся условиям произрастания справедливо относится к числу первоочередных проблем, решение которых необходимо для целенаправленного управления этим процессом в практическом растениеводстве. В этой области малоизученным и перспективным остается исследование функций углеводов-

связывающих белков растений – фитолектинов. Ранее нами было показано, что агглютинин зародыша пшеницы (АЗП), связывающий мономер и олигомеры *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (Сiorraga et al., 1999), способствует снижению уровня повреждающего действия засоления на рост клеток корней проростков пшеницы и ускорению репарации ростовых процессов после удаления стрессора из среды (Кильдибекова и др., 2004). Кроме того, выявлено, что АЗП оказывает протекторный эффект на растения пшеницы в условиях индуцированного засолением окислительного стресса (Bezrukova et al.,

Адрес для корреспонденции: Шакирова Фарид Миннихановна, Институт биохимии и генетики, Уфимский научный центр Российской академии наук, пр. Октября, 71, 450054, Уфа, Россия;
e-mail: shakirova@anrb.ru

2008). Реализация защитного действия АЗП, вероятно, обусловлена изменениями под его влиянием в состоянии гормональной системы растений пшеницы (Безрукова и др., 2004; Shakirova et al., 2004). Вместе с тем, сведения о механизмах защитного действия других фитолектинов в растениях пока ограничены (Шакирова, Безрукова, 2007). Это справедливо и в отношении лектина фасоли фитогемагглютинина (ФГА). ФГА по своим физико-химическим свойствам сильно отличается от АЗП (Van Damme et al., 1998), однако он обладает сродством к различным углеводам и углеводным комплексам, в том числе и к гликанам, содержащим *N*-ацетил-*D*-глюкозамин (Kaneda et al., 2002).

В предыдущей работе (Лубянова и др., 2009) нами был выявлен четко выраженный ростстимулирующий эффект ФГА на растения фасоли, вероятно, обусловленный быстрыми сдвигами в гормональном балансе, связанными с обратимым накоплением ИУК и цитокининов. Цель настоящей работы заключалась в оценке способности ФГА оказывать защитный эффект на проростки фасоли в условиях натрий-хлоридного засоления и выявлении значения эндогенных фитогормонов в реализации этого действия.

МЕТОДИКА

Работу проводили на 4–6-суточных проростках фасоли сорта Белозерная. Семена после обеззараживания раствором $KMnO_4$ проращивали в течение трех суток в кюветах на смоченной водопроводной водой фильтровальной бумаге при 21–23°C, 16-часовом световом дне и освещенности 15 клк. После отделения семядолей 3-суточные проростки помещали корнями в раствор 2% сахарозы на 2 ч для снятия раневого эффекта (Шакирова, Безрукова, 1998). Затем часть 3-суточных проростков переносили на смесь 2% сахарозы с 1 мг/л ФГА на 24 ч. Предобработанные и необработанные ФГА 4-суточные проростки фасоли инкубировали в смеси 2% сахарозы и 1,5% NaCl в течение 7 ч, после чего возвращали их на раствор 2% сахарозы. Другую часть 3-суточных проростков выдерживали в растворе 2% сахарозы в течение 24 ч и после 7-часового воздействия 1,5% NaCl переносили на 24 ч на раствор 1 мг/л ФГА, приготовленный на 2% сахарозе. Контролем во всех опытах служили растения, инкубированные на растворе 2% сахарозы.

Митотический индекс (МИ) апикальной меристемы корней оценивали с использованием общепринятых цитологических методов (Howell et al., 2007). Для этого кончики корней фиксировали в смеси уксусной кислоты и этанола (1:3) в течение 4 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 анализировали по 2000 клеток меристематической ткани корней фасоли и рассчитывали МИ корней как показатель процента делящихся клеток к общему числу проанализированных клеток. Каждый опыт проводили в трех повторностях, включающих не менее 40 проростков.

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 рисунках представлены средние арифметические трех независимых опытов, каждый из которых проведен в трех-четыре аналитических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Натрий-хлоридное засоление, как известно, вызывает в растениях не только обезвоживание, но и оказывает на них токсическое действие (Munns, 2002), что неизбежно должно проявиться в торможении ростовых процессов. Действительно, кратковременное в течение 7 ч воздействие 1,5% NaCl существенно тормозило митотическую активность апикальной меристемы корней фасоли, более того, даже спустя двое суток после удаления стрессора из среды

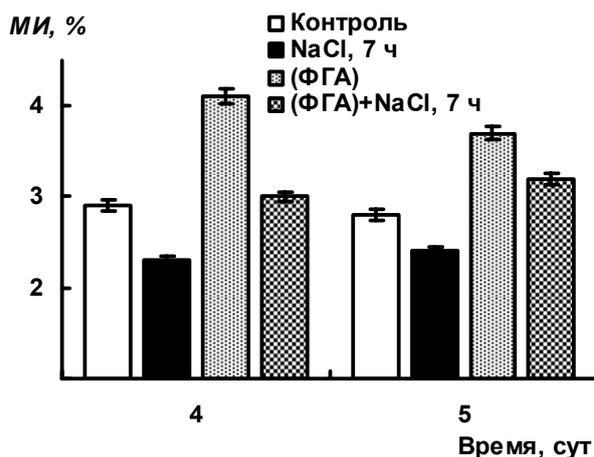


Рис. 1. Влияние предобработки 3-суточных проростков фасоли 1 мг/л ФГА в течение 24 ч на митотический индекс корней, подвергнутых и не подвергнутых 7-часовому воздействию 1,5% NaCl.

этот показатель оставался на значительно меньшем уровне относительно контроля (рис. 1, 2). Предобработка проростков фасоли ФГА в течение 24 ч способствовала предотвращению стресс-индуцированного торможения деления клеток кончиков корней и увеличению по сравнению с контролем МИ корней через сутки после удаления хлорида натрия из среды, что, вероятно, обусловлено значительно более высокими показателями роста корней в этом варианте опыта до стрессового воздействия (рис. 1). Обработка проростков фасоли ФГА в постстрессовый период способствовала поддержанию МИ клеток на уровне контрольного значения в условиях засоления и, таким образом, интенсивность деления клеток корней в этом варианте опыта была заметно выше по сравнению с необработанными лектином растениями, подвергнутыми засолению (рис. 2). Следует отметить, что митотическая активность клеток апикальной меристемы корней обработанных ФГА проростков поддерживалась на значительно большем уровне даже спустя двое суток после его удаления из среды, что указывает на пролонгированное ростстимулирующее действие ФГА на растения фасоли.

Полученные результаты демонстрируют антистрессовый эффект ФГА на рост клеток корней проростков фасоли. Эффективная регуляция роста корней при неблагоприятных условиях среды является важным аспектом в выживании и в процессах дальнейшего формирования урожая у целого растения. Нужно отметить, что аналогичные результаты при анализе митотической активности кончиков корней бы-

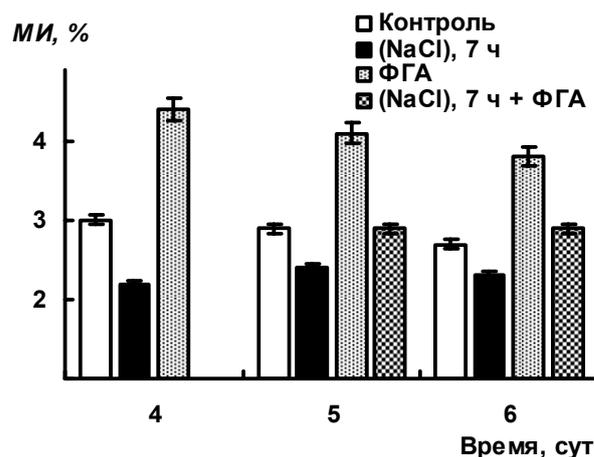


Рис. 2. Динамика митотической активности клеток апикальной меристемы корней проростков фасоли, подвергнутых 7-часовому засолению и последующей обработке 1 мг/л ФГА в течение 24 ч.

ли получены на обработанных АЗП растениях пшеницы, подвергнутых воздействию засоления (Кильдибекова и др., 2004). В связи с этим можно предположить, что защитное действие ФГА на рост клеток также обусловлено его активным влиянием на гормональный статус проростков фасоли.

Присутствие в среде инкубирования проростков фасоли 1,5% NaCl вызвало значительное накопление АБК (с максимумом на 3 ч) и заметное снижение содержания ИУК и цитокининов в корнях. Такие перестройки в состоянии гормональной системы можно отнести к характерным ответам растений на стрессовые факторы, вызывающие обезвоживание (Ghanem et al., 2008). Индуцированные засолением сдвиги в балансе фитогормонов отразились в уменьшении коэффициентов ИУК/АБК и цитокинины/АБК в корнях проростков относительно контроля, особенно в первые часы стресса (рис. 3). К 6 ч воздействия хлорида натрия эти показатели приближались к норме, главным образом, вследствие уменьшения к этому времени содержания АБК. Известно, что усиление биосинтеза и накопления АБК в ответ на дефицит влаги, наблюдаемое в растениях в условиях засухи, засоления, нарушения температурного режима, часто носит транзиторный характер (Vasquez-Robinet et al., 2008). Однако при этом содержание цитокининов и ИУК в корнях проростков в ходе воздействия 1,5% NaCl оставалось на более низком уровне по сравнению с контролем. Это указывает на значительную стрессовую нагрузку на растения, которая также проявлялась в устойчивом торможении ми-

РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЙ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТЫ

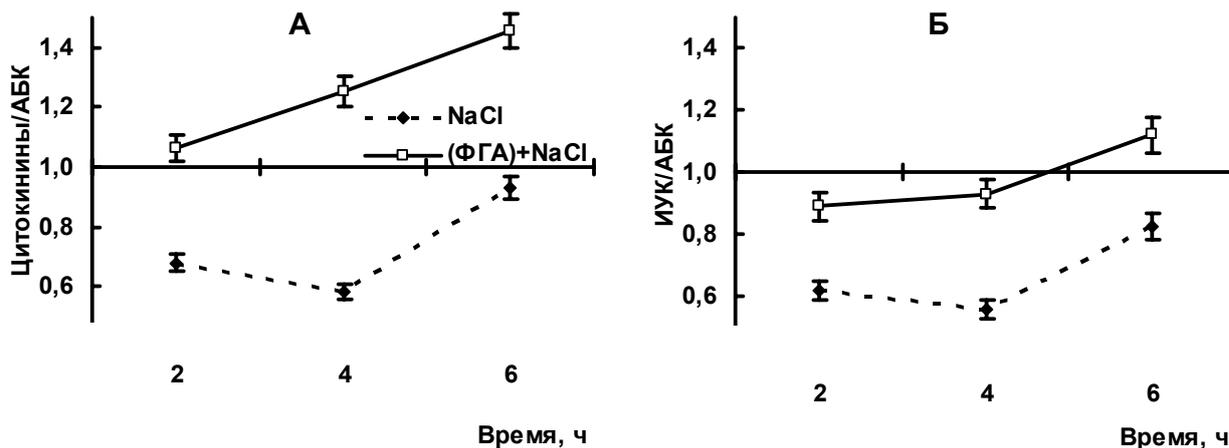


Рис. 3. Динамика коэффициента отношения цитокинины/АБК (А) и ИУК/АБК (Б) в корнях предобработанных в течение 24 ч 1 мг/л ФГА 4-суточных проростков фасоли в условиях засоления. Коэффициенты отношения цитокинины/АБК и ИУК/АБК в контроле составляют единицу.

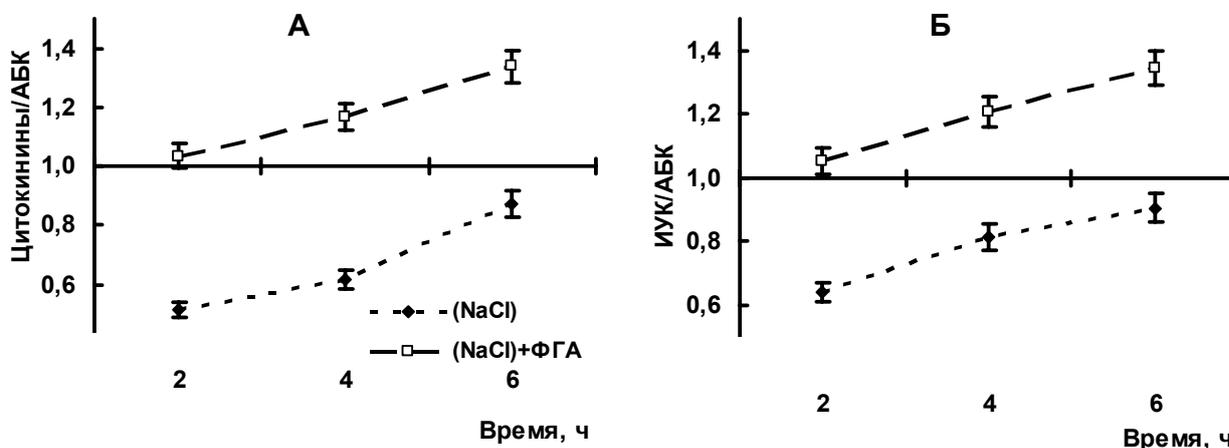


Рис. 4. Динамика коэффициента отношения цитокинины/АБК (А) и ИУК/АБК (Б) в корнях 4-суточных проростков фасоли после 7-часового воздействия 1,5% NaCl в ходе обработки ФГА. Коэффициенты отношения цитокинины/АБК и ИУК/АБК в контроле составляют единицу.

тотической активности клеток апикальной меристемы корней фасоли (рис. 1, 2).

Предобработка проростков фасоли ФГА полностью предотвращала вызываемое засолением снижение концентрации цитокининов в корнях и существенно уменьшала амплитуду падения уровня ИУК и накопления АБК. Вследствие этого предобработанные ФГА проростки фасоли при воздействии засоления в целом характеризовались более высокими даже по сравнению с контрольными значениями показателями коэффициентов цитокинины/АБК и сопоставимыми с контролем в случае таковых ИУК/АБК (рис. 3). Поскольку экзогенные и эндогенные цитокинины играют важную роль в регуляции ускорения прохождения фаз митоза и увеличения доли поделившихся клеток (Кабузенко и др., 1995; Yang et al., 2002), можно

полагать, что повышенное содержание цитокининов в корнях предобработанных ФГА и подвёрнутых засолению растений вносит свой вклад в предотвращение стрессиндуцированного снижения МИ (см. рис. 1).

Таким образом, способность ФГА активно воздействовать на состояние гормональной системы растений фасоли в ходе предобработки проявлялась в предотвращении резких стрессиндуцированных сдвигов в содержании исследованных фитогормонов, что, в свою очередь, отразилось в поддержании МИ корней на контрольном уровне.

В следующей серии опытов оценивали влияние ФГА на гормональный статус корней проростков фасоли сразу после 7-часового воздействия 1,5% NaCl. Удаление стрессора из среды приводило к постепенному возвращению

содержания цитокининов, ИУК и АБК в корнях к норме (рис. 4). Через 6 ч коэффициенты цитокинины/АБК и ИУК/АБК хотя и не достигали контрольных значений, но были близки к ним. Обработка растений ФГА в постстрессовый период существенно ускоряла (через 2 ч) нормализацию уровня всех трех исследованных групп гормонов (рис. 4). В последующие часы ФГА вызывал неуклонное накопление цитокининов и ауксина в корнях и к 6 часам опыта коэффициенты отношений цитокининов к АБК и ИУК к АБК заметно превышали такие же показатели у контрольных растений. Следовательно, аналогично действию АЗП на растения пшеницы (Кильдибекова и др., 2004), обработка ФГА способствует уменьшению уровня стрессиндуцированного накопления АБК и предотвращению снижения концентрации ауксина и особенно цитокининов в корнях проростков фасоли. В то же время воздействие ФГА в постстрессовый период вызывает ускорение увеличения содержания ИУК и цитокининов на фоне поддержания концентрации АБК на уровне контрольных растений.

Совокупность данных позволяет заключить, что способность ФГА предотвращать вызываемое засолением торможение митотической активности клеток кончиков корней и ускорять репарацию роста клеток делением после удаления стрессора из среды является важным аргументом в пользу предположения о вовлечении этого лектина в формирование устойчивости растений фасоли к засолению среды. В основе реализации защитного действия ФГА, вероятно, лежат вызванные им перестройки в состоянии гормональной системы растений фасоли.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы "Государственная поддержка научных школ России" (грант НШ-915.2008.4.).

ЛИТЕРАТУРА

- Безрукова М.В., Кильдибекова А.Р., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М. Участие агглютинаина зародыша пшеницы в регуляции деления клеток апикальной меристемы корней проростков // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 1. – С. 5-38.
- Кабузенко С.Н., Горшенков А.В., Володькина Л.С. Влияние хлоридного засоления и цитокинина на митотическую активность корней пшеницы и кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 1995. – Т. 27, № 1-2. – С. 31-35.
- Кильдибекова А.Р., Безрукова М.В., Авальбаев А.М. и др. Механизмы защитного влияния агглютинаина зародыша пшеницы на рост клеток корней проростков пшеницы при засолении // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 312-316.
- Лубянова А. Р., Фатхутдинова Р. А., Безрукова М. В., Шакирова Ф. М. Ростстимулирующий и защитный эффекты фитогемагглютинаина на растения фасоли. I. Влияние фитогемагглютинаина на рост и гормональный статус корней проростков // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 1 (16). – С. 39-44.
- Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Изменение содержания АБК и лектина в корнях проростков пшеницы под влиянием 24-эпибрасинолида и засоления. // Физиология растений. – 1998. – Т. 45. – С. 451-455.
- Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журн. общей биологии. – 2007. – Т. 68, № 2. – С. 98-114.
- Bezrukova M., Kildibekova A., Shakirova F. WGA reduces the level of oxidative stress in wheat seedlings under salinity // Plant Growth Regul. – 2008. – V. 54, № 3. – P. 195-201.
- Ciopraga J., Gozia O., Tudor R. et al. Fusarium sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – V. 1428. – P. 424-432.
- Ghanem M.E., Albacete A., Martínez-Andújar C. et al. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59, № 11. – P. 3039-3050.
- 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.
- Kaneda Y., Whittier R.F., Yamanaka H. et al. The high specificities of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leukoagglutinating lectins for bisecting GlcNAc or β 1-6-linked branch structures, respectively, are attributable to loop B // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, № 19. – P. 16928-16935.
- Munns R. Comparative physiology of salt and water stress // Plant Cell Environ. – 2002. – V. 25, № 2. – P. 239-250.
- 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.

РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЙ И ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТЫ

Van Damme E., Peumans W.J., Barre A., Rouge P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 1998. – V. 17, № 6. – P. 575-692.

Vasquez-Robinet C., Mane S.P., Ulanov A.V. et al. Physiological and molecular adaptations to drought

in Andean potato genotypes. // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59, № 8. – P. 2109-2123.

Yang J., Zhang J., Huang Z. et al. Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice // *Annals of Botany.* – 2002. – V. 90. – P. 369-377.

Поступила в редакцию
07.04.2009 г.

GROWTHSTIMULATING AND PROTECTIVE EFFECTS OF PHYTOHEMAGGLUTININ ON PLANTS OF COMMON BEAN

II. INFLUENCE OF PHYTOHEMAGGLUTININ ON PLANTLETS SALTRESISTANCE

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

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

The effects of phytohemagglutinin (PHA) treatments before the influence of 1,5 % NaCl and during the post-stress period on the balance of phytohormones and growth of common bean roots have been investigated. PHA pretreatment of common bean seedlings prevented salinity-induced inhibition of mitotic activity of apical root cells. Treatment of common bean seedlings by this lectin during the post-stress period promoted faster growth restoration of meristem root cells by division. Probably, the important contribution of this PHA-induced growth protection of common bean root cells turned to be the result of lectin influence on the hormonal system of common bean seedlings. Salinity caused ABA accumulation and decreased the IAA and cytokinins levels. PHA pretreatment maintained the levels of hormones of common bean seedlings under salinity near control, and we might judge about it by the IAA to ABA and cytokinins to ABA ratios. The PHA treatment of common bean seedlings during the post-stress period promoted the increase both IAA and cytokinins accumulation and the decrease ABA level, which was reflected in increase the ratios IAA/ABA and cytokinins/ABA concerning the control. The received results indicated the important role of PHA-induced changes in hormonal system in plant growth regulation of common bean seedlings under salinity.

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

РІСТСТИМУЛЮЮЧИЙ І ЗАХИСНИЙ ЕФЕКТИ ФІТОГЕМАГГЛЮТИНІНУ НА РОСЛИНИ КВАСОЛІ

II. ВПЛИВ ФІТОГЕМАГГЛЮТИНІНУ НА СОЛЕСТІЙКІСТЬ ПРОРОСТКІВ

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

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

Досліджували вплив обробки фітогемагглютиніном (ФГА) до дії 1,5% NaCl і в постстресовий період на баланс фітогормонів і ріст коренів проростків квасолі. Виявлено, що передобробка проростків квасолі ФГА запобігала спричинюваному засоленням зниженню мітотичної активності клітин апікальної меристеми коренів, тоді як обробка проростків цим лектином в постст-

ЛУБЯНОВА и др.

ресовий період прискорювала репарацію ростових процесів коренів. Прояв захисної дії ФГА на ріст клітин коренів квасолі зумовлений його дією на стан гормональної системи проростків. Засолення викликало швидкі зрушення в балансі фітогормонів, пов'язані з оборотним нагромадженням абсцизової кислоти (АБК) та зниженням рівня індолілоцтової кислоти (ІОК) і цитокінінів у проростках квасолі. Передобробка ФГА сприяла підтримці гормонального статусу коренів за умов засолення на рівні контрольних рослин, який оцінювали за коефіцієнтами співвідношення ІОК до АБК і цитокінінів до АБК. Обробка проростків ФГА у постстресовий період сприяла прискоренню нагромадження ІОК і цитокінінів, що виявлялося у підвищенні відносно контролю коефіцієнтів ІОК/АБК і цитокініни/АБК. Отримані результати вказують на важливу роль ФГА-індукованих перебудов гормональної системи у регуляції росту рослин квасолі у стресових умовах.

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