

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ
БЕЛКОВОГО СПЕКТРА В РАСТЕНИЯХ-РЕГЕНЕРАНТАХ
КАРТОФЕЛЯ**

**А. Хасейн, Ж. С. Сайдсултанова, Д. А. Шарафутдинова,
В. А. Кузовлев, к.б.н., Н. П. Малахова, к.б.н.**

Институт молекулярной биологии и биохимии
им. М. А. Айтхожина

Исследовано влияние стрессовых факторов, моделирующих засуху, на изменение спектра цитоплазматических белков в растениях-регенерантах картофеля. Показано значительное различие в белковых спектрах между устойчивыми и восприимчивыми к засухе линиями картофеля. Установлено, что действие осмотика – маннитола и высоких температур приводит к экспрессии белка с молекулярной массой 45 kDa.

Ключевые слова: белковый спектр, картофель, растения-регенеранты картофеля.



Картоптың регенерант-өсімдіктеріндегі цитоплазматикалық ақуыздар спектрінің өзгеруіне, құрғақшылықты моделдейтін қауырт факторлардың әсері зерттелген. Картоптың құрғақшылыққа төзімді және қабылдағыш түрлерінің арасындағы ақуыздық спектрлеріндегі едәуір айырмашылықтарының болатыны көрсетілген. Осмотик – маннитол мен жоғарғы температурааның әсері молекулалық массасы 45 kDa болатын ақуыздың экспрессиясына әкелетіні анықталды.

Түйінді сөздер: ақуыздық спектр, картоп, картоптың, өсімдік-регенеранттары.



The influence of stress factors, simulating a drought, to change the range of cytoplasmic proteins in selective cell cultures and regenerated plants of potato. It was showed a significant difference in the spectra of proteins between resistant and susceptible to drought lines of potatoes. It was established that the action osmotic-mannitol and high temperatures lead to the expression of the protein with a molecular mass of 45 kDa.

Key words: protein spectrum, potatoes, potato plants regenerated.

В Республике Казахстан засуха является одним из наиболее распространенных неблагоприятных факторов внешней среды, оказывающим отрицательное воздействие на рост и развитие сельскохозяйственных растений, что в целом приводит к значительному снижению их продуктивности [1]. Известно, что устойчивость растений к повышенным температурам (так называемая жаростойкость) и недостатку влаги достигается изменением метаболизма: увеличением вязкости цитоплазмы и содержания осмотически активных веществ, а также выработкой специфических стрессовых белков, способных не разрушаться при перегреве (т. е. обеспечивать протекание важнейших биохимических процессов в экстремальных условиях). Такие белки разнообразны и образуют группы высокомолекулярных и низкомолекулярных белков. К ним относятся как особые стрессовые белки – дегидрины позднего эмбриогенеза, белки аквапорины, участвующие в транспорте воды через мембраны, шапероны – белки, поддерживающие целостность ДНК при обезвоживании, так и белки, участвующие в ответе растений на оксидативный стресс – пероксидаза, СОД. Защитная роль этих белков в растении подтверждается фактами гибели клетки при введении ингибиторов синтеза этих белков в период действия стрессора [2].

Авторами изучено влияние стрессовых факторов, моделирующих засуху, на изменение спектра цитоплазматических белков в контрастных по устойчивости к засухе клеточных культурах и растениях-регенерантах картофеля. Были использованы селективные линии контрастных по устойчивости к засухе сорта картофеля «Аксор» (среднеустойчивый к засухе, среднеурожайный, относительно устойчив к заболеваниям) и сорт «Бакша» (неустойчивый к засухе, среднеурожайный). Клеточную селекцию засухоустойчивых линий картофеля обоих сортов проводили по принципу отбора генетически измененных клеток в присутствии селективного агента маннитола и последующей регенерацией из них растений.

Для моделирования условий засухи 9-дневные селективные клеточные суспензии картофеля полученных линий, выращенные на питательной среде с добавлением 0,15М маннитола, и неселективные суспензии исходных сортов подвергали действию

высокой температуры (35 °С) и искусственному осмотическому стрессу (обработка 0,15М маннитолом). Сбор образцов клеточной суспензии картофеля обоих сортов проводили по временным точкам: через 0,24 ч (1 сут.), 72 ч (3 сут.), 168 ч (7 сут.), 288 ч (12 сут.) после действия стрессового фактора. Сбор образцов растений-регенерантов проводили по временным точкам после обработки 0,15М маннитолом и действия высокой температуры (35 °С): через 0, 2, 4, 8, 12, 24 ч (1 сут.), 72 ч (3 сут.), 168 ч (7 сут.), 288 ч (12 сут.). В качестве контроля использовались образцы исходных сортов. Экстракцию белков из клеточных культур и растительного материала проводили 3-кратным объемом экстрагирующего 50 мМ Na Ac буфера (68 г Na уксуснокислый 3-водный в 500 мл H₂O, pH=5,0). Гомогенаты центрифугировали 15 000 об/мин, +4 °С, 10 мин. на Centrifuge CM-50 фирмы "Sky Line ELM".

Денатурирующий электрофорез проводили с ДДС-Na (SDS-электрофорез) по методу V. R. Laemmli в 12,5 % SDS-полиакриламидном геле [3]. Активность пероксидазы измеряли по методу О. В. Лебедева [4].

В результате разделения в денатурирующих условиях с ДДС-Na цитоплазматических белков из растений-регенерантов и клеток суспензионных культур картофеля при действии стрессовых факторов 0,15М маннитола и высокой температуры (+35 °С) в линиях R37/A (линия сорта «Аксор») и R4/B (линия сорта «Бакша») показал, что как в контрольных, так и в опытных образцах картофеля линий R37/A выявлено наличие белков с молекулярной массой в диапазоне 24-97 kDa. Результаты экспериментов на растениях-регенерантах схематично представлены в табл. 1, 2.

Таблица 1
 Экспрессия тотальных белков растений-регенерантов картофеля линий R37/A

Mr, kDa	Временные точки, ч																	
	контроль									маннитол								
	2	4	8	12	24	72	168	288		2	4	8	12	24	72	168	288	
14,4																		
17																		
20,1	+																	
24	+	+																
30	+	+	+															
33	+	+	+	+														
45	+	+	+	+	+													
55	+	+	+	+	+	+												
66	+	+	+	+	+	+												
97	+	+	+	+	+	+												

Примечание. + Минорное присутствие белка в пробе (низкое содержание белка);
 ++ мажорное присутствие белка в пробе (высокое содержание белка)

Как видно из представленных в табл. 1 данных, белки с молекулярной массой 14,4, 17 и 20,1 кДа слабо детектировались на всех этапах эксперимента, что особенно отмечено в контрольных образцах.

Установлено, что как в контрольных образцах, так и в пробах экспериментальных образцов обеих линий картофеля на всех этапах эксперимента выявлена экспрессия белков с молекулярной массой 24, 33, 55 и 66 kDa. При этом белок с молекулярной массой при 45 kDa в контрольных образцах обеих линий имеет слабую выраженность. Тогда как максимальное содержание этого белка в экспериментальных пробах линий картофеля R37/A и R4/B выявлялось после 8 и 168 ч от начала действия обоих стрессовых факторов (маннитола и температуры).

Таблица 2
Экспрессия тотальных белков растений-регенерантов картофеля линий R4/B

Mr, kDa	Временные точки, ч																										
	контроль									маннитол									температура								
	2	4	8	12	24	72	168	288		2	4	8	12	24	72	168	288		2	4	8	12	24	72	168	288	
14,4																											
17																											
20,1																											
24																											
30																											
33																											
45																											
55																											
66																											
97																											

Примечание. + Минорное присутствие белка в пробе (низкое содержание белка);
++ мажорное присутствие белка в пробе (высокое содержание белка).

Данные SDS-электрофореза контрольных и опытных образцов картофеля линии R4/B также показали присутствие белков с молекулярной массой в диапазоне 24-97 kDa на всех этапах эксперимента. Помимо этого во всех временных точках кроме 72, 168 и 288 ч также отмечено наличие белков с молекулярной массой 97 kDa, а в точках, соответствующих 12, 24, 72 и 168 ч, после воздействия стрессовых факторов, отмечена экспрессия белка молекулярной массой, равной 30 kDa.

Также в образцах этой линии максимальная экспрессия белков с молекулярной массой, равной 45 kDa, была выявлена через 8, 24 и 168 ч после воздействия обоих стрессовых факторов (табл. 2). Надо отметить, что в целом электрофоретический спектр белков из образцов, полученных после воздействия маннитола на растения-регенеранты линий R4/B, был гораздо

слабее по сравнению с таковым у линий, подвергнутых обработке высокой температурой.

Эксперименты по исследованию спектра цитоплазматических белков из суспензионной культуры обеих линий картофеля показали, что по сравнению со спектром белков из растений-регенерантов белковый спектр из суспензионных культур выражен менее ярко. Во всех контрольных и опытных образцах суспензионных культур селективных линий R37/A и R4/B картофеля были выявлены белки с молекулярной массой в диапазоне 21-97 kDa. Необходимо также отметить, что у линий R37/A количество белка с молекулярной массой 45 kDa было максимальным в образцах, взятых через 168 ч. Для картофеля линий R4/B этот белок более четко выражен к 24 и 168 ч после стрессового воздействия как маннитола, так и температуры.

По результатам исследований электрофоретического спектра цитоплазматических белков методом SDS-электрофореза из растений-регенерантов и суспензионных культур различных линий картофеля были выявлены белки с молекулярной массой 45 kDa, которые могут представлять собой множественные формы пероксидазы (имеющей молекулярную массу 44,1 kDa) и отвечать на воздействие различных стрессовых факторов, включая осмотический и температурный стресс.

Максимальное содержание белка с молекулярной массой 45 kDa на электрофореграммах в растениях-регенерантах линии R37/A соответствовало показаниям данных, приведенным в графике с двумя пиковыми уровнями активности пероксидаз через 8 и 168 ч после воздействия маннитола и высокой температуры. В растениях-регенерантах линии R4/B отмечены 3 пика уровня активности пероксидаз через 8, 168 и 24 ч в отличие от линии R37/A [5].

Таким образом, полученные нами результаты показали, что при действии стресса на растения картофеля активность ферментов пероксидазы значительно различается у устойчивого и восприимчивого сорта.

В селективной линии R37/A картофеля со средней степенью устойчивости к засухе содержание цитоплазматических белков значительно выше, чем в клеточных культурах и растениях-

регенерантах как исходного сорта, так и в селективной линии R4/B картофеля.

В целом по результатам проведенных исследований нами было достоверно установлено, что по данным электрофореза цитоплазматических белков обеих линий картофеля можно судить о восприимчивости какого-либо сорта к стрессовому воздействию, в частности, к засухе и осмотическому шоку.

Литература

1. Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C. Oxidative stress and antioxidative systems in plants // *Curr. Sci.* – 2002. – P. 82.
2. Tugce Kalefetoglu, Yasemin Ekmekci. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms // *G.U. Journal of Science.* – 2005. – № 18(4). – P. 723-740.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T.4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 4. – P. 178-189.
4. Лебедева О. В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина H_2O_2 в присутствии пероксидазы хрена // *Биохимия.* – 1977. – Т. 42. – С. 1372-1379.
5. Сайдсултанова Ж. С., Галиева Л. Д., Кузовлев В. А., Берикболова А., Малахова Н. П. Влияние факторов засухи на активность фермента пероксидазы клеточных культур картофеля // *Инновационное развитие и востребованность науки в современном Казахстане: Матер. V Междунар. науч. конф., г. Алматы, 24-25 ноября 2011 г. – Алматы, 2011. – С. 273-275.*