

УДК 581.19

Влияние осмотического стресса на динамику аминокислот *Stipa krylovii* Roshev

The influence of osmotic stress on the dynamic of amino acid of *Stipa krylovii* Roshev

Пляскина И. Н., Бондаревич Е. А.

Plyaskina I. N., Bondarevich E. A.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита, Россия.
E-mail: thebestdamnthing@mail.ru

Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Реферат. Проведено исследование вклада свободных аминокислот в процесс адаптации *S. krylovii* к недостатку влаги. В оптимальных условиях и при небольшом осмотическом стрессе происходит интенсивная мобилизация протеиногенных аминокислот, что обеспечивает большую всхожесть семян. При увеличении осмотического стресса тенденция динамики свободных аминокислот сохраняется, но происходит с небольшой задержкой.

Summary. The contribution of free amino acids to the adaptation of *S. krylovii* to lack of moisture was studied. Intensive mobilization of proteinogenic amino acids occurs in optimal conditions and with a small osmotic stress, that provides high germination of seeds. With increasing osmotic stress, the trend of the dynamics of free amino acids is preserved, but occurs with a slight delay.

Введение

На территории Восточного Забайкалья распространены растения ксероморфной природы, устойчивые к условиям обитания с недостатком влаги. Одним из таких растений является *Stipa krylovii* Roshev – центральноазиатский – южносибирский вид, встречающийся в степях и харганатах (Галанин, 2009). Вид может быть доминантом и выполнять средообразующую функцию (Касьянова, 2004). Таким образом, исследуемый злак обладает рядом адаптаций, обеспечивающих произрастание и семенное размножение в аридных условиях. Одним из механизмов, обеспечивающих устойчивость к стрессам различной природы, является накопление свободных аминокислот (Кузнецов, Шевякова, 1999; Яхин и др., 2012). Свободные аминокислоты являются структурными единицами вновь синтезируемых белков, участвуют в биосинтезе вторичных соединений и регулируют многие биохимические процессы, а в условиях стресса участвуют в процессах детоксикации ксенобиотиков (Хелдт, 2014). Поэтому изучение влияния условий, имитирующих физиологическую засуху, на динамику свободных аминокислот может внести вклад в определение механизмов адаптации дикорастущих злаков Восточного Забайкалья.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись зрелые очищенные зерновки *S. krylovii*, собранные в 2013 году в Оловянинском районе Забайкальского края и проростки (24, 48 и 72 ч.). Семена проращивали на растворах сахаров с высоким осмотическим давлением (маннит), имитирующих условия физиологической засухи (Назарова и др., 2005). Использовали дифференцирующие растворы осмолитика – с осмотическим давлением 5 и 10 атм., контроль – дистиллированная вода. Также каждые сутки определяли количество проросших семян (в %). Для определения свободных аминокислот использовали навески зерновок злаков (сухие и пророщенные) массой $50 \pm 0,2$ мг. Экстракцию свободных аминокислот проводили 0,89 %-ным раствором хлорида натрия. Водно-солевую вытяжку растворяли в ацетонитриле (соотношение 1:1). Содержание свободных аминокислот определяли методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии (Teerlink, 1994). Определено содержание 20 аминокислот (18 протеиногенных (кроме пролина и цистеина) и 2 непротеиногенных – таурина и орнитина). Полученные данные подвергнуты статистической обработке с помощью пакета программ Microsoft Excel 2010 и PAST 3.0 (Hammer et al., 2001).

Результаты

В исследуемых условиях прорастание семян *S. krylovii* во всех пробах отмечается на вторые сутки (рис.). В контроле уже на вторые сутки всхожесть составила 90 %. Осмотическое давление в 5 атм. замедлило процесс прорастания зерновок (всхожесть на вторые сутки 43 %), но на третьи сутки исследуемый вид уже имел всхожесть 91 %. В условиях осмотического давления в 10 атм. прорастание заметно замедляется (26 %). Также осмотический стресс повлиял и на динамику свободных аминокислот в проростках злака. Такой показатель как общее количество аминокислот в первые 24 ч. от начала прорастания в контроле вырос с 1112,2 мкг/г сырой массы до 7853,7 мкг/г сырой массы, т.е. примерно в 7 раз (рис.). В условиях действия осмолитика (5 атм.) произошло ещё большее выделение свободных аминокислот, и составило 11176,3 мкг/г (увеличение в 10 раз). Это может быть связано с гидролизом запасных белков. Образующиеся в первые сутки свободные аминокислоты включаются в синтез полипептидов, необходимых для процесса прорастания, и как показало исследование, начало видимого прорастания (2 сутки) в контроле и при 5 атм. характеризуется снижением концентрации свободных аминокислот. Однако при увеличении осмотического давления до 10 атм. повышение уровня свободных аминокислот происходит на вторые сутки, и это может быть связано с недостатком воды в условиях, имитирующих засуху.

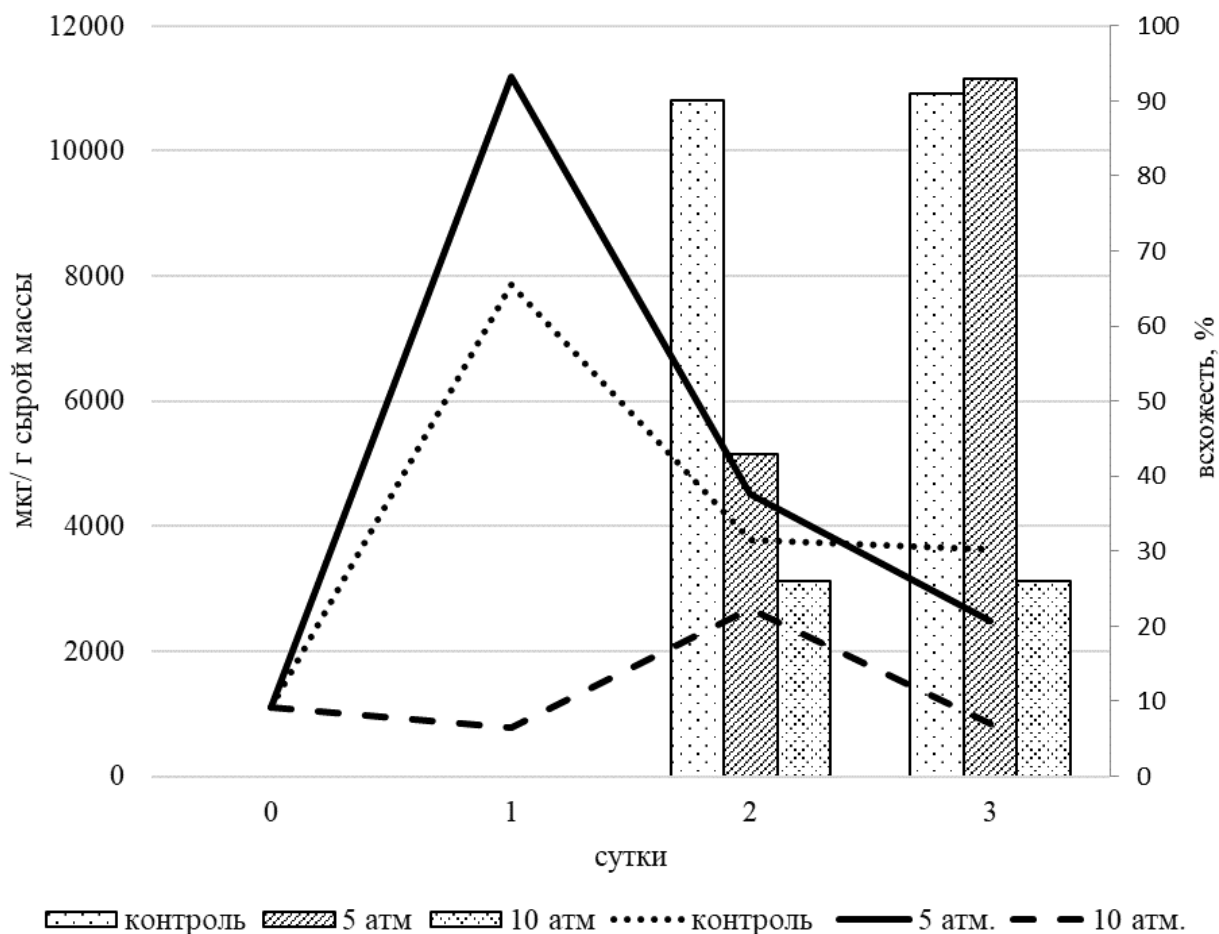


Рис. Всхожесть (в %) и изменение суммы свободных аминокислот при прорастании семян *S. krylovii* в условиях осмотического стресса.

Также был проведен анализ содержания отдельных аминокислот и их групп (кислые аминокислоты и их амиды; гидрофильные нейтральные; основные; ароматические; гидрофобные; непротеиногенные) (табл.). Глутамат и глутамин являются основными метаболитами в клетках растений, участвующими в связывании аммиака и переносе аминокрупп (Хелдт, 2011). Во время набухания семян (1 сутки) в контроле и при 5 атм. значительно повышается уровень глу и глн, а с началом видимого прорастания происходит уменьшение концентрации этих аминокислот в 3–5 раз. Осмотическое давление 10 атм. задерживает образование глу и глн на сутки, и пик выделения этих аминокислот приходится на 48 часов. В целом динамика этих аминокислот и их суммарное содержание в условиях контроля и низкого осмотического давления (5 атм.) характеризуется большими абсолютными значениями, что, по-видимому, связано с активным образованием, ресинтезом и выделением из резервных белков глу и глн, включающихся в процессы азотистого обмена. В растворе маннита (10 атм.) были значительно меньшие изменения количества глу и глн, что может быть объяснено действием дефицита доступной воды и замедлением процессов прорастания семян *S. krylovii*.

Таблица

Динамика свободных аминокислот (в мкг/г сырой массы) в семенах и проростках *S. krylovii* в условиях осмотического стресса

Аминокислоты	Сухие семена	Контроль			5 атм.			10 атм.		
		24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Асп	29,6	260,73	278,34	107,55	629,9	217,4	65,95	37,7	69,24	20,46
Глу	105,5	729,1	242,5	300,8	1309,4	469,3	235,1	76,5	235,3	71,36
Асн	68,0	915,3	142,8	377,6	2621,3	617,4	151,5	68,2	256,9	59,6
Глн	219,1	1336,3	277,6	944,1	1182,5	292,9	488,2	7,3	442,7	164,5
Σ кислых а/к и их амидов	422,22	3241,5	941,24	1730	5743,1	1597	940,7	189,7	1004,2	315,9
Сер	89,04	731,01	307,9	301,5	608,5	343,1	198,4	9,6	46,8	75,5
Гли	80,80	564	253,3	232,6	1282,9	346,3	180	12,58	164,7	61,9
Тре	20,77	163,73	18,6	67,54	208,84	142,3	46,3	20,22	261,3	21,33
Ала	95,6	591,5	116,52	244	282,9	97,4	213	12,6	26,8	75,7
Σ гидрофильных нейтральных а/к	286,21	2050,2	696,32	845,64	2383,1	929,1	637,7	55	499,6	234,4
Гис	42,67	264,3	275,6	109	599	196,9	95,06	324	244,95	31,1
Лиз	19,4	147,7	12,4	60,9	144,2	60,4	43,2	17,8	154,6	12,7
Арг	21,2	166,01	21,7	68,5	75,64	43,9	47	4,1	57,31	16,5
Σ основных а/к	83,27	578,01	309,7	238,4	818,87	301,2	185,3	345,9	456,9	60,33
Три	20,68	178,1	634,9	73,4	314,8	223,7	46,1	32,1	62,9	15,9
Фен	19,1	192,4	383,4	79,4	479,4	335,6	42,55	32,1	161,27	22,04
Тир	25,9	300	281,5	123,7	219,2	230,1	57,7	21,7	82,4	31,1
Σ ароматических а/к	65,68	670,47	1299,8	276,5	1013,3	789,4	146,3	85,94	306,5	68,99
Мет	3,6	486,64	91,9	200,7	155,63	171,6	8,05	9,9	40,6	7,2
Вал	48,72	1,9	89,9	0,8	393,5	37,5	108,5	36,4	127,9	47,4
Иле	26,7	189,3	135,51	78,09	270,01	259,5	59,5	20,62	91,52	21,2
Лей	46,7	354	45,99	146	329,6	251,8	103,9	21,1	72,5	41,5
Σ гидрофобных а/к	125,67	1031,8	363,3	425,6	1148,7	720,4	279,9	87,99	332,5	117,3
Таурин	123,1	217,3	101,9	89,6	44,6	25,6	274,2	2,1	38,5	45,9
Орнитин	6,2	64,6	56,6	26,6	24,6	151,5	13,7	4,2	33,1	7,7
Σ непротеиногенных а/к	129,2	281,8	158,5	116,3	69,2	177,2	287,9	6,3	71,6	53,6

Содержание асп и асн в контроле на момент 24 ч. от начала прорастания увеличивалось в 9 и 13 раз соответственно, при этом к 48 ч. концентрация асп практически не изменилась, тогда, как асн уменьшалось в 6 раз (табл.). К моменту 72 ч. от начала прорастания динамика для асп продолжала быть отрицательной, тогда как асн напротив имела положительную динамику. В растворе маннита (10 атм.) в первые сутки от начала прорастания концентрация асп и асн практически не изменилась по сравнению с сухими зерновками, к 48 ч. увеличивалось в 1,8 и 3,7 раза соответственно. К 72 ч. динамика этих аминокислот была отрицательной (табл.). В сравнении с другими условиями проращивания содержание асп и асн в растворе с большим значением осмотического давления имело меньшие колебания и к 72 ч. оказалась чрезвычайно низкой. Таким образом, изменение концентрации отдельных кислых аминокислот и их амидов коррелирует с ростовыми процессами. Сохраняется подобная тенденция и для динамики гидрофильных нейтральных аминокислот (табл.). Выделение сер, гли, ала и тре в контроле и при 5 атм. происходит в первые сутки, а ко вторым суткам данные аминокислоты включаются в обмен и концентрация их падает. При повышении осмотического давления раствора до 10 атм. в первые 24 ч. от начала прорастания количество сер, гли и ала заметно уменьшалось (в 6–9 раз), однако содержание тре не изменялось. На момент 48 ч. от начала эксперимента происходило увеличение количества аминокислот этой группы, однако к 72 ч. их содержание приближалось к параметрам соответствующим сухим зерновкам (табл.).

Динамика содержания основных аминокислот характеризовалась значительным увеличением концентрации гис, максимум отмечен при 5 атм. Однако во всех пробах содержание этой аминокислоты к 72 ч. уменьшалось, особенно при 10 атм. При этом содержание арг и орнитина коррелирует друг с другом, что вероятно связано с активностью орнитинового цикла, метаболитами которого являются эти аминокислоты. Повышенное выделение ароматических аминокислот наблюдается при 5 атм. в первые сутки, особенно возрастает количество фен (концентрация увеличивается в 25 раз). К 72 часам в этих условиях эта группа аминокислот быстрее утилизируется по сравнению с контролем. Тир и фен (аминокислоты шикиматного пути) являются предшественниками многих фенольных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами и таким образом, могут обеспечивать устойчивость исследуемого злака в условиях осмотического стресса.

Из группы гидрофобных аминокислот следует отметить увеличение концентрации мет в первые сутки в контроле и при 5 атм. (в 135 и 43 раза соответственно). При 10 атм. увеличение происходит только 2,75 раз. Метионин является одной из ключевых аминокислот, выполняя центральную роль в инициации трансляции, в процессах работы C_1 -трансфераз, в обмене серина, глицина, цистеина. Таким образом, осмотическое давление в 10 атм. значительно замедляет синтетические процессы у исследуемого злака. Непротеиногенные аминокислоты (орнитин и таурин) являются промежуточными продуктами метаболизма протеиногенных аминокислот: орнитин образуется в орнитиновом цикле из арг, таурин – производное цис. Содержание орнитина в первые сутки от начала прорастания увеличивалось в контроле и при 5 атм., что вероятно связано с активацией процессов дезаминирования аминокислот, участвующих в энергетическом обмене, процессах распада нуклеотидов и пр. К 72 ч. от начала прорастания количество орнитина уменьшается. Динамика содержания таурина оказалась более сложной. В контроле в первые 24 ч. его количество увеличивалось, однако к 72 ч. резко уменьшалось. В условиях стресса в первые 24 ч. концентрация соединения была ниже, чем в контроле и в сухих зерновках, однако постепенно происходило увеличение его количества. Вероятно, эта аминокислота участвует в реализации адаптационных биохимических механизмов, позволяющих семенам переживать водный стресс.

Заключение

Осмотический стресс приводит к замедлению поступления воды в семя, это отражается на процессах, обеспечивающих переход к запуску роста. Изучение динамики свободных аминокислот у *S. krylovii* показало, что осмотический стресс при 10 атм. существенно замедляет выделение протеиногенных аминокислот. Это в свою очередь выражается в замедлении прорастания и уменьшении всхожести семян.

ЛИТЕРАТУРА

- Галанин А. В.* Флора Даурии. Том II. Злаки, Ирисовые (Poaceae, Iridaceae). – Владивосток: Дальнаука, 2009. – С. 119–120.
- Касьянова Л. Н.* Экология растений Прибайкалья (водный обмен). – М.: Наука, 2004. – 288с.
- Кузнецов В. В., Шевякова Н. И.* Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений, 1999. – Т. 46. – С. 321–336.
- Назарова Г. Д., Илли И. Э., Половинкина С. В., Парыгин И. Э.* Методическое пособие для лабораторных занятий студентов агрономического факультета. – Иркутск: ИрГСХА, 2005. – С. 96–98.
- Хелдт Г. В.* Биохимия растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – С.234–246.
- Яхин О. И., Лубянов А. А., Калимуллина З. Ф., Батраев Р. А.* Влияние регуляторов роста на стресс-индуцированное накопление свободных аминокислот в растениях пшеницы // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2012. – Т. 33, № 11. – С. 38–40.
- Hammer Ø., Harpe D. A. T., Ryan P. D.* PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // Palaeontologia Electronica, 2001. – Vol. 4, №1. – 9 p.
- Teerlink T.* Plasma amino acids determined by liquid chromatography within 17 minutes // Clinical Chemistry, 1994. – Vol. 40/2. – P. 245–249.