

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ПРЕПАРАТОВ-БИОРЕГУЛЯТОРОВ ПРИ ОБРАБОТКЕ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 И.А. Шпирная¹, А.Р. Ахатова¹, В.О. Цветков¹, Л.М. Яруллина¹, М.А. Артемьева², Р.И. Ибрагимов¹

¹ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

²Филиал Московского государственного университета технологий и управления

Поступила 13.07.2011

В данной статье приведены результаты исследований действия препаратов-биорегуляторов на активность ингибиторов протеолитических ферментов в клубнях картофеля. Показано, что многократная обработка препаратами оказывает иммуностимулирующее воздействие.

Ключевые слова: картофель, ингибиторы ферментов, протеолитические ферменты, препараты-биорегуляторы, устойчивость растений.

Органическое или экологическое земледелие относится к новым перспективным формам сельского хозяйства, при котором приоритетным является сохранение природных ресурсов и естественных связей в биоценозах. Актуальной задачей является использование биологических и экологически безопасных средств, способствующих увеличению урожая и повышению устойчивости растений к различным неблагоприятным факторам среды.

В настоящее время использование различных препаратов-биорегуляторов относится к перспективному направлению биологической защиты растений [4, 14]. Иммуно- и ростстимулирующее действие таких препаратов обусловлено сбалансированным комплексом природных биологически активных веществ, обладающих элиситорными свойствами, т.е. способных взаимодействовать со специфическими рецепторами клеток растений и активировать механизмы естественной защиты растительного организма [5, 9].

Известно, что важной составляющей защитного ответа растений является образование соединений, подавляющих активность чужеродных ферментов [3, 6]. Агрессивность и патогенность микроорганизмов, насекомых – вредителей, в значительной степени определяется активностью их гидролитических ферментов, в частности, протеиназ [10]. Соответственно, высокая активность ингибиторов этих ферментов, является одним из факторов устойчивости растений к действию грибных патогенов и насекомых-вредителей [7, 8]. Искусственное регулирование уровня активности ингибиторов протеолитических ферментов в растительных тканях может служить одним из способов стимулирования естественных механизмов устойчивости растений [5, 12]. В связи с этим, исследование изменения уровня активности ингибиторов в органах и

тканях растений под действием препаратов-биорегуляторов представляет научный и практический интерес.

Целью настоящей работы являлось выявление изменений уровня активности белков ингибиторов, подавляющих действие трипсина и протеиназ личинок колорадского жука (ЛКЖ) в клубнях картофеля, обработанных препаратами-биорегуляторами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили клубни картофеля (*Solanum tuberosum*) сорта Ред Скарлетт. Покоящиеся клубни обрабатывали путем опрыскивания 0,001% -ми растворами препаратов: Циркон, Рифтал, Эпин-экстра, Фитоспорин-М. Используемая концентрация препаратов была определена по результатам предыдущих опытов как наиболее оптимальная [12].

При 1-кратной обработке клубни опрыскивали и отбирали образцы на 4-, 7-, 10-е сут. Повторную обработку клубней производили с 3-суточным интервалом, образцы для исследований отбирали после 2- и 3-кратной обработки. В качестве контроля использовали клубни, обработанные дистиллированной водой.

Для получения экстрактов с ингибирующей активностью навеску центральной части клубней гомогенизировали с кварцевым песком, экстрагировали охлажденной дистиллированной водой (1:4) в течение 1,5 ч, осадок отделяли на центрифуге MPW-310 (Польша) при 10000 об./мин, в течение 10 мин, использовали супернатант.

Ферментные препараты протеиназ выделяли из личинок колорадского жука, следующим образом: навеску замороженных личинок колорадского жука растирали с кварцевым песком, заливали дистиллированной водой в соотношении 1:4. Оставляли экстракт на 1,5 ч при 4⁰С, далее фильтровали и дважды центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин. Использовали супернатант.

Активность ингибиторов протеиназ определяли спектрофотометрически, по гидролизу синтетического субстрата БАПНА (N,α-бензоил-DL-аргинин-

Шпирная Ирина Андреевна, канд. биол. наук, e-mail: i-shia@yandex.ru; Ахатова Альбина Рашитовна, e-mail: akhatova.a@yandex.ru; Цветков Вячеслав Олегович, e-mail: zvetkovvo@rambler.ru; Яруллина Лилия Маратовна, e-mail: yarullina@bk.ru; Артемьева Мария Андреевна, e-mail: art_amp@bk.ru; Ибрагимов Ринат Исмаилович, докт. биол. наук, проф., e-mail: ibragimov56@yandex.ru

4-нитроанилид HCl [2,16] и по гидролизу желатины, иммобилизованной в агарозный гель [13]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [15]. Эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. В качестве величины погрешности использован доверительный интервал выборочного среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из факторов, определяющих характер физиологического воздействия препаратов на растение, является их состав. В связи с этим представляет интерес исследование препаратов различного происхождения и химической природы. Так, действующими веществами препаратов Циркон и Эпин-экстра являются соединения, участвующие в метаболизме растительного организма (гидроксикоричные кислоты и 24-эпибрассинолид соответственно); Фитоспорин-М является бактериальным препаратом (содержит эндофитный штамм бактерий *Bacillus subtilis* 26 Д). Данные препараты являются эффективными биорегуляторами и широко используются в растениеводстве.

На рис. 1 представлены результаты измерения трипсинингибирующей активности экстрактов клубней после обработки их препаратами. Как видно, все исследуемые препараты изменяют уровень активности ингибиторов трипсина в тканях клубней. По истечении 4 и 7 сут эксперимента (соответственно после 1- и 2-кратной обработок) уровень активности ингибиторов трипсина в клубнях значительно ниже, чем в контрольных клубнях. Однако, на 10 сут (после 3 обработок), активность ингибиторов в клубнях значительно возрастает, по сравнению с контролем более чем в 4 раза. После обработки препаратами Циркон и Фитоспорин-М активность ингибиторов в клубнях возрастает постепенно по мере повышения числа обработок. Действие препарата Эпин-экстра отличается от действия других исследуемых препаратов. Видно, что 1-кратная обработка клубней этим препаратом вызывает резкое снижение уровня ингибиторной активности в них, при 3-кратной обработке наблюдается резкое повышение этого показателя по сравнению с другими вариантами опыта (рис., А). Можно предположить, что степень физиологического эффекта препаратов обуславливается их химической природой.

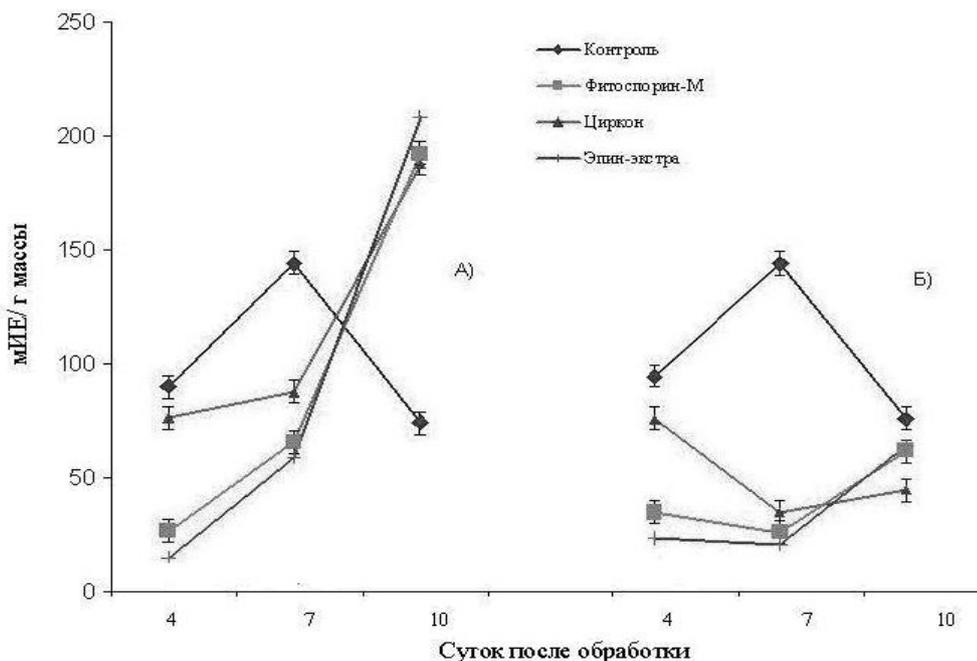


Рис. Активность ингибиторов трипсина в клубнях картофеля при обработке препаратами-биорегуляторами. А) – повторные обработки, Б) – однократная обработка.

Примечательно, что в контрольном варианте наблюдалось значительное понижение активности ингибиторов трипсина со временем. Возможно, это связано с тем, что прорастающие клубни характеризуются снижением ингибиторов протеиназ в тканях, поскольку эти белки активно транспортируются в проростки (глазки) [1].

В дальнейшем исследовали динамику изменений ингибиторной активности в клубнях после однократной обработки препаратами (рис., Б). Как видно, в отличие от предыдущего эксперимента,

активность ингибиторов трипсина в обработанных клубнях не превышает значений контрольного варианта. Можно предположить, что в этом случае препараты оказывают на прорастающие клубни стрессовое воздействие. Исходя из полученных результатов, в течение 7 сут после 1-кратной обработки мы наблюдаем начальную фазу стрессовой реакции, которая в наших опытах проявляется в снижении уровня активности ингибиторов трипсина. На 10 сут, по-видимому, в клубнях активируются механизмы, повышающие их устойчивость к

стрессовым факторам (фаза резистентности), что проявляется повышением ингибиторной активности до уровня контрольного варианта.

Как было отмечено, в экспериментах с повторными обработками повышение активности ингибиторов трипсина в клубнях наблюдается уже на 7 сут (после второй обработки). По-видимому, первичная обработка препаратами является для растительного организма стрессом, который вызывает комплекс неспецифических ответных реакций, и проявляется, в частности, понижением уровня активности ингибиторов протеолитических ферментов. Последующие обработки включают адаптационные механизмы растений к стрессовому воздействию. Соответственно, повышенный уровень ингибиторной активности после 3 обработок может рассматриваться как эффект сенсibilизации тканей клубней, с последующей иммуностимуляцией

растений картофеля. Известно, что для достижения состояния сенсibilизации клубней картофеля необходим достаточно длительный промежуток времени, в течение которого происходит перестройка ультраструктурного аппарата клетки [9]. В наших экспериментах данный эффект начинает проявляться после 2-й обработки (на 7 сут). Проявление эффекта сенсibilизации указывает на то, что повторная обработка препаратами может выступать для растительного организма в качестве эустресса – стимулирующего, мобилизующего стресса [11].

По аналогичной схеме были проведены эксперименты по определению активности ингибиторов протеолитических ферментов ЛКЖ из тканей обработанных клубней.

Обработка клубней картофеля препаратами-биорегуляторами изменяет активность ингибиторов протеиназ ЛКЖ (табл.).

Таблица. Активность ингибиторов протеиназ ЛКЖ в клубнях картофеля при обработке препаратами-биорегуляторами (субстрат желатина)

Варианты опыта	1*		2**		3***	
	ИЕ/г массы	ИЕ/мг белка	ИЕ/г массы	ИЕ/мг белка	ИЕ/г массы	ИЕ/мг белка
Контроль (вода)	10,8 ± 1,95	14,82 ± 3,07	6,69 ± 1,07	9,18 ± 3,1	0,94 ± 0,07	1,15 ± 0,08
Фитоспорин-М	9,81 ± 0,6	12,95 ± 1,33	6,14 ± 3,14	8,45 ± 4,54	2,22 ± 0,18	3,22 ± 0,27
Циркон	11,31 ± 0,96	15,18 ± 0,3	7,75 ± 1,2	9,69 ± 0,64	1,39 ± 0,1	1,8 ± 0,14
Эпин-экстра	6,68 ± 2,1	8,15 ± 2,56	7,75 ± 1,2	9,14 ± 0,64	1,48 ± 0,06	1,83 ± 0,1

Прим.: 1- 4; 2- 7; 3- 10 сут после обработки; * - одно-, **двух-***- трехкратная обработка препаратами

Уровень активности изучаемых ингибиторов в вариантах с Фитоспорином и Цирконом на 4 сут выявляется на уровне контрольного варианта. Обработка Эпином приводит к снижению ингибиторной активности. На 7 сут (после 2-й обработки) в клубнях, обработанных Эпином-экстра, происходит повышение активности ингибиторов протеиназ ЛКЖ.

Ингибиторная активность в клубнях, обработанных Цирконом, на протяжении всех экспериментальных дней превышает значения контроля.

Из результатов видно, что иммунизирующий эффект препаратов (по активности ингибиторов ЛКЖ) проявляется менее интенсивно, по сравнению с предыдущими опытами (по активности ингибиторов трипсина).

Мы предполагаем, что это связано с высокой степенью молекулярной и физиологической гетерогенности протеолитических ферментов колорадского жука. По-видимому, спектр протеиназ ЛКЖ включает различные типы ферментов, в т.ч. способных гидролизовать защитные белки клубней.

Таким образом, обработка клубней картофеля препаратами-биорегуляторами оказывает влияние на активность соединений ингибирующих действие трипсина и протеиназ ЛКЖ.

Однократная обработка снижает уровень активности ингибиторов трипсина, повторная

обработка клубней приводит к повышению данной активности.

Обнаруженный нами эффект повышения антипротеолитической активности в тканях может рассматриваться как один из механизмов повышающих неспецифическую устойчивость растений к биотическим факторам, прежде всего к патогенным организмам и насекомым-вредителям.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы (ГК № 16.740.110061); ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК № 16.512.11.2014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альсмин П.И., Амбросов А.Л., Вечер А.С. Физиология картофеля /под ред. Б.А. Рубина. М.: Колос, 1979. 272 с.
2. Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибитора трипсина в семенах гороха // Прикладная биохимия и микробиология. 1975. № 5. С. 777-783.
3. Дьяков Ю.Т., Озерцовская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 2005. 300 с.
4. Захаренко В.А. Современная защита растений и её научное обеспечение // Агро XXI. 2003. № 1-6. С. 34-36.
5. Ибрагимов Р.И., Ямалеева А.А., Талипов Р.Ф. и др. Физиолого-биохимические механизмы действия экологически безопасных препаратов для

- растениеводства // Успехи соврем. естествознания. 2003. № 10. С. 38-39.
6. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. Уфа: Гилем, 2006. 232 с.
7. Ибрагимов Р.И., Яруллина Л.Г., Шпирная И.А. и др. Биохимические факторы развития устойчивости растений к патогенам // Современные наукоемкие технологии. 2010. № 4. С. 46-48.
8. Конарев А.В. Ингибиторы протеиназ и устойчивость картофеля к колорадскому жуку // Современные системы защиты и новые направления в повышении устойчивости картофеля к колорадскому жуку. М.: Наука, 2000. С. 35-40.
9. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. Как растения защищаются от болезней. М.: Наука, 1985. 192 с.
10. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 3. С. 261-282.
11. Чиркова Т.М. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд. СПбГУ, 2002. 244 с.
12. Шпирная И.А., Артемьева М.А., Ибрагимов Р.И. Изменение активности ингибиторов трипсина в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) при обработке препаратом «Рифтал» // Актуальные проблемы ботаники и экологии: Материалы междунар. конф. Симферополь: ВД «Ариал». С. 436-438.
13. Шпирная И.А., Умаров И.А., Шевченко Н.Д., Ибрагимов Р.И. Определение активности гидролаз и их ингибиторов по гидролизу субстрата в геле агарозы // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 497-501.
14. Штерншис М.В. Роль и возможности биологической защиты растений // Защита и карантин растений. 2006. № 6. С. 14-18.
15. Bradford M.M. A rapide and sensetive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 172. № 1. P. 248-254.
16. Erlanger B.F., Kokowski N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271-278.

IMMUNOSTIMULATING EFFECT OF BIOREGULATING DRUGS AT PROCESSING OF POTATO TUBERS

© 2011 I.A. Shpirnaya¹, A.R. Akhatova¹, V.O. Tsvetkov¹, L.M. Yarullina¹, M.A. Artemyeva¹, R.I. Ibragimov¹

¹Bashkir State University, Ufa

²Branch of Moscow State University of Technology and Management

In this article described a results of researches of bioregulating drugs effect on activity of proteolytic enzymes inhibitors on potato tubers. It's shown, that multiple drugs processing has an immunostimulating effect.

Key words: potato, enzymes inhibitors, proteolytic enzymes, bioregulating drugs, plant resistance.

Shpirnaya Irina Andreevna, Candidate of Biology, e-mail: i-shia@yandex.ru; Akhatova Albina Rashitovna, e-mail: akhatova.a@yandex.ru; Tsvetkov Vyacheslav Olegovich, e-mail: zvetkovvo@rambler.ru; Yarullina Lilia Maratovna, e-mail: yarullina@bk.ru; Artemyeva Maria Andreevna, e-mail: art_amp@bk.ru; Ibragimov Rinat Ismagilovich, Doctor of Biology, Professor, e-mail: ibragimov56@yandex.ru.