

УДК 581.1

СТЕВИОЗИД КАК АНТИСТРЕССОВЫЙ РЕГУЛЯТОР РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

©2013 А.Л. Михайлов, Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань

Поступила 18.06.2013

Изучена способность дитерпенового гликозида стевиозида повышать устойчивость к низким температурам и тяжелым металлам проростков озимой пшеницы сорта Мироновская 808. Проведены полевые испытания стевиозида в качестве регулятора роста и развития яровой пшеницы Омская 33

Ключевые слова: стевиозид, регулятор роста и развития растений, пшеница, морозоустойчивость, тяжелые металлы.

Исследование биологической активности вторичных метаболитов растений имеет важное научное и прикладное значение для поиска и создания на их основе новых полифункциональных регуляторов роста, обладающих как рострегулирующей, так и антистрессовой активностью. К таким биологическим соединениям относятся сладкие дитерпеноидные гликозиды растения *Stevia rebaudiana* Bertoni, агликоном которых является стевиол (13-гидрокси-энт-каур-16-ен-19-овая кислота) [1]. Стевиол относили к предшественникам гибберелловой кислоты благодаря характерному для гиббереллинов цис-сочленению В и С колец тетрациклической углеводородной системы. Однако было установлено, что грибок *Gibberelle Fujikuroi* не превращает стевиол в гибберелловую кислоту, а метаболизирует его в гиббереллино-подобное соединение [2]. В литературе есть сведения о том, что производные стевиол-гликозидов проявляют гиббереллиноподобную активность [3]. В связи с возрастающим техногенным загрязнением сельскохозяйственных экосистем тяжелыми металлами актуальным становится использование экологически безопасных регуляторов роста и физиологически активных веществ, способных не только уменьшать токсические эффекты тяжелых металлов, но и снижать их поступление в растения. В связи с этим целью данной работы было выявление протекторных свойств гиббереллиноподобного дитерпеноидного гликозида стевиозида на растения озимой пшеницы при действии низких температур и тяжелых металлов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения озимой пшеницы сорта Мироновская 808 и яровой пшеницы сорта Омская 33. Исследуемые дитерпеновые гликозиды были синтезированы в ИОФХ им. А.Е. Арбузова (КНИЦ РАН, г. Казань). Растения выращивали в лабораторных условиях в кюветах на водопроводной воде при освещении 100 Вт/м² и 12-

часовом фотопериоде при температуре 23⁰С в течение 9 сут. В опытных вариантах растения росли на растворе стевиозида (10⁻⁸М). Затем 5-суточные растения переносили на растворы тяжелых металлов CdSO₄ и ZnSO₄ в концентрации 10мкМ и 1мМ. Концентрации стевиозида и тяжелых металлов были подобраны в предварительных экспериментах.

Растворимые лектины экстрагировали 0.05н HCl, лектины клеточной стенки – 0.05% раствором тритона-X-100. Лектиновую активность определяли с помощью реакции гемагглютинации с эритроцитами 1 группы крови [4]. Белок определяли по методу Bradford [5]. Морозоустойчивость тестировали по выходу электролитов [6].

Содержание тяжелых металлов анализировали в корнях и листьях проростков масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Elan DRC II (PerkinElmer, США). Опыты проводили в 3-х биологических повторностях. Результаты опытов представлены на рисунках и в таблицах как средние арифметические и их стандартные ошибки.

Мелкоделяночные опыты были проведены в СПХК «Агрофирма «Рассвет» Кукморского района Республики Татарстан. Опрыскивание растений стевиозидом (10⁻⁸М) проводили с помощью ранцевых опрыскивателей. Сроки опрыскивания яровой пшеницы – в начале фазы выхода в трубку и в фазе кущения. При постановке мелкоделяночных опытов каждый вариант закладывали в четырехкратной повторности. Для учета структуры урожая на каждой делянке закладывали по две метровые площадки, с которых собирали снопы и проводили анализ. Биометрические показатели и площадь листьев определяли по [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований нами было выявлено соединение, обладающее наибольшей антистрессовой активностью у растений озимой пшеницы Мироновская 808. Для этого определяли LT₅₀ у проростков, выращенных на растворах стевиозида (10⁻⁸М) и его производных: стевиола (10⁻⁸М), дигидростевиола (10⁻⁸М), стевиолбиозида (10⁻⁸М) и бис(дигидростевиоил)малоната (10⁻⁸М).

Как видно из таблицы 1, все изучаемые соеди-

Михайлов Александр Леонидович, аспирант, e-mail: nuu76@mail.ru; Невмержицкая Юлия Юрьевна, к.б.н., доцент, e-mail: nuu76@mail.ru; Тимофеева Ольга Арнольдовна, д.б.н., зав. кафедрой, e-mail: olga.timofeeva@kpfu.ru

нения повышали морозоустойчивость растений по сравнению с контролем. Эффект производных стевиозида на морозоустойчивость проростков сравним с АБК (LT_{50} проростков пшеницы до $-7.6^{\circ}C$) [8], а действие самого стевиозида даже несколько превышало влияние АБК (LT_{50} до $-8^{\circ}C$).

Выращивание растений озимой пшеницы на растворе стевиозида ($10^{-8}M$) вызывало увеличение длины листьев проростков на 14%, а корней – на 18% по сравнению с контролем (табл. 2). Как высокая (1мМ), так и низкая (10мкМ) концентрации $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ уменьшали длину корней и листьев проростков озимой пшеницы (табл. 2).

Известно, что торможение роста является общим проявлением токсичности тяжелых металлов для растений, что связано в первую очередь с их прямым действием на деление и растяжение клеток [9]. Согласно нашим данным, наибольшее токсическое действие на рост растений пшеницы оказывает кадмий.

Модификация действия тяжелых металлов на культурные растения при применении различных регуляторов роста показана в ряде работ [10]. Пре-

добработка стевиозидом растений Мироновской 808 в течение 5 сут снизила ингибирующий эффект обеих концентраций сульфата кадмия и сульфата цинка на рост проростков (табл. 2).

Анализ накопления металлов в проростках через 4 сут выращивания на средах с тяжелыми металлами показал (табл. 3), что и в корни, и в листья тяжелые металлы поступали в заметных количествах уже при концентрации солей 10 мкМ. В корнях содержание тяжелых металлов было значительно выше по сравнению с листьями. Известно, что корни являются первым барьером на пути транспорта металлов из почвы в растение, и именно корень берет на себя основную функцию по их аккумуляции и детоксикации. Способность корней задерживать тяжелые металлы снижает их транспорт в надземные органы растений [9]. Предварительная обработка растений стевиозидом ($10^{-8}M$) вызвала увеличение содержания Cd в корнях проростков озимой пшеницы при концентрации этого металла в среде выращивания 1мМ, во всех остальных вариантах стевиозид снизил аккумуляцию тяжелых металлов в корнях и листьях (табл. 3).

Таблица 1. Влияние стевиозида и его производных на показатель LT_{50}

Вариант	$LT_{50}, ^{\circ}C$
H ₂ O	-6.2 ± 0.2
Стевиозид ($10^{-8} M$)	-8.0 ± 0.2
Стевиол ($10^{-8} M$)	-7.4 ± 0.1
Дигидростевиол ($10^{-8} M$)	-6.9 ± 0.3
Стевиолбиозид ($10^{-8} M$)	-7.3 ± 0.1
Бис(дигидростевиол)малонат ($10^{-8} M$)	-7.5 ± 0.1

Таблица 2. Влияние стевиозида на длину корней и первых настоящих листьев 9-суточных проростков озимой пшеницы Мироновская 808

Вариант	H ₂ O		Стевиозид	
	Длина листьев, мм	Длина корней, мм	Длина листьев, мм	Длина корней, мм
Контроль	159 ± 2.0	90 ± 2.3	180 ± 2.1	107 ± 3.3
$CdSO_4$ (1 мМ)	69 ± 2.5	45 ± 3.8	100 ± 3.5	67 ± 2.7
$CdSO_4$ (10 мкМ)	129 ± 1.5	64 ± 2.5	134 ± 3.0	71 ± 1.7
$ZnSO_4$ (1 мМ)	133 ± 2.7	73 ± 1.5	141 ± 2.3	87 ± 2.5
$ZnSO_4$ (10 мкМ)	157 ± 3.5	76 ± 1.5	172 ± 1.8	98 ± 3.1

Таблица 3. Содержание тяжелых металлов в корнях и листьях проростков озимой пшеницы Мироновская 808 (% от сухого веса)

вариант	-стевиозид			+стевиозид		
	H O	Me (1Мм)	Me (10мкМ)	H O	Me (1мМ)	Me (10мкМ)
Корни						
Cd	$0,0002 \pm \pm 0,00001$	$0,7050 \pm \pm 0,01000$	$0,1750 \pm \pm 0,00400$	$0,0003 \pm \pm 0,00001$	$0,7450 \pm \pm 0,04000$	$0,1520 \pm \pm 0,00500$
Zn	$0,0025 \pm \pm 0,00080$	$0,8828 \pm \pm 0,06000$	$0,4404 \pm \pm 0,00400$	$0,0150 \pm \pm 0,00007$	$0,3080 \pm \pm 0,01000$	$0,0541 \pm \pm 0,07000$
Листья						
Cd	$0,0001 \pm \pm 0,00001$	$0,0090 \pm \pm 0,00030$	$0,0045 \pm \pm 0,00004$	$0,0002 \pm \pm 0,00001$	$0,0010 \pm \pm 0,00050$	$0,0026 \pm \pm 0,00040$
Zn	$0,0050 \pm \pm 0,00050$	$0,0183 \pm \pm 0,00400$	$0,0069 \pm \pm 0,00001$	$0,0045 \pm \pm 0,00080$	$0,0133 \pm \pm 0,00030$	$0,0066 \pm \pm 0,00001$

Действие регуляторов роста, прежде всего, осуществляется через изменения в синтезе и активности различных белков. В литературе имеются сведения о наличии у молекул растительных лектинов сайтов связывания фитогормонов, отличных от центров связывания углеводов. Так, агглютинин зародыша пшеницы (АЗП) обладает высоким сродством к ауксинам, цитокининам и гибберелловой кислоте [11]. Исследователи полагают, что комплекс «лектин-фитогормон» является не только транспортной формой гормонов, но и может быть вовлечен в регуляцию процессов роста и развития растений [11]. В связи с этим мы определяли активность лектинов у растений, выращенных на среде с добавлением тяжелых металлов и стевиозида (10^{-8} M) (рис. 1, 2).

Тяжелые металлы снижали активность лектинов клеточной стенки (рис. 1). Эти изменения могут быть следствием как адсорбции тяжелых металлов в клеточных стенках корней [9], так и взаимодействием ионов металлов с сульфгидрильными группами белков, приводящим к ингибированию их активности и/или разрушению структуры [12].

В то же время $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ вызывали значительное возрастание активности растворимых лектинов (рис. 2), под которыми мы понимаем, прежде всего, агглютинин зародыша пшеницы. В работе [13] было показано увеличение содержания АЗП в корнях проростков пшеницы при воздействии ацетата кадмия, сопровождающееся усилением выхода этого лектина в окружающую среду.

После предварительной обработки растений в течение 5 сут стевиозидом (10^{-8} M) эффект тяжелых металлов на активность лектинов клеточной стенки был сходен с изменениями ростовых параметров – на фоне стевиозида восприимчивость связанных с клеточной стенкой лектинов к $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ уменьшалась (рис. 1). Активность растворимых лектинов при совместном действии стевиозида и тяжелых металлов значительно подавлялась (рис. 2). В настоящее время практически отсутствуют сведения о механизмах действия стевиозида, однако в экспериментах с животными показано, что этот гликозид является антагонистом кальция и уменьшает проницаемость кальциевых каналов [14]. Можно предположить, что именно таким образом стевиозид изменяет поглощение и транспорт Cd и Zn в клетках корня.

Таким образом, согласно проведенному нами исследованию стевиозид (10^{-8} M) снижал аккумуляцию кадмия и цинка в проростках, уменьшал эффект тяжелых металлов на рост растений и изменения активности лектинов, что свидетельствует о его протекторном действии на растения озимой пшеницы в условиях стресса, вызываемого тяжелыми металлами. В связи с этим в следующей части нашей работы нами были проведены полевые

испытания стевиозида в качестве регулятора роста и развития растений.

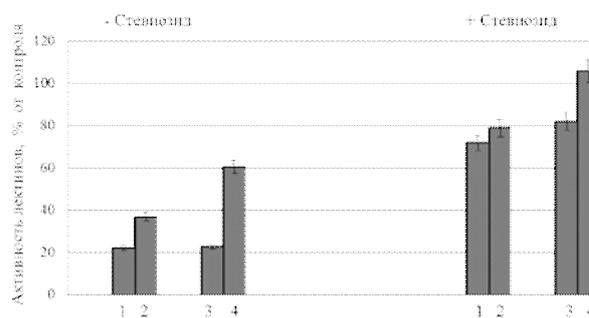


Рис. 1. Влияние $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ на активность лектинов клеточной стенки в предварительно обработанных стевиозидом (10^{-8} M) (+Стевиозид) и необработанных стевиозидом (-Стевиозид) корнях проростков озимой пшеницы сорта Мироновская 808: 1 – $CdSO_4$ (1mM), 2 – $ZnSO_4$ (1mM), 3 – $CdSO_4$ (10µM), 4 – $ZnSO_4$ (10µM)

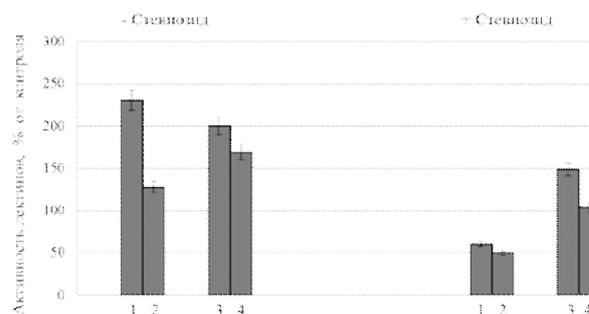


Рис. 2. Влияние $CdSO_4$ и $ZnSO_4$ на активность растворимых лектинов в предварительно обработанных стевиозидом (10^{-8} M) (+Стевиозид) и необработанных стевиозидом (-Стевиозид) корнях проростков озимой пшеницы сорта Мироновская 808: 1 – $CdSO_4$ (1mM), 2 – $ZnSO_4$ (1mM), 3 – $CdSO_4$ (10µM), 4 – $ZnSO_4$ (10µM)

По результатам мелкоделяночных опытов, опрыскивание растений яровой пшеницы стевиозидом (10^{-8} M) в начале фазы выхода в трубку и в фазе кущения повысило урожайность на 4,02 ц/га или 15% (контроль – 26,8 ц/га, опыт – 30,82 ц/га) (табл. 4). Полученная прибавка урожая обусловлена в значительной степени увеличением массы зерен в колосе, а также озерненности колоса. При этом стевиозид практически не влиял на количество продуктивных стеблей и число колосков в колосе.

В процессе вегетации растения варианта, обработанного стевиозидом, отличались более высоким ростом: в фазу выхода в трубку высота опытных растений была выше на 6,82 %, в фазу колошения – на 26,95% по сравнению с контролем (табл. 5). Площадь листьев растений опытного варианта была на 10,2% больше в фазу выхода в трубку и на 12,9% больше в фазу колошения по сравнению с контрольными растениями. Под влиянием стевио-

зида особенно значительно увеличился сухой вес растений в фазу колошения: на 38% по сравнению с контролем. При этом сухой вес увеличился на 6,47%, а содержание воды в растениях – на 60%. Содержание белка и фотосинтетических пигментов под влиянием стевиозида не изменилось. По-видимому, увеличение высоты растений и площади листовой поверхности, более эффективное накоп-

ление сухой массы способствовало в конечном итоге формированию более крупных зерен и формированию более озерненного колоса.

Таким образом, согласно проведенным полевым испытаниям на растениях яровой пшеницы Омская 33, установлена эффективность применения стевиозида в качестве регулятора роста.

Таблица 4. Величина и структура урожая яровой пшеницы Омская 33

Вариант	Количество продуктивных стеблей, шт/м ²	Высота растений, см	Длина колоса, см	Количество колосков в колосе	Количество зерен в колосе	Вес зерна в колосе, г	Вес зерна со снопа, г	Масса 1000 зерен, г	Урожайность, ц/га
контроль	393± ±0,06	81± ±0,04	8,2± ±0,01	15,35± ±0,03	24,98± ±0,05	0,75± ±0,01	271,45± ±0,06	34,93± ±0,06	26,8± ±0,05
стевиозид (10 ⁻⁸ М)	409± ±0,07	92,45± ±0,05	8,9± ±0,02	16,2± ±0,04	30,15± ±0,06	1,03± ±0,01	306,2± ±0,05	34,06± ±0,05	30,82± ±0,06

Таблица 5. Биометрические показатели яровой пшеницы Омская 33

	площадь листьев, мм ²	высота растений, см	масса растений, г		Содержание воды, г	содержание белка, мг/г	Содержание фотосинтетических пигментов, % массы сырых листьев			
			сырая	сухая			хл. a	хл. b	хл. a+ хл. b	каротиноиды
Фаза выхода в трубку										
Контроль	5875,20 ±0,09	70,60± 0,04	5,73± 0,05	1,74± 0,01	3,99± 0,05	1226± 0,06	14,39± 0,06	5,34± 0,01	19,7± 0,06	4,63± 0,01
Стевиозид	6275,70 ±0,1	77,80± 0,02	6,07± 0,03	1,76± 0,01	4,31± 0,03	1441± 0,07	14,67± 0,07	5,94± 0,02	20,6± 0,04	6,71± 0,01
Фаза колошения										
Контроль	2605,26 ±0,1	96,80± 0,05	4,15± 0,04	1,70± 0,02	2,45± 0,02	1071± 0,04	15,17± 0,05	5,21± 0,01	20,28± 0,04	4,35± 0,02
Стевиозид	3307,46 ±0,1	108,50± 0,04	5,73± 0,05	1,81± 0,03	3,92± 0,03	1166± 0,03	15,48± 0,06	5,25± 0,01	20,73± 0,05	4,41± 0,03

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Катаев В.Е., Хайбуллин Р.Н., Шарипова Р.Р., Стробыкина И.Ю. Дитерпеноиды и гликозиды энт-кауранового ряда: выделение, свойства, химическая трансформация // Обзорный журнал по химии. 2011. Т. 1. № 1. С. 99-167.
2. Ruddat M., Neftman E., Lang A. Conversion of steviol to a gibberellin-like compound by *Fusarium moniforme* // Arch. Biochem. Biophys. 1965. V. 111. P. 187-190.
3. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю., Мифтахова И.Г., Стробыкина А.С., Михайлов А.Л., Стробыкина И.Ю., Миронов В.Ф. Производные дитерпеноида стевиозида регулируют рост и повышают морозоустойчивость озимой пшеницы // Доклады Академии наук. 2010. Т. 435. № 2. С. 282-285.
4. Тимофеева О.А. Лектины как активные компоненты адаптивных реакций озимой пшеницы к неблагоприятным условиям среды: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Уфа, 2009. 38 с.
5. Bradford M.A. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.
6. Uemura M., Steponkus P.L. Parallel Effects of Freezing and Osmotic Stress on the ATPase Activity and Protein Composition of the Plasma Membrane of Winter Rye Seedlings //

- Plant Physiol. 1989. V. 91. N 3. P. 961-969.
7. Третьяков Н.Н., Карнаухова Т.В., Паничкин А.А. и др. Практикум по физиологии растений. М.: Агропромиздат, 1990. 271 с.
 8. Хохлова Л.П., Олиневич О.А., Тараканова Н.Ю., Тимофеева О.А., Воловник И.Л., Палих Э., Раудаскоски М. Цитоскелет-зависимые изменения водного статуса и морозоустойчивости разных генотипов озимой пшеницы // Грани сотрудничества. К 10-летию Соглашения о сотрудничестве между Казанским и Гиссенским университетами: Сб. научн. статей и обз. материалов. Казань: Унипресс. 1999. С. 275-298.
 9. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 172 с.
 10. Башмаков Д.И., Пыненкова Н.А., Сазанова К.А., Лукаткин А.С. Влияние синтетического регулятора роста цитодеф и тяжелых металлов на окислительный статус растений огурца // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 1. С. 67-73.
 11. Bogoeva V.P., Radeva M.A., Atanasova L.Y., Stoitsova L.Y., Boteva R.N. Fluorescence analysis of hormone binding activities of wheat germ agglutinin // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1698. N 2. P. 213-218.
 12. Van Assche F., Clijsters H. Effect of metals on enzyme activity in plants // Plant Cell Environ. 1990. V. 13. P. 195-206.
 13. Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Лубянова А.Р., Мурзабаев А.Р., Федяев В.В., Шакирова Ф.М. Участие лектина в формировании устойчивости пшеницы к токсическому действию кадмия // Физиол/ раст. 2011. Т. 58. № 6. С. 907-914.
 14. Melis M.S. Influence of calcium on the blood pressure and renal effects of Stevioside // Braz. J. Med. Biol. Res. 1992. V. 25. N 9. P. 943-949.

STEVIOSIDE AS ANTI-STRESS CONTROL OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF PLANTS

©2013 A.L. Mikhaylov, Yu.Yu. Nevmerzhitskaya, O.A. Timofeeva

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

The ability of diterpene glycoside stevioside to increase resistance to low temperatures and heavy metals of sprouts of winter wheat of a grade Mironovskaya 808 are studied. Field tests of stevioside as a growth regulator and development of spring wheat Omskaya 33 are conducted.

Keywords: *stevioside, a regulator of growth and development of plants, wheat, frost and heavy metals.*