

ӘОЖ: 631.811.98

А.С. Есиббаева*, С.А. Ибрагимова, Е.Ю. Гуккенгеймер,
Э.А. Букенова, С.М. Гильманова

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, г. Алматы
Экология мәселелері ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: arailim_29@mail.ru

Бидайдың стресске төзімділігін арттыратын фузикококцинді микротыңайтқыштың әсерін зерттеу

Біз ұсақ жапырақты кара ағаштың жасыл ұрықтарынан гидрофобты хроматография арқылы МТП алдық. МТП-ның фузикококцин белсенділіктері: бидайдың ұрықсыз бөлігінде Н+АТФ – азы мен NADPH-ГДГ - нің активтендіру МТП-ң қабілеті көрсетіліп, оның фузикококцин белсенділігі дәлелденді. МТП-ның бидай өскіндерінің суыққа төзімділігін арттыруына қабілеті көрсетілді. Осыған орай МТП-ның бидай өскіндерінің тұзға да төзімділігін арттыратын қабілеті анықталды.

Түйін сөздер: бидай дәндері, төзімділік, тұзды стресс жағдайы.

А.С. Есиббаева, С.А. Ибрагимова, Е.Ю. Гуккенгеймер, Э.А. Букенова, С.М. Гильманова

Изучение свойств фузикококцинового микроудобрения повышающего стрессоустойчивость пшеницы

Из зеленых крылаток Вяза мелколистого методом гидрофобной хроматографии был выделен и очищен препарат микроудобрения (ПМУ). Было установлено, что ПМУ активизирует Н+АТФ – азу плазматических мембран и NADPH-ГДГ из беззародышевых половинок зерна пшеницы. Такой же способностью из всех фитогормонов обладает только фузикококцин. Установлено, что ПМУ существенно повышает устойчивость проростков пшеницы к низкотемпературному и солевому стрессам.

Ключевые слова: семена пшеницы, устойчивость, солевой стресс.

A.S. Esibbaeva, S.A. Ibragimova, E.U. Gukkengeimer, E.A. Bukenova, S.M. Gilmanova

Study of properties of the fusicoccin-like microfertilizer which increases the tolerance of the wheat to stress conditions

Of green seymon of the ulmus parvifolia by hydrophobic chromatography was isolated and purified preparation of microfertilizer (PMF). It has been found that PMF activated the Н+ АТФ – ase of plasmatic membrane of none-embryos part of wheat green and NADPH-GDH of the none-embryos part of wheat green. This ability has only fusicoccin but not any user phytohormones. It was found that PMF significantly increases the tolerance to low temperature to salt stresses.

Key words: wheat seeds, stability, salt stress.

Біздің Қазақстанда дәнді дақылдарды өсіру киын климаттық жағдайда жүргізіледі. Себебі көктем мен күзде солтүстіктен қатты салқындықтар келеді, ал жазда жауынсыз тым ыстық күндер көп болады. Соның бәрі дәнді дақылдардың өнімділігін күрт азайтады. Сол катал климаттың әсерлерін жұмсарту үшін қазіргі заманда дамыған елдерде эффективті биореттегіштерді кең қолданады [1-3]. Бірақ біздің елімізде сондай биореттегіштерді әлі қолданбайды. Осы себептен абиотикалық стресс

жағдайларды жұмсартатын биореттегіштерді шығару біздің ғылымымыздың өте маңызды мақсаты болып табылады. Осыған орай біздің жұмысымыздың мақсаты – ол фузикококцин тәрізді микротыңайтқышты тазарту әдісін шығару және оның бидайдың стресске төзімділігін арттыратын әсерін зерттеу.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Біздің жұмысымыздың объектісі ол-фузикококцинге жататын микротыңайтқыш. Жұмыста келесі материалдарды қолдандық:

ұсақ жапырақты қара ағаштың жасыл ұрықтары (*Ulmus parvifolia*), жұмсақ бидайдың (*Triticum aestivum*) «Стекловидная-24» сортының дәндері мен өскіндері.

NADPH-ГДГ-нің белсенділігін анықтайтын спектрофотометрлік әдісін осы әдебиеттен табуға болады [4]. Глютаматдегидрогеназа белсенділігін Ultraspec-1100, Bioscience фирмасы (Ұлыбритания) спектрофотометр қондырғысымен жүргіздік. Белсенділігін 340 нм толқын ұзындығының адсорбциясының өзгеруін 1 минут аралығында анықтадық. Реакцияның қоспасы: 130 мкМ NADPH, 5 мкМ – аммоний сульфаты және 15 мМ – 2-оксоглутарат болды және 0,05 М трис-глицин буфері рН-8.3 кварц кюветаның 2 мл. дейін толтырылады. Ферменттің бірлігін санау үшін біз NADPH молярлық коэффициенті 6200 адсорбциялық бірлік деп санаймыз және ферменттің бірлігі ол қанша мкМ NADP 1 минуттың ішінде түзілетіні 1 мг протейнге саналады.

Плазматикалық мембраналарды ұрықсыз бидай дәндерінен келесі әдіспен алдық [5]. Н + АТФ-азының белсенділігі ол қанша мкМ фосфат түзілуімен анықталады [6]. Микротыңайтқышты тазарту үшін біз Фармация фирмасының (Швеция) CL 4B октилсефарозасындағы гидрофобтық хроматографияны қолдандық. Сол хроматографиясының элюциясын бақылау үшін біз Isco фирмасының (АҚШ) Teledyne UV 6 мониторын қолдандық. Протеин мөлшерін Бредфорд әдісімен анықтадық [7].

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Үлкен ізденіс жұмыстарының нәтижесінде ұсақ жапырақты қара ағаштың (*Ulmus parvifolia*) жасыл ұрықтарында біз фузикоциннің бар екенін дәлелдедік. Сол затты тазарту үшін біз жаңа әдісін шығардық. Сол әдіс бойынша қара ағаштың жасыл ұрықтарын 80 % этанолда гомогенизацияладық. Алынған гомогенатты 10000 x g үдеуінде 10 минут ішінде центрифугаладық. Алынған спирт экстрактын гидрофобты гель-хроматографиямен тазарттық. Алынған нәтиже 1-ші суретте көрсетілген. Тазартылған фузикоцин 50% этанолмен калонкадан шығады. Тазартылған фузикоцинді МТП-ы ары қарай зерттеуге алынды. Ең алдымен біз тазартылған МТП-ның фузикоцин белсенділігін анықтауға кірістік.

Қорыта келгенде, жүргізілген тазарту нәтижесінде жоғары тазартылған МТП алынды.

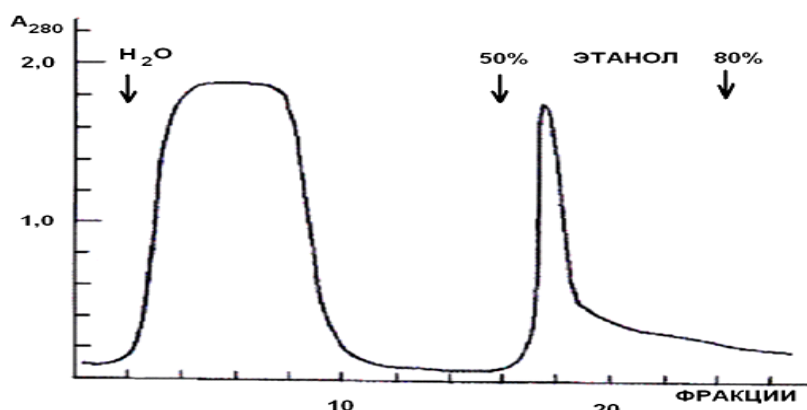
Ең алдымен біз тазартылған МТП-ның фузикоцин белсенділігін анықтауға кірістік. Фузикоциннің ерекше белгілі қасиеті ол плазматикалық мембрананың протон АТФ-азыны активтендіру [8-10]. Осы МТП-ның қасиетін анықтау үшін біз құрғақ бидай дәнінің ұрықты жағын кесіп тастадық. Содан кейін ұрықсыз бидай бөлігін бақылау вариантында 1 тәулікке суға малдық, ал тәжірибе вариантта сондай бөлігін 50 нг/мл МТП бар ерітіндісіне 1 тәулікке малдық. Екінші күнде сол бөліктерден плазматикалық мембраналар [5] әдіс бойынша алынды. Содан кейін алынған плазматикалық мембраналардың протон АТФ – азының белсенділігін фосфат түзілуі арқылы анықтадық [6].

Тазартылған МТП – ның Н+АТФ – азының белсенділігіне әсерін анықтау нәтижесі 1-ші кестеде көрсетілген.

Кесте бойынша МТП-ның бақылау мен тәжірибе варианттарының айырмашылығы 96 мк. тең, ал таза фузикоциннің сондай айырмашылығы 79 мк. тең. Осы нәтижелер анық МТП-ның фузикоцин белсенділігі бар екенін дәлелдейді және фузикоциннің МТП-ымен салыстырғанда белсенділігі кем екені көрсетіледі.

Біздің жұмысымыздың үлкен жетістігі ол-әлемде аналогы жоқ жаңа фузикоциннің белсенділігін анықтайтын жаңа әдісін шығару. Осы әдіс бойынша біз құрғақ бидайдың ұрықсыз бөлігіне не фузикоцин, не біздің МТП-ның ерітінділерімен әсер еттік. Бір тәуліктің ішінде сол бөліктерде жаңа белсенділік пайда болды. Ол белсенділік NADPH-ГДГ-нің белсенділігі 58-59 мкМ түзілетін NADP 1 минутта 1 мг протейнге тең. Біздің зерттеуіміз бойынша басқа ешқандай фитогормон, солардың ішінде: цитокинин, гибберелин және ауксин осы белсенділікке әсер ете алмайды. Осы тәжірибелерден кейін біздің МТП-ның фузикоцин белсенділігі бар екеніне ешбір күмән қалмады.

Біздің келесі мақсатымыз – ол МТП-ның бидайдың стресс жағдайларға төзімділігін арттыратын қасиеттерін анықтау. Қазақстанның территориясының көбінде көктемнің суықтығына және аязға дейін түсетін суықтар аз емес. Сондықтан дәнді дақылдардың алқаптарына осы жиі қайталанатын суықтардан үлкен зақым келтіріледі. Осы зақымды жұмсарту үшін жаңа биореттегіштерді қолдану керектігі сөзсіз. Осы себептен біз МТП-ның 5°C тем-



1-сурет - CL-4В арқылы МТП-ның гидрофобтық хроматографиясы

1-кесте - «Стекловидная -24» бидай сорты дәнінің ұрықсыз бөлігінің плазматикалық мембраналардың АТФ-азының белсенділігіне МТП-ның және таза фузикоқциннің әсері

| Варианттар | Плазматикалық мембраналардың АТФ-азының белсенділігі мк фосфат /мл протеин Mg ²⁺ ионымен | | Плазматикалық мембраналардың АТФ-азының белсенділігі мк фосфат /мл протеин Ca ²⁺ ионымен | | Плазматикалық мембраналардың АТФ-азының белсенділігі мк фосфат /мл протеин Mg ²⁺ ионымен | Плазматикалық мембраналардың АТФ-азының белсенділігі мк фосфат /мл протеин Ca ²⁺ ионымен |
|----------------|---|---------------|---|---------------|---|---|
| | Фузикоқцинсіз | Фузикоқцинмен | Фузикоқцинсіз | Фузикоқцинмен | МТП - сыз | МТП - пен |
| Ұрықсыз бөлігі | 191 ± 22 | 270 ± 57 | 147 ± 22 | 286 ± 54 | 201 ± 23 | 297 ± 54 |

2-кесте – «Стекловидная - 24» бидай сортының 5°C температурада 12 күн өскен өсімдіктеріне МТП әсері.

| Тәжірибе варианттары: Тазартылған МТП концентрациялары | Өсу мерзімі | 100 данадан өскен дәндер саны | Өспей қалған дәндер саны | Өскендерінің ең үлкен ұзындығы, см |
|--|-------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| бақылау(су) | 12 күн | 71 | 29 | 1,9 |
| 50нг/мл(100 данадан) | | 84 | 16 | 4,5 |



бақылау



тәжірибе

2-сурет - «Стекловидная - 24» бидай сортының дәндердің 2 % NaCl ерітіндіде 50 нг/мл МТП ерітіндісінде өсуіне әсері.

пературада өскен бидай өсімдіктеріне әсерін анықтадық. Алынған нәтижелер 2-ші кестеде көрсетілген.

Кесте бойынша МТП бидайдың өскендерінің суыққа төзімділігін арттыруға өте жақсы әсер етті. Мәселен, өспей қалған өсімдіктердің саны азайды және олардың өсуі бақылауға қарағанда тәжірибеде 2 есе жақсы болды.

Қорыта айтқанда, МТП-ның бидай өсімдіктерінің суыққа төзімділігін арттыратын қасиеті дәлелденді.

Қазақстанның бүкіл жерінің үштен бір бөлігінің тұзданғаны бәріне мәлім. Сол себептен өсімдіктердің тұзға төзімділігін арттыратын биореттегіштерді біздің республикамызда кең қолдану өте қажет. Осы себептен біз МТП-ның

«Стекловидная – 24» бидай сортының тұзға төзімділігін арттыратын қасиетін зерттедік.

Тәжірибе үшін біз құрғақ бидайды бақылау вариантта 2% NaCl ерітіндісінде Петри табақшаларда өсірдік. Ал тәжірибе вариантта сол бидайларды 50нг/мл МТП ерітіндісіне 2% NaCl бірге Петри табақшаларда 1 апта бойы өсірдік. Тәжірибе нәтижелері 2-ші суретте көрсетілген.

Алынған нәтиже бойынша 2% NaCl ерітіндіде бақылау вариантта бидайдың бірде дәні өспей қалды, ал тәжірибе вариантта МТП әсерінен сол тұзды стресске қарамай бидай дәндері өсе берді. Осы нәтижеде ғажайып МТП-ның бидайдың тұзды стресске төзімділігін арттыратын қасиеті дәлелденді.

Әдебиеттер

- 1 Brulle F, Bernard F, Vandenbulcke F, Cuny D, Dumez S. Identification of suitable qPCR reference genes in leaves of Brassica oleracea under abiotic stresses. *Ecotoxicology*. 2014 Feb 25. [Epub ahead of print]
- 2 Sotelo P, Pérez E, Najjar-Rodriguez A, Walter A, Dorn S. Brassica plant responses to mild herbivore stress elicited by two specialist insects from different feeding guilds. *J Chem Ecol*. 2014 Feb;40(2):136-49. doi: 10.1007/s10886-014-0386-4. Epub 2014 Feb 7.
- 3 Tomar PC, Lakra N, Mishra SN. Effect of cadaverine on Brassica juncea (L.) under multiple stress. *Indian J Exp Biol*. 2013 Sep;51(9):758-63.
- 4 Гильманов М.К., Саменов Н.А. Методы очистки и изучения свойств НАДФ-глутаматдегидрогеназы растений // Статьи методического сборника ИМБиб "Методы молекулярной биологии, биохимии, иммунохимии и биотехнологии" Алматы, 1999 г., С. 103-113.
- 5 N. Yu. Abramycheva, A.V. Babakov, S.V. Bilushi, E.E. Danilina and Y.P. Shevchenko, Comparison of the biological activity of fusicoccin in higher plants with its binding to plasma membranes. *Planta*, 183 (1991) 315-320.
- 6 Практикум по биохимии под ред. Северина Е.С. и Соловьевой Г.А., стр. 36
- 7 Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254.
- 8 Chen Q, Guo CL, Wang P, Chen XQ, Wu KH, Li KZ, Yu YX, Chen LM. Up-regulation and interaction of the plasma membrane H(+)-ATPase and the 14-3-3 protein are involved in the regulation of citrate exudation from the broad bean (*Vicia faba* L.) under Al stress. *Plant Physiol Biochem*. 2013 Sep;70:504-11. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.06.015. Epub 2013 Jun 27.
- 9 Beffagna N, Riva MA. Fusicoccin-induced catalase inhibitor is produced independently of H⁺-ATPase activation and behaves as an organic acid. *Physiol Plant*. 2011 Jun;142(2):144-56. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01455.x. Epub 2011 Mar 9.
- 10 Okumura M, Takahashi K, Inoue S, Kinoshita T. Evolutionary appearance of the plasma membrane H (+) -ATPase containing a penultimate threonine in the bryophyte. *Plant Signal Behav*. 2012 Aug;7(8):979-82. doi: 10.4161/psb.20936. Epub 2012 Jul 27.

Reference

- 1 Brulle F, Bernard F, Vandenbulcke F, Cuny D, Dumez S. Identification of suitable qPCR reference genes in leaves of Brassica oleracea under abiotic stresses. *Ecotoxicology*. 2014 Feb 25. [Epub ahead of print]
- 2 Sotelo P, Pérez E, Najjar-Rodriguez A, Walter A, Dorn S. Brassica plant responses to mild herbivore stress elicited by two specialist insects from different feeding guilds. *J Chem Ecol*. 2014 Feb;40(2):136-49. doi: 10.1007/s10886-014-0386-4. Epub 2014 Feb 7.
- 3 Tomar PC, Lakra N, Mishra SN. Effect of cadaverine on Brassica juncea (L.) under multiple stress. *Indian J Exp Biol*. 2013 Sep;51(9):758-63.
- 4 Gilmanov M.K., Samenov N.A. Metody ochistki i izucheniya svoistv NADF-glutamatdehidrogenazy rasteniii// Statyi metodicheskogo sbornica IMBiB "Metody moleculiyarnoi biologii, biohimii, immunohimii i biotekhnologii" Алматы, 1999g., S. 103-113.

-
- 5 N. Yu. Abramycheva, A.V. Babakov, S.V. Bilushi, E.E. Danilina and V.P. Shevchenko, Comparison of the biological activity of fusicoccin in higher plants with its binding to plasma membranes. *Planta*, 183 (1991) 315-320.
- 6 Practicum po biohimii pod red. Severina E.S. I Soloviyovoi G.A., str. 36
- 7 Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 8 Chen Q, Guo CL, Wang P, Chen XQ, Wu KH, Li KZ, Yu YX, Chen LM. Up-regulation and interaction of the plasma membrane H(+)-ATPase and the 14-3-3 protein are involved in the regulation of citrate exudation from the broad bean (*Vicia faba* L.) under Al stress. *Plant Physiol Biochem.* 2013 Sep;70:504-11. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.06.015. Epub 2013 Jun 27.
- 9 Beffagna N, Riva MA. Fusicoccin-induced catalase inhibitor is produced independently of H⁺-ATPase activation and behaves as an organic acid. *Physiol Plant.* 2011 Jun;142(2):144-56. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01455.x. Epub 2011 Mar 9.
- 10 Beffagna N, Riva MA. Fusicoccin-induced catalase inhibitor is produced independently of H⁺-ATPase activation and behaves as an organic acid. *Physiol Plant.* 2011 Jun;142(2):144-56. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01455.x. Epub 2011 Mar 9.