

КУЛИКОВА¹ О.Г., ЯМСКОВА² В.П., ИЛЬИНА¹ А.П., МАРГАСЮК¹ Д.В., ЯМСКОВ¹ И.А.

¹ Учреждение российской академии наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28, факс: (499)135-50-37, e-mail:koulikova_olga@mail.ru

² Учреждение российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26, факс: (499)135-80-12

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛУКА РЕПЧАТОГО *ALLIUM CEPA* L.

Ранее в различных тканях животных нами были обнаружены биорегуляторы, которые в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл, оказывают действие на такие процессы как клеточная миграция, адгезия, пролиферация и дифференцировка [1–8]. Биорегуляторы (БР) данной группы способствуют поддержанию структуры ткани, межклеточных адгезионных взаимодействий, жизнеспособности клеток в условиях *in vitro*, а также стимулируют восстановление и репарацию в патологически измененных тканях *in vivo* [9].

В настоящей работе предпринята попытка идентификации БР данной группы в луке репчатом *Allium cepa* L., который представляет собой травянистое растение семейства лилейных. Кроме широкого применения в качестве ценной пищевой культуры, лук репчатый используется как лекарственное растение: в нем содержатся эфирные масла, циклоаллин, метилаллин, тиопропионал, кемпферол, производные кверцетина, органические кислоты, углеводы (глюкоза, фруктоза, мальтоза), каротиноиды, аминокислоты, витамин С, различные микроэлементы и фитонциды. Препараты лука обладают противосклеротическим, сахароснижающим, антимикробным, мочегонным, желчегонным и ранозаживляющим действием [10]. Кроме того, в данной работе было изучено влияние БР, выделенного из лука, на рост и развитие семян нескольких овощных культур.

Материалы и методы

Все использованные химические реактивы были марки ХЧ. Была использована очищенная вода (16 Мом).

Для выделения биорегуляторов был использован лук репчатый (1,808 кг, плодовоовощная база поселка Кольчугино Владимирской области). Луковицы нарезают дольками размером 3–4 см, экстрагировали раствором ($2,06 \cdot 10^{-2}$ моль/л NH_4NO_3 , $1,88 \cdot 10^{-2}$ моль/л KNO_3 , $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л KH_2PO_4) в течение суток при $+4^\circ\text{C}$. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 г (Т 32А Janetzki, Германия).

Метод высаливания растительного экстракта. К охлажденному раствору растительного экстракта добавляли сухой серноокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли ($+4^\circ\text{C}$, 100 ч). Центрифугированием отделяли надосадочную жидкость (супернатант), диализовали до полного удаления серноокислого аммония.

Исследование мембранотропной активности растительных биорегуляторов проводили на органных культурах печени мышей-гибридов F1 (C57BL/СВА, самцы весом 18–20 г), содержащихся в виварии ИБР РАН [1].

Определение концентрации белков в растворах определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность (D) исследуемых растворов при различных длинах волн в диапазоне 230–280 нм [11].

Хроматографическое разделение супернатанта экстракта лука проводили с использованием хроматографа высокого давления фирмы Millichrom и гидрофобной колонки Jupiter C₅ (2×150 мм). В качестве элюента использовали 0,1% трифторуксусная кислота — ацетонитрил от 0% до 100%, скорость потока 0,7 мл/мин. Детекция проводилась при длине волны 280 нм.

Масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF молекулярной массы пептида проводили на время-пролетном масс-спектрометре Ultra-Flex 2 (Bruker Daltonic, Германия). Образцы для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха, с последующим разведением в 70% ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФУ. В качестве матрицы в работе использовали α-циано-4-гидроксицинамовую кислоту.

Методом динамического лазерного светорассеяния исследовали супернатант на приборе “PhotoCor Complex” (фирма “ФотоКор”, Россия) [12]. Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 60–120° при 23 °С. Исследуемый раствор предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны “Dugapore” с диаметром пор 0,45 мкм (“Millipore”).

Аминокислотный анализ проводили на аминокислотном анализаторе Hitachi 835. Разделение осуществляли на хроматографической колонке с сульфополистирольными катионитами марки 2613, детекция — спектрофотометрическая, в нингидриновых производных (длина волны 570 и 440 нм). Перед анализом проводили гидролиз белка смесью 12 н HCl (конц.) трифторуксусная кислота (2:1) с добавлением 0,005% меркаптоэтанола в течение 1 часа при 155 °С.

Специфическую активность БР, выделенного из лука, изучали на модели проращивания семян в чашках Петри, оценивали всхожесть семян укропа, гороха и чеснока при обработке их раствором супернатанта экстракта лука, в концентрации соответствующей 10⁻¹³ мг белка/мл. В контрольной серии семена обрабатывали водой. Фиксировали количество проросших семян за определенный период времени, а также определяли длину и массу побега и корня каждого растения. Статистическую обработку результатов проводили согласно критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистку растительного биорегулятора проводили по схеме, разработанной ранее для БР животного происхождения [1]. На первом этапе очистки биорегулятора было проведено фракционирование растительного экстракта с помощью метода высаливания сернокислым аммонием. При создании насыщенного раствора соли в растительном экстракте большое количество белков переходило в осадок. Фракции осадка и супернатанта,

после удаления ионов аммония, изучали методом биотестирования. Было показано, что мембранотропную активность в СМД проявляла только фракция супернатанта (рис. 1). Как и для БР животного происхождения, данная фракция характеризовалась наличием полимодальной дозовой зависимости данного типа активности. Методом динамического лазерного светорассеяния было показано, что в растворе супернатанта содержатся частицы размером от 100 ± 5 до $110\pm 1,2$ нм.

Обращенно-фазовой ВЭЖХ было установлено, что основным компонентом супернатанта экстракта лука является полипептид, гомогенность которого была доказана масс-спектрометрическим анализом (рис. 2).

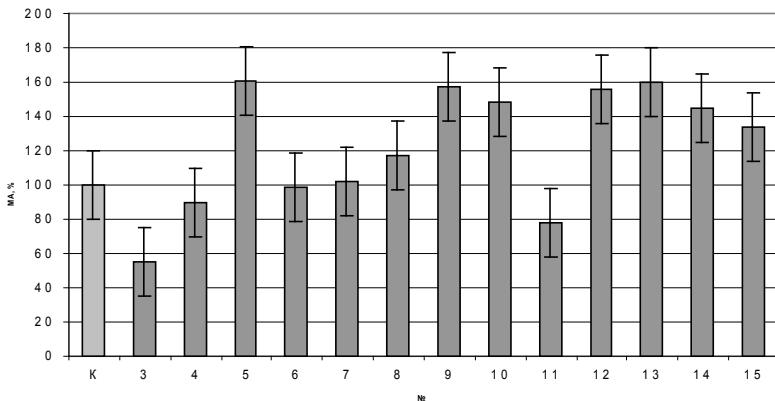


Рис. 1. Дозовая зависимость мембранотропной активности супернатанта экстракта лука. По оси абсцисс — степень 10-кратного последовательного разбавления исходного препарата; по оси ординат — мембранотропный эффект (МЭ) в %.; исходная концентрация белка в супернатанте 0,1 мг/мл

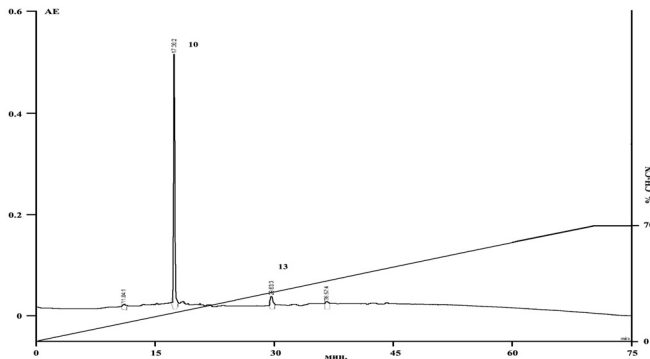


Рис. 2. Разделение супернатанта экстракта лука методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте 0,1%-ный водный раствор ТФУ/ацетонитрил

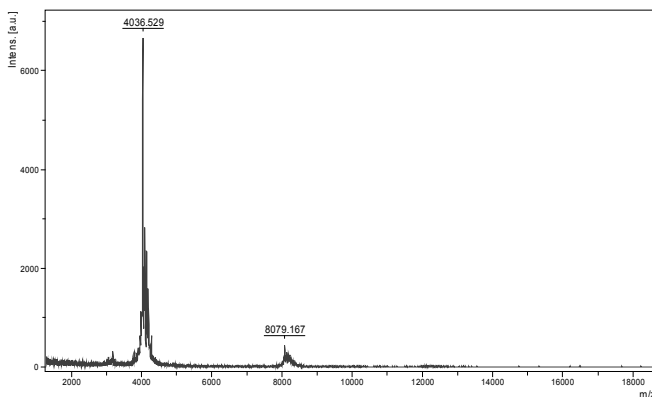


Рис. 3. MALDI-TOF масс-спектр супернатанта экстракта лука

Таблица

Аминокислотный состав супернатанта экстракта лука

Название	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met
Число остатков	3	2	3	6	3	7	5	2	0
Название	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Всего	Мол. масса
Число остатков	1	3	2	1	2	1	2	44	4796

Согласно данным MALDI-TOF масс-спектрометрии молекулярная масса данного полипептида составляет 4036 ± 2 Да (рис. 3).

Аминокислотный анализ полученного полипептида показал содержание в образце 44-х остатков аминокислот (табл.).

Таким образом, применив экспериментальный подход, разработанный для БР животного происхождения, удалось идентифицировать в луке репчатом БР, который по своим физико-химическим свойствам сходен с БР данной группы.

Для изучения специфической активности данного БР нами была выбрана модель оценки всхожести и развития семян растений. Результаты эксперимента показали ингибирующее действие БР, входящего в состав супернатанта экстракта лука, на рост и развитие семян растений. Для эксперимента были выбраны семена овощных культур, которые несовместимы с луком [13]. При воздействии биорегулятора, выделенного из лука, всхожесть семян укропа, гороха и чеснока опытной серии по сравнению с контрольной уменьшилась на 10–30%. В случае семян укропа наблюдалось также уменьшение длины стебля и веса, соответственно, на 8 и 14%. БР, выделенный из лука, не оказывал влияние на изучаемые параметры при его действии на семена чеснока и гороха. Следует отметить, что полученные результаты совпадают с многочисленными данными, указывающими на отсутствие совместимости посадки лука с данными овощными культурами.

Выводы

Таким образом, в данном исследовании впервые показано присутствие в тканях лука репчатого *Allium cepa* L. биорегулятора белковой природы, основным компонентом которого является полипептид. Также было продемонстрировано ингибирующее действие данного биорегулятора на рост и развитие семян некоторых овощных культур.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №10-04-00706-а.

Литература

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии.— 1991.— Т.52.— №2.— С. 181–191.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко и др. // Российский Химический Журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева).— 1999.— Т.43.— №5.— С. 34–39.
3. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. (2007) // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 28–37.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 38–48.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V. et. al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 49–56.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu et al // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 71–78.
8. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.
9. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа фармакологических препаратов нового поколения.— М.: МАКС Пресс.— 2009.— 84 с.
10. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия здоровья. М.: АСТ.— 2008.— 896 с.
11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ.— М.: Мир.— 1991.— 544 с.
12. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Anal. Biochem., 150.— 1995.— P. 76–85.
13. Шумаков Н.Е. Приусадебный сад и огород. Полезные советы.— М. Советская Россия.— 1959.— 144 с.

Резюме

В луке репчатом обнаружен биорегулятор, по физико-химическим свойствам сходный с биорегуляторами данной группы животного происхождения. В сверхмалых дозах данный биорегулятор оказывал влияние на рост и развитие семян некоторых овощных культур.

It was shown that a bioregulator was detected in onion *Allium cepa* L. by chemical and physical properties similar to animal bioregulators of this group. At ultra low doses this bioregulators influenced the growth and development of certain vegetable crops.

У цибулі ріпчастої виявлено біорегулятор, за фізико-хімічними властивостями подібний до біорегулятора даної групи тваринного походження. У надмалих дозах даний біорегулятор чинив вплив на ріст і розвиток насіння деяких овочевих культур.

ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО Н.П., МИТРОФАНОВА О.В., ГОРИНА В.М.
Никитский ботанический сад - Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO* АБРИКОСА, СЛИВЫ И АЛЫЧИ НА ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ ШАРКИ (*PLUM POX VIRUS*)

Среди известных и вредоносных вирусов косточковых плодовых культур одним из самых опасных является *Plum pox virus* (PPV) (род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*), поражающий многие виды рода *Prunus* и распространенный в 38 странах мира [1, 10, 13]. Существующие методы борьбы с вирусом шарки мало эффективны из-за имеющихся активных переносчиков инфекции и естественного распространения в садах. Поэтому устойчивость косточковых плодовых культур к вирусу является одной из важнейших проблем селекции. В связи с этим в Никитском ботаническом саду — Национальном научном центре проводятся поиск и отбор устойчивых и толерантных сортов, а также исследования по созданию иммунных к PPV селекционных форм абрикоса, сливы и алычи с использованием биотехнологических и биохимических методов [4, 6]. Использование культуры органов и тканей в селекции *in vitro* для получения иммунных форм, особенно у представителей рода *Prunus* L., нуждается в детальном изучении.

Цель настоящей работы — выявить особенности культивирования изолированных завязей и зародышей абрикоса, сливы, алычи и разработать биотехнологические приемы получения иммунных гибридных форм к вирусу шарки.

Материалы и методы

Объектами исследования служили бутоны, завязи, зародыши разных стадий развития толерантных и бессимптомных сортов абрикоса (*Prunus armeniaca* L.): Крымский Амур, Крымский Медунец, Harcot, Stark Early Orange; сливы (*Prunus domestica* L.): Венгерка Юбилейная, Клеймен, Миратория, Монфор и алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.): Аштаракская 2, Румяная Зорька, Салгирская Румяная, отобранные на естественном инфекционном фоне и предварительно протестированные на отсутствие вируса шарки с применением системы Пиротест-ИФА [1, 8].

Получение асептической культуры бутонов и завязей осуществляли, используя 70% раствор этанола (C_2H_5OH) с экспозицией 30 с, 1,5–2% раствор гипохлорита натрия ($NaClO$) с экспозицией 6 мин и последующую четырехкратную промывку в стерильной дистиллированной воде. Стерилизацию косточек (эндокарпия) и изолирование зародышей *in vitro* проводили по общепринятой методике [2, 3, 5]. Стадию развития зародыша определяли визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 по методике Поддубной-Арнольди [7]. Для культивирования бутонов, завязей и зародышей были использованы базовые питательные среды Murashige, Skoog (MS) [12], Quoirin, Lepoivre (QL) [14], Монье [11], White [15] в нашей модификации. Работы выполняли в асептических условиях ламинарного бокса Fat-