

Е. А. Маслюков, В. С. Пашкович, М. А. Ханчевский*Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь,
e-mail: mass12001@yandex.by***ВЛИЯНИЕ ИНОЗИНА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РОСТ ЛУКА РЕПЧАТОГО**

Аннотация. Была проверена гипотеза о положительном воздействии пуринового нуклеозида инозина на прорастание растительных объектов. В ходе проведенной работы было оценено влияние растворов инозина в концентрациях 0,05–0,3 % на биометрические показатели прорастания семян лука репчатого сорта Штутгартер Ризен. Наилучшие показатели были выявлены в группах, пророщенных на 0,1- и 0,15%-ных растворах инозина.

Ключевые слова: пуриновые нуклеозиды, инозин, цитокинины, меристемальный рост, стимулирование роста корней

E. A. Maslyukov, V. S. Pashkovich, M. A. Khanchevskiy*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus,
e-mail: mass12001@yandex.by***THE STUDY OF THE INOSINE INFLUENCE ON THE SEED GERMINATION AND ONION GROWTH**

Abstract. In this study the hypothesis about the purine nucleoside inosine's positive effect on the plant objects germination was checked. In the course of the work, the effect of inosine solutions in samples of 0,05–0,3 % on biometric indicators of onion seeds of the Stuttgarter Riesen variety germination was evaluated. The best indicators were found in groups germinated in 0,1 and 0,15 % solutions of inosine.

Keywords: purine nucleosides, inosine, cytokinins, meristematic growth, stimulation of root growth

Я. А. Маслюкоў, В. С. Пашковіч, М. А. Ханчэўскі*Міжнародны дзяржаўны інстытут імя А. Д. Сахарова Беларускага дзяржаўнага ўніверсітэта, Мінск, Беларусь,
e-mail: mass12001@yandex.by***УПЛЫЎ ІНАЗИНА НА ПРАРАСТАННЕ НАСЕННЯ І РОСТ ЦЫБУЛІ РЭПЧАТАЙ**

Анатацыя. Была правярана гіпотэза аб станоўчым уздзеянні пурынавага нуклеазіда іназіна на прарастанне раслінных аб'ектаў. У ходзе праведзенай працы быў ацэнены ўплыў раствораў іназіна ў канцэнтрацыях 0,05–0,3 % на біямэтрычныя паказчыкі прарастання насення цыбулі рэпчатай гатунка Штутгартэр Рызэн. Найлепшыя паказчыкі былі выяўлены ў групах, прарощаных на 0,1 і 0,15%-ных растворах іназіна.

Ключавыя словы: пурынавыя нуклеазіды, іназін, цытакініны, мерыстэмны рост, стымуляванне роста каранёў

Введение. Нуклеозиды и нуклеотиды являются предшественниками нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), метаболитов, которые участвуют в биоэнергетических процессах (АТФ, АДФ, АМФ) и в пластических процессах, ведущих к синтезу макромолекул, включая полисахариды, фосфолипиды и гликолипиды, а также являются предшественниками цитокининов.

Инозин – это пуриновый нуклеозид, который встречается в клетках растительного и животного происхождения. Инозин состоит из гипоксантина, связанного с остатком рибозы посредством гликозидной связи. Монофосфат инозина в клетках окисляется с образованием ксантозинмонофосфата, ключевого предшественника в метаболизме пуринов. Инозин также присутствует в некодирующих и экзогенных РНК (нкРНК), например, является компонентом транспортной РНК и необходим для трансляции в случае неоднозначных пар оснований.

Инозин участвует в механизме наиболее распространенного вида естественного редактирования нкРНК – замене аденина, что приводит к изменению свойств молекулы РНК, обеспечивая таким образом молекулярную пластичность. В частности, являясь компонентом некоторых тРНК, полифункциональный инозин антикодона может образовывать водородные связи не только с аденином, но и с урацилом и цитозином, располагающимися в третьем положении кодона. Кроме того, молекулярный инозин является важным вторичным метаболитом в обмене пуринов, который также действует как молекулярный посредник в передаче сигналов клетки.

Выдвигается предположение о том, что пуриновые нуклеозиды, в частности инозин, могут способствовать росту меристем побегов. Например, в 2005-м году было показано, что

внекорневое внесение пролина и удобрений на основе нуклеиновых кислот, включая 2%-ный раствор инозина в воде, стимулировало рост итальянского райграса (*Lolium multiflorum Lam*) при втором промывании.

Теоретические основы. Свойства и функциональные особенности нуклеозидов в растительных клетках и клетках животного происхождения вызывают постоянный интерес исследователей [1–8]. Пуриновые нуклеозиды являются высокоспециализированными соединениями, выполняющими ряд специфических функций, при этом в различных тканях они могут вызывать разнонаправленные эффекты. Одна из наиболее значимых функций нуклеозидов – сигнальная. Будучи биологически активными веществами, агонистами и нейротрансмиттерами, они оказывают регуляторные воздействия на ряд процессов через специфические рецепторы.

Стимулирование корнеобразования за счет использования инозина было опробовано в Высшей школе сельского хозяйства Университета Хоккайдо, на гидропонике в условиях теплицы выращивали пять следующих видов: рис (*Oryza sativa L.*), томат (*Solanum lycopersicum L.*), подсолнечник (*Helianthus annuus L.*), лук (*Allium cepa L.*) и соя (*Glycine max*); максимальная температура 32 °С, минимальная – 16 °С; в июле–августе 2006 г. семена были засеяны вермикулитом, за исключением проростков риса, которые были пророщены на сетке, плавающей на водопроводной воде. Позже рассаду пересаживали в питательный раствор.

Далее производились замеры сухой и влажной массы. Свежие корни окрашивали раствором Люголя для наблюдения за корневыми волосками. Развитие корневых волосков оценивали под микроскопом, оснащенным камерой (Coolpix 4500). Длину корней определяли по методу Ньюмана (рис. 1) [8].

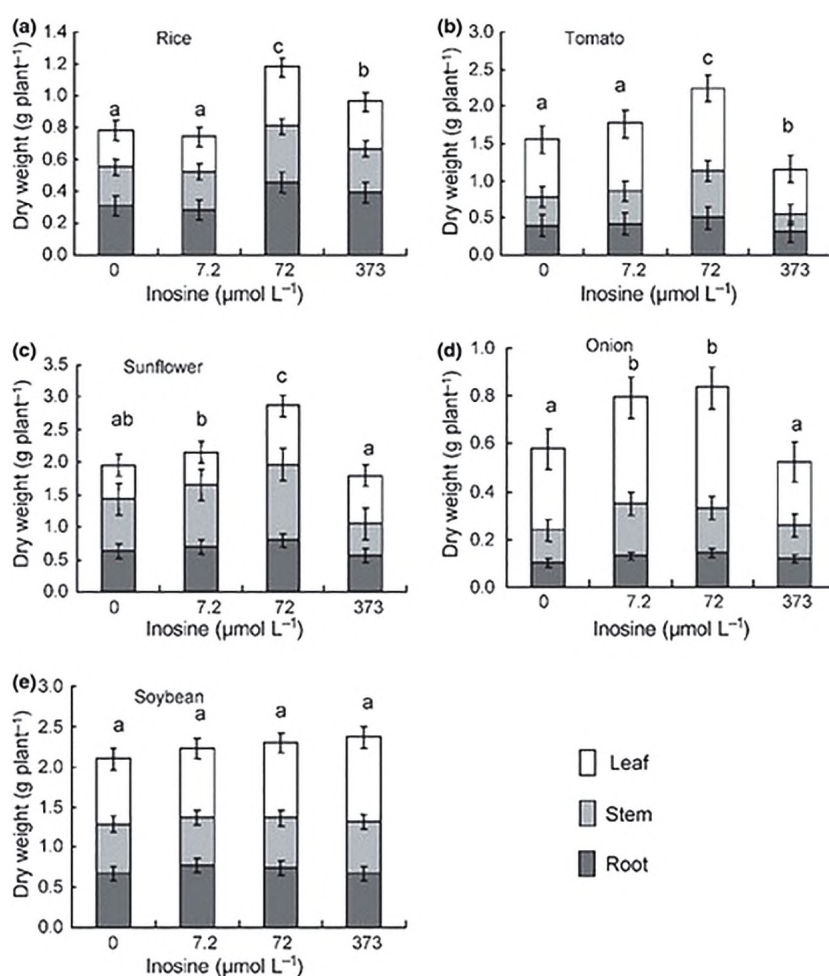


Рис. 1. Стимулирование роста корней за счет применения инозина

Несмотря на то что в клетках растений не были найдены рецепторы, аналогичные присутствующим в клетках животных P2X и P2Y, в 2014 г. был открыт первый пуринергический рецептор растений DORN1 [8]. Внеклеточный лектиновый домен DORN1 имеет высокое сродство к АТФ ($K_d = 45,7$ нМ) и меньшую аффинность к другим пуринам, что отображается в узнавании этим рецептором молекулы-агониста, за которым следует прямое фосфорилирование специфической киназой, приводящей в итоге к повышенной продукции активных форм кислорода и закрытию устьиц. Контроль пуринергической передачи сигнала имеет важное значение в регулировании процесса фотосинтеза, водного гомеостаза, устойчивости к патогенам, приросте фитомассы и, вероятно, в сочетании с другими белками облегчает сигнальную функцию. Как пример приводятся белки-мишени к DORN1-киназе. Новый рецептор доказал существование пуринергической сигнальной системы растений и был отнесен к новой группе рецепторов P2K [8]. Возможно, дальнейшие исследования расширят представления о данной группе и укажут на сродство с другими нуклеозидами.

Особый интерес представляет механизм рециркуляции или спасения нуклеотидов, в ходе которого из нуклеозидов как промежуточных продуктов деградации ДНК и РНК могут образовываться нуклеотиды. Так, например, аденозин под действием аденозиндезаминазы превращается в инозин. Инозин в свою очередь подвергается действию пуриновой нуклеозидфосфорилазы и превращается в гипоксантин. На гипоксантин воздействует фосфорибозилтрансфераза паразита *Plasmodium falciparum*, преобразуя соответствующее азотистое основание в его нуклеозидмонофосфат [4, 11]. Конечным продуктом цепочки превращений оказываются ксантозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат или инозинмонофосфат (рис. 2 и 3).

С другой стороны, растения с недостаточным уровнем фосфорибозилтрансфераз, например *A. thaliana*, могут проявлять фенотипические мутации [9, 10].

Материалы и методы исследования. Цель исследования – проверка гипотезы о положительном воздействии пуринового нуклеозида инозина на прорастание растительных объектов и набор фитомассы. В ходе проведенной работы было оценено влияние растворов инозина в концентрациях 0,05–0,3 % на некоторые биометрические показатели прорастания семян лука репчатого сорта Штутгартер Ризен.

Проращивание семян лука репчатого производилось в закрытом проветриваемом помещении при отсутствии освещения, при комнатной температуре. В начале эксперимента семена высаживались на фильтровальную бумагу в стеклянные чашки Петри диаметром 10 см. В первые 2–3-е суток полив производился 2 раза, в последующие дни – один раз в сутки. Для проведения опыта были приготовлены растворы инозина в концентрациях 0,05 %, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 и 0,3 % соответственно, а также подготовлены контрольные группы для проращивания на водопроводной и дистиллированной воде. Эксперимент проводился с 01.06.2021 по 13.06.2021. В каждой группе насчитывалось 20 семян. На протяжении эксперимента замеры производились раз в двое суток, 13.06.2021 были сняты итоговые замеры. На третий день определялась энергия прорастания семян [2], в последний день эксперимента – их всхожесть. Эти данные приведены в табл. 1.

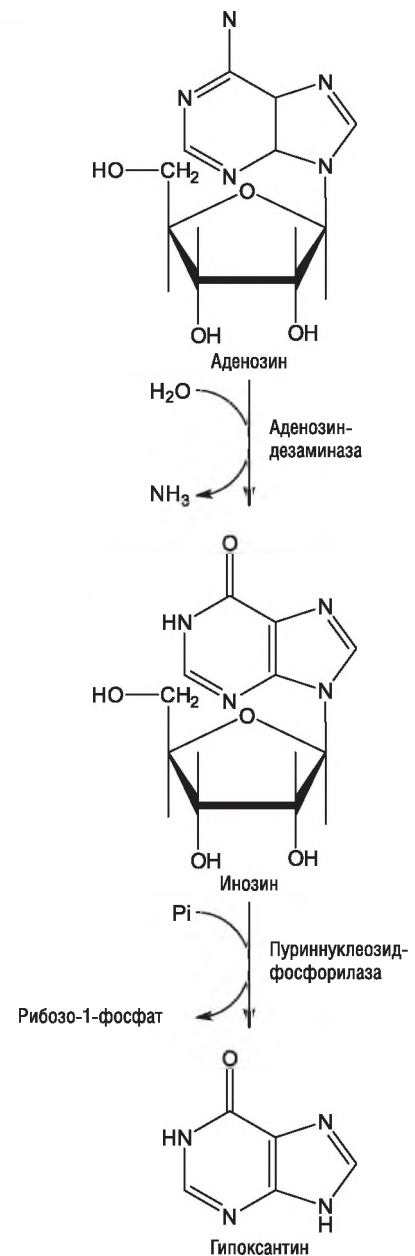


Рис. 2. Катаболизм пуриновых нуклеотидов [3]

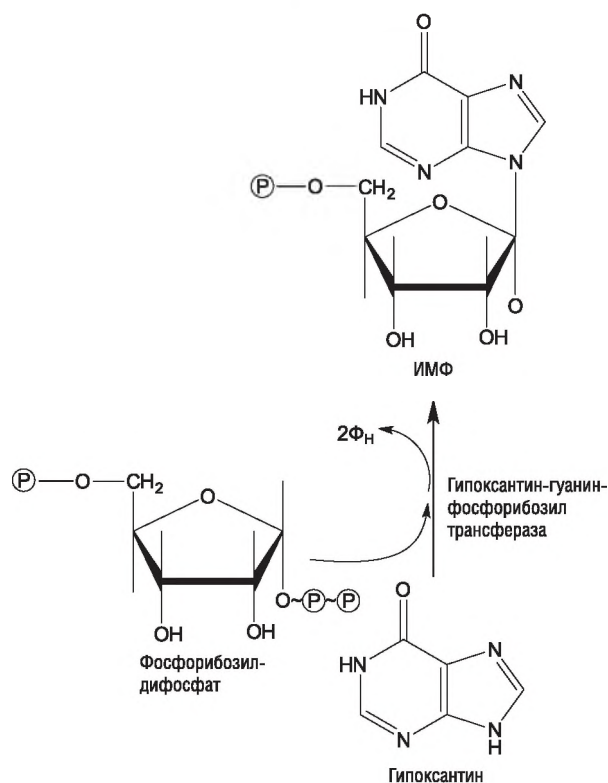


Рис. 3. Реутилизация гипоксантина

Таблица 1. Показатели энергии прорастания и всхожести в исследуемых группах

Показатель	Дистиллированная вода	Водопроводная вода	Ino, %					
			0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
$E_g, \%$	80	75	80	85	80	90	80	75
Вс, %	85	75	100	90	100	90	95	85

0,68–1,02 %; самое высокое значение у проростков из группы, смоченной 0,15%-ным инозином, что говорит о наиболее сильной профилерации ткани в данной группе.

На рис. 4 изображен график динамики прорастания семян. Из него следует, что наиболее активный рост саженцев в группах приходится на 3–7-е сутки, после чего замедляется и выходит на плато (7–9-е сутки). Далее на 9–11-е сутки в группах 1–5 наблюдается повторное усиление роста, группы 6–8 прорастают равномерно. В последние дни проращивания (11–13-е сутки) рост замедлился или вышел на плато, за исключением группы 7 (резкий скачок).

Таблица 2. Митотический индекс в исследуемых группах

Группа	MI, %
Дистиллированная вода	0,68±0,116
Водопроводная вода	0,74±0,120
Ino 0,05 %	0,78±0,124
Ino 0,1 %	0,82±0,127
Ino 0,15 %	1,02±0,141
Ino 0,2 %	0,92±0,134
Ino 0,25 %	0,82±0,127
Ino 0,3 %	0,70±0,117

На рис. 5 представлены суммарные длины проростков опытных групп и их численная и процентное соотношение; за 100 % была взята суммарная длина группы, произрастающей на водопроводной воде. Из диаграммы следует, что наибольший прирост относительно контрольной группы наблюдался в группах, пророщенных на 0,1 % (+12,04 %) и 0,15 % (+11,02 %) инозине.

Для статистической проверки суммарных длин проростков в исследуемых группах был выбран однофакторный диспер-

К каждой из исследуемых групп отбирали по 5 проростков длиной не более 10 мм для оценки активности пролиферации клеток и подсчета митотического индекса. Проростки хранили в спиртовом фиксаторе (70 % этанол / CH_3COOH 3 : 1). Далее производили мацерацию (10%-ный раствор HCl) и трехкратную отмывку в дистиллированной воде. Из каждого проростка был изготовлен микропрепарат; для окрашивания использовали краситель кармин красный. На каждом микропрепарате была проанализирована 1000 клеток соответственно, из каждой исследуемой группы – 5000 клеток. При подсчете митотического индекса внимание также уделялось хромосомным aberrациям, однако их количество из расчета на 5000 клеток было крайне мало.

Результаты и их обсуждение.

В табл. 1 приведены значения энергии прорастания и всхожести семян в контрольной и опытных группах. Как видно из таблицы, ни в одной из опытных групп значения не опускались ниже контрольных.

Как видно из таблицы, наибольшее значение энергии прорастания (90 %) приходится на группу, смачиваемую раствором с концентрацией 0,2 %; наибольший процент итоговой всхожести (100 %) приходится на группы, смачиваемые растворами с концентрациями 0,05 и 0,15 %.

В табл. 2 представлены результаты подсчетов митотического индекса с учетом ошибки репрезентативности. Так, значения митотического индекса колеблются в диапазоне

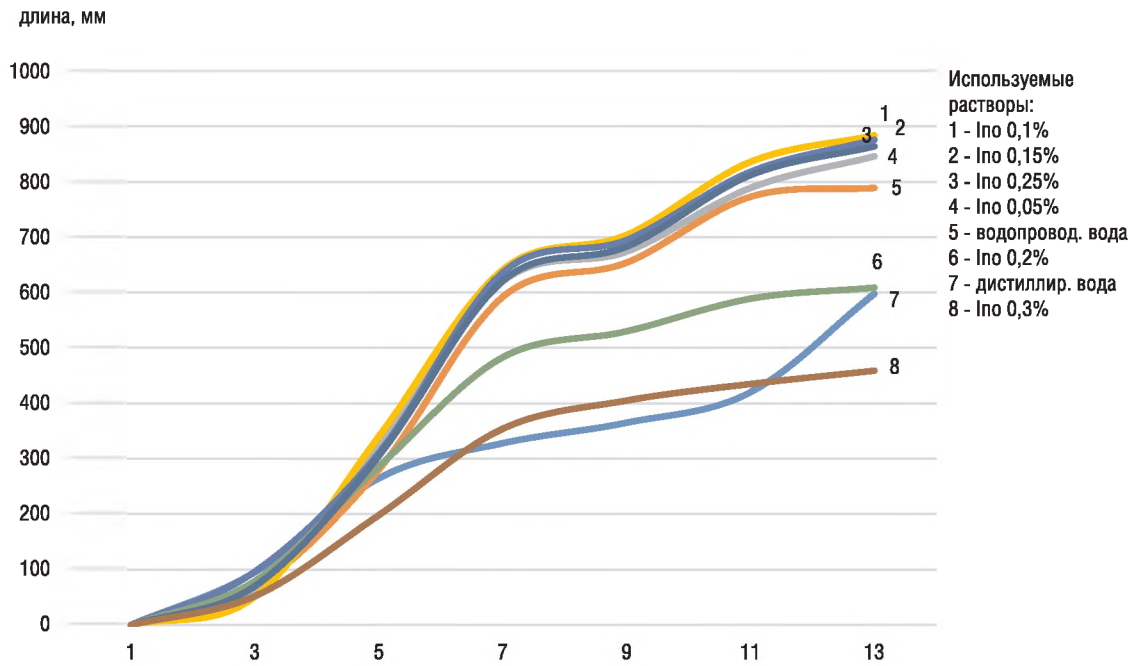


Рис. 4. Динамика прорастания семян лука в период 01.06.2021–13.06.2021

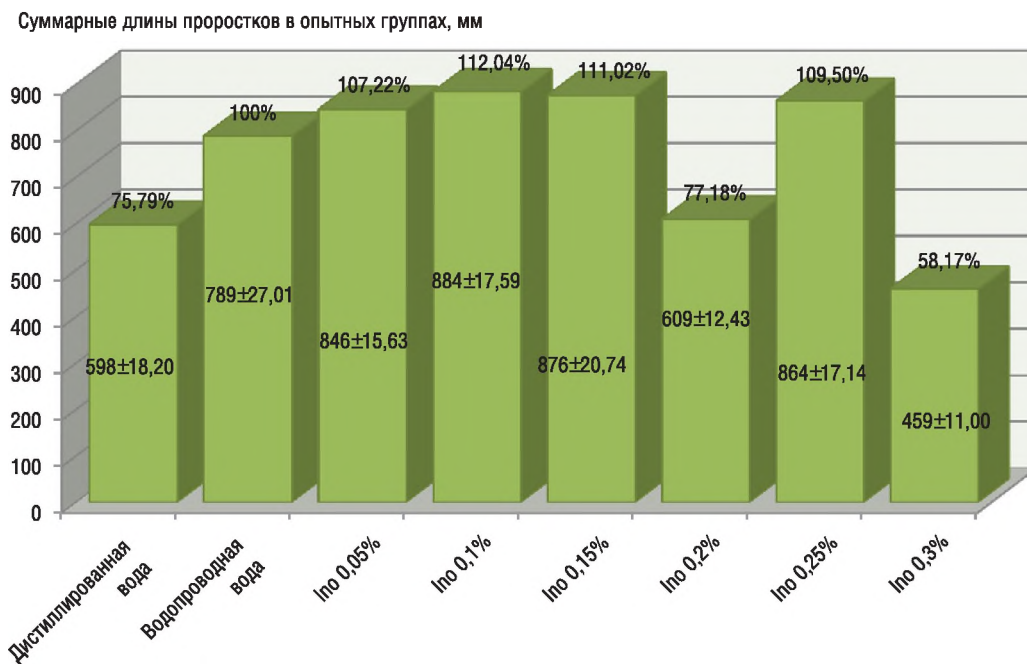


Рис. 5. Процентное соотношение суммарных длин проростков в опытных группах

сионный анализ. По итогам проверки малых групп была принята гипотеза о статистически значимых различиях при $p \leq 0,1$ при сравнении опытных групп с группой, проросшей на водопроводной воде.

Заключение. На основании проанализированных литературных источников подтверждена гипотеза о положительном воздействии инозина на начальные этапы прорастания семян лука репчатого. Наилучшие результаты выявлены в группах семян, произраставших на растворах инозина с концентрациями 0,1 и 0,15 %. Физиологический эффект может быть связан с сигнальной ролью инозина, а также с его функциями в метаболических и пластических процессах, протекающих в растительной клетке.

Список использованных источников

1. Система пуриновых нуклеотидов 1: мембранные механизмы физиологических эффектов производных аденозина / К. Я. Буланова [и др.] // Военная медицина. – 2012. – №4. – С. 102–108.
2. Основы биотехнологии растений: учебное пособие / Б. П. Кулуев [и др.]; под ред. Р. Г. Фархутдинова – Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. – 244 с.
3. Романов, Г. А. Как цитокинины действуют на клетку / Г. А. Романов // Физиология растений. – 2009. – №2. – С. 259–319.
4. Elucidation of the substrate specificity, kinetic and catalytic mechanism of adenylosuccinate lyase from *Plasmodium falciparum* / V. Bulusu [et al.] // Proteins and Proteomics. – 2009. – Vol. 1794(4). – P. 642–654.
5. Boison, D. Adenosine signaling and function in glial cells / D. Boison, J.-F. Chen, B. B. Fredholm // Cell Death & Differentiation. – 2009. – Vol. 17(7). – P. 1071–1082.
6. Liu, H. Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy / H. Liu, Y. Xia // Journal of Applied Physiology. – 2015. – Vol. 119(10). – P. 1173–1182.
7. Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses / Y. Cao [et al.] // Current Opinion in Plant Biology. – 2014. – Vol. 20. – P. 82–87.
8. Characterization of stress protein *Lys U*. Enzymic synthesis of diadenosine 5', 5'''- P 1-P4 – tetraphosphate (Ap4A) analogues by *Lys U* / M. Theoclitou [et al.] // J. Chem. Soc. – 1996. – Vol. 1. – P. 2009–2019.
9. Functional characterization of a gene encoding a dual domain for uridine kinase and uracil phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* / M. R. Islam [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2007. – Vol. 63(4). – P. 465–477.
10. Higher biomass accumulation by increasing phosphoribosylpyrophosphate synthetase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* / S. Koswowsky [et al.] // Plant Biotechnology Journal. – 2008. – Vol. 6(3). – P. 281–294.
11. Allosteric regulation and substrate activation in cytosolic nucleotidase II from *Legionella pneumophila* / B. Srinivaan [et al.] // FEBS Journal. – 2014. – Vol. 281(6). – P. 1613–1628.
12. Promotion of root growth by the application of inosine / D. Tokuhisa [et al.] // Soil Science and Plant Nutrition. – 2010. – Vol. 56(2). – P. 272–280.
13. Zhang, Y. Adenosine signaling in normal and sickle erythrocytes and beyond / Y. Zhang, Y. Xai // Microbes and Infection. – 2012. – Vol. 14(10). – P. 863–873.
14. A1 adenosine receptor negatively modulates coronary reactive hyperemia via counteracting A2A-mediated H₂O₂ production and KATP opening in isolated mouse hearts / X. Zhou [et al.] // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2013. – Vol. 305(11). – P. 1668–1679.

Поступила 30.09.2021