

УДК 581.1: 581.19:58.02

П. С. Прудников, к.б.н.

А. А. Гуляева, к.с.-х.н.



ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, Россия, Орел, prudnicov@inbox.ru

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ГОРМОНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС *PRUNUS CERASUS* L.

Аннотация

В статье рассматривается особенность действия гипертермии на гормональную и антиоксидантную систему *Prunus Cerasus* L. на примере сорта Орлица селекции ВНИИСПК. Показано, что в условиях действия высокой температуры в листьях растений усиливается накопление абсцизовой кислоты и происходит снижение уровня индолилуксусной кислоты. Специфическое изменение содержания и соотношения данных фитогормонов способствует активации и накоплению, как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных антиоксидантов. Установлено, что под действием гипертермии происходит значительное повышение активности таких антиоксидантов, как супероксиддисмутаза и пероксидаза, а также увеличение содержания аминокислоты пролин. На фоне изменений в гормональной и антиоксидантной системах наблюдается снижение развития перекисного окисления мембранных липидов.

Ключевые слова: вишня, гипертермия, перекисное окисление, антиоксиданты, фитогормоны

UDC 581.1: 581.19:58.02

P. S. Prudnikov, candidate of biological sciences

A. A. Gulyaeva, candidate of agricultural sciences

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Russia, Orel, prudnicov@inbox.ru

FEATURES OF HYPERTHERMIA EFFECT ON HORMONAL SYSTEM AND ANTIOXIDANT STATUS OF *PRUNUS CERASUS* L.

Abstract

The article discusses the features of hyperthermia effect on the *Prunus Cerasus* L. hormonal system and antioxidant system after the example of Orlytza apricot developed at the All Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding. It is shown that under high temperatures the accumulation of abscisic acid is enhanced in plant leaves and the level of indole-acetic acid is reduced. The specific change of the phytohormone content promotes the accumulation and activation of both macromolecular antioxidants and low molecular antioxidants. It has been determined that the activity of such antioxidants as superoxide dismutase and peroxidase is significantly increased under the hyperthermia effect as well as the content of proline becomes higher. The development of lipid peroxidation of membrane lipids is observed to be lowered on the background of changes in hormonal and antioxidant systems.

Key words: cherry, hyperthermia, lipid peroxidation, antioxidants, phytohormones

Введение

В последние годы период летней вегетации сопровождается жесткими погодными аномалиями: продолжительная гипертермия и засуха. Одним из показателей негативного действия повышенной температуры и засухи на растение является перекисное окисление липидов (ПОЛ) [2]. Так в условиях гипертермии развивается дисбаланс между количеством поглощенной хлоропластами солнечной радиации и транспортом электронов через цитохромы. В результате избыточная энергия может перейти на кислород, что приводит к образованию его активных форм [3]. Липиды мембран являются основными мишенями окислительного повреждения в клетках [1]. В результате состав и структура мембран изменяются и, как следствие, происходит увеличение их проницаемости и выделение из клетки водорастворимых веществ. Также при этом может происходить потеря активности мембранных ферментов и нарушение работы переносчиков электронов [11]. Ограничение процессов окисления и поддержание структурно-функционального состояния мембран в основном осуществляется за счет работы ферментов антиоксидантной системы защиты: супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза, каталаза и др. [1]. Об интенсивности перекисного окисления липидов мембран можно судить по ряду образующихся при этом веществ: гидроперекиси, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты и др.

К защитным механизмам, позволяющим растению адаптироваться к стрессу, является аккумуляция низкомолекулярных соединений, называемых совместными осмолитами: пролин, аланин, бетаин, глицин-бетаин и др. Так при засухе пролин не только понижает водный потенциал клеток, восстанавливая тем самым водоснабжение, но и защищает ферменты от инактивации, обеспечивает целостность структурных белков, сохраняет функциональную активность клеточных мембран [14].

Известно, что у растений основными посредниками в ответной реакции организма на действие факторов внешней среды являются фитогормоны. Гормоны могут активировать экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты [23], интенсифицируют окислительные процессы [15], поставляющие активные формы кислорода [18]. В свою очередь, компоненты антиоксидантной системы могут регулировать метаболизм фитогормонов [9]. В условиях действия стресса, как правило, увеличивается содержание абсцизовой кислоты и снижается количество ауксинов и цитокининов.

Между тем характер изменения фитогормонов, активности компонентов антиоксидантной системы защиты и процессов ПОЛ в условиях действия гипертермии у растений не вишни не изучен.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось выявление специфики действия гипертермии на гормональный и антиоксидантный статус растений вишни.

Материал и методика исследований

Объектами исследований служили листья вишни сорта Орлица (селекции ФГБНУ ВНИИСПК). Варианты опыта включали в себя: контроль – изолированные листья растений в емкости с водой при нормальных условиях; гипертермия – листья растений в емкости с водой в условиях действия высокой температуры 50°C. Время экспозиции 2ч.

О работе антиоксидантной системы судили по количеству накопления в листьях пролина, определение которого проводилось с помощью нингидринового реактива [17] и активности супероксиддисмутазы (СОД) на основе реакции с нитросиним тетразолием [19]. Активность пероксидазы определяли методом Бояркина [7] с использованием бензида. Фитогормоны экстрагировали комплексным методом из

навески листьев, предварительно зафиксированной в парах этанола [4]. Содержание фитогормонов ИУК и АБК определяли методом биологической пробы. Биотестом служили колеоптили пшеницы сорта Московская 39. В качестве стандартных растворов фитогормонов были взяты: ИУК и АБК ("Serva", Германия). Анализ продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) оценивали по реакции взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой [13]. Анализы проводили в 5-кратной биологической повторности. Достоверность результатов оценивали по стандартным методикам с использованием программ EXEL [6].

Результаты и обсуждение

Фитогормоны являются одними из основных эндогенных регуляторов, определяющих ответные реакции растения на воздействие различных факторов внешней среды. С целью выяснения ответа гормональной системы вишни в условиях действия двухчасовой гипертермии проведены исследования по выявлению изменений в содержании ИУК и АБК. Показано, что под воздействием высокой температуры в листьях растений вишни на фоне накопления АБК – гормона стресса, наблюдается интенсивное снижение уровня ИУК – гормона роста (рисунок 1). Так в условиях гипертермии в листьях вишни на фоне 39% снижения количества ИУК, уровень АБК, возрос на 50%.

Известно, что ход физиологических процессов определяется не столько содержанием фитогормонов, сколько их соотношением [22]. В наших исследованиях действие гипертермии резко снизило соотношение ИУК/АБК в листьях вишни (рисунок 2). Изменение соотношения ИУК/АБК в сторону увеличения количества абсцизовой кислоты инактивирует многие физиологические процессы, тем самым, предохраняя растение от бесполезной траты энергии на рост и перенаправляя ее на активацию защитных систем.

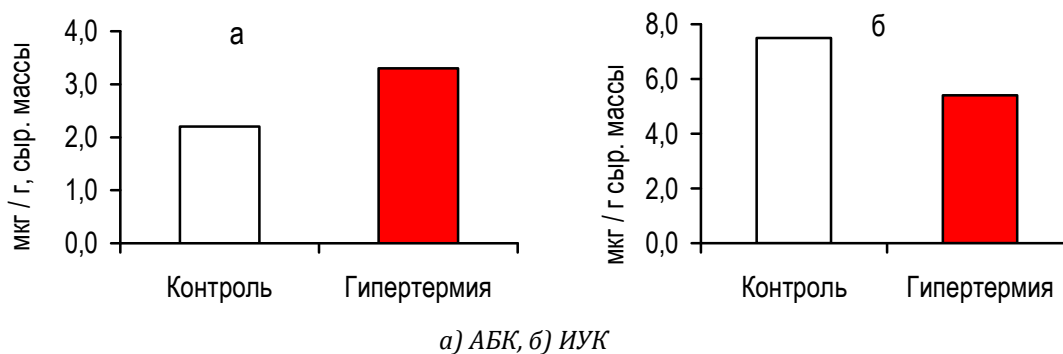


Рисунок – 1 Содержание фитогормонов в листьях растений вишни в условиях действия гипертермии.

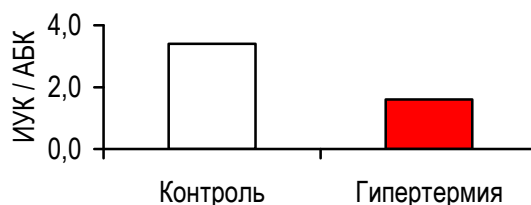
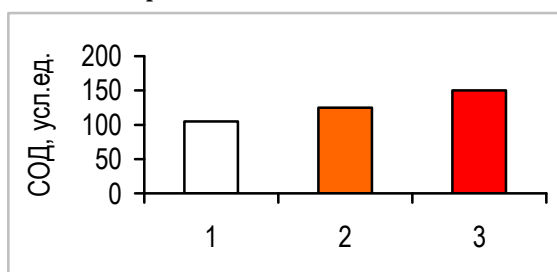


Рисунок – 2 Соотношение ИУК/АБК в листьях растений вишни в условиях действия гипертермии

Изучение специфики действия гипертермии на антиоксидантную систему защиты вишни показало, что стресс в листьях растений вишни вызвал увеличение

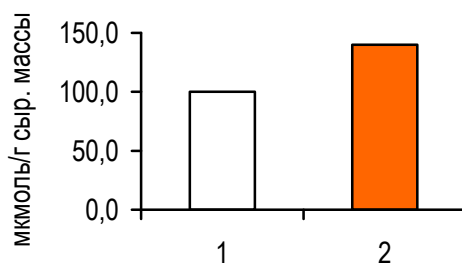
активности супероксиддисмутазы (СОД) на 19%. Через 24 ч последствий стресса, активность фермента по сравнению с контрольным значением возросла на 43% (рисунок 3). Активизация работы супероксиддисмутазы, возможно, связана, как с инициализацией фитогормонами экспрессии генов СОД, так и с увеличением образования активных форм кислорода (АФК) и, в частности, супероксидрадикала (O_2^-). В исследованиях на кукурузе [20] показано, что АБК способна инициировать экспрессию нескольких групп генов раннего ответа при действии стрессоров, в том числе, генов антиоксидантных ферментов, защищающих растение от перекисного окисления липидов. Кроме того, известно, что СОД нейтрализует супероксидрадикал, который образуется в результате, вызванных стрессом, нарушений в фотосистеме I в хлоропластах и на комплексах дыхательной цепи в митохондриях [21]. При взаимодействии СОД с O_2^- происходит образование перекиси водорода. В свою очередь H_2O_2 является не только менее токсичной формой активного кислорода чем O_2^- , но и субстратом для другого антиоксидантного фермента – пероксидазы. В наших исследованиях показано, что под воздействием высокой температуры активность пероксидазы в листьях вишни возросла на 50%.



1 – контроль, 2 – гипертермия, 3 – через 24 часа последствия гипертермии.

Рисунок – 3 Активность СОД в листьях вишни в условиях действия и последствий гипертермии

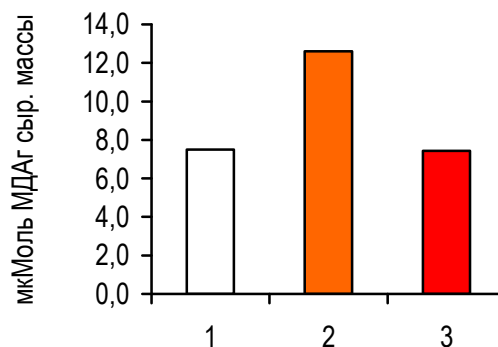
Вместе с тем известно, что при окислительном стрессе антиоксидантные ферменты могут инактивироваться активными формами кислорода и для восстановления их синтеза или работы требуется определенное время. В этом случае, на первый план выходят низкомолекулярные метаболиты-антиоксиданты: пролин, сорбит, сахара и др. [21]. Анализ содержания в листьях вишни пролина показал, что под воздействием гипертермии на фоне снижения соотношения ИУК/АБК, отмечено увеличение содержания данной аминокислоты на 40% по сравнению с контролем (рисунок 4). Среди совместимых метаболитов, аккумулирующихся в растениях при стрессах, только для пролина показан эффект «тушения» синглетного кислорода, образующегося в первые часы действия стрессора [16].



1 – контроль, 2 – гипертермия

Рисунок – 4 Содержание пролина в листьях вишни сорта Орлица в условиях действия гипертермии

Также представляло интерес изучить влияние гипертермии на липопероксидацию мембран (ПОЛ), которая инициируется свободными радикалами, образующимися в кислородпотребляющих биологических системах [3]. ПОЛ, как правило, усиливается в результате воздействия на организм стрессирующих факторов и приводит к нарушению функциональной и структурной целостности многих компонентов клетки [5]. Об интенсивности протекания ПОЛ большинство авторов судят по накоплению конечного продукта липопероксидации – малонового диальдегида (МДА) [8, 12]. В проведенных исследованиях на листьях вишни сорта Орлица показано, что под влиянием гипертермии происходит резкое (на 67% по сравнению с контролем) возрастание количества МДА, что может свидетельствовать о нарушении структурно-функционального состояния клеток (рисунок 5). Однако через 24 часа последствий стресса на фоне увеличения активности СОД, уровень МДА возвращается к значениям контрольного варианта.



1 – контроль, 2 – гипертермия, 3 – через 24 часа последствий гипертермии

Рисунок – 5 Содержание малонового диальдегида в листьях вишни Орлица в условиях действия и последствий гипертермии

Выводы

Специфическое изменение содержания и соотношения ИУК и АБК в листьях вишни под воздействием гипертермии, как видно, способствует активации и накоплению высокомолекулярных и низкомолекулярных антиоксидантов, в частности супероксиддисмутазы, пероксидазы и пролина. На фоне изменений в гормональной и антиоксидантной системе наблюдается снижение развития перекисного окисления мембранных липидов.

Литература

1. Барабой, В.А. Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голотин, Ю.Б. Кудряшов. – СПб.: Наука, 1992. – 148с.
2. Веселов, А.П. Гормональная и антиоксидантная системы при ответе растений на тепловой шок: автореф. дис. ... доктора биол. наук. – М.: ИФР им. К.А. Тимирязева РАН, 2001. – 39с.
3. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – М.: ВИНТИ, 1999. – Т. 29. – 249с.
4. Власов, П.В. Комплексный метод определения природных регуляторов роста. Первичный анализ незрелых семян кукурузы на активность свободных ауксинов, гиббереллинов и цитокининов / П.В. Власов, В.В. Мазин, Р.Х. Турецкая и др. // Физиология растений, 1979. – Т.26. – В. 3. – С. 648-655.

5. Горбунов, Н.В. Активация свободно-радикальных реакций и изменение состояния системы антиоксидантной защиты в крови при токсической экспериментальной гриппозной инфекции / Н.В. Горбунов, А.Н. Волгарев, И.В. Брайловская // Бюл. эксперим. биологии и медицины, 1992. – №7. – С. 42-44.
6. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – Москва: Агропромиздат, 1985. – 351с.
7. Ермаков, А.И. Методы биохимических исследований растений / А.И. Ермаков, И.П. Ярош и др. – Л.: Агропромиздат. Ленинградское отделение, 1987. – 429с.
8. Лукаткин, А.С. О развитии повреждений у растений кукурузы при внезапном и постепенном охлаждении / А.С. Лукаткин // Сельскохозяйственная биология, 2003. – №5. – С. 63-68.
9. Орлова, А.Г. Роль индолилуксусной кислоты в развитии ответной реакции зеленых и этиолированных проростков пшеницы на тепловой шок: автореф. ...дис. канд. биол. наук. – Нижний Новгород: НГУ, 2004. – 24с.
10. Полевой, В.В. Фитогормоны / В.В. Полевой. – Л.: ЛГУ, 1982. – 248с.
11. Полесская, О.Г. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде / О.Г. Полесская, Е.И. Каширина, Н.Д. Алехина // Физиология растений, 2004. – Т.51. – №5. – С. 686-691.
12. Прудников, П.С. Физиолого-биохимическая оценка устойчивости сливы и абрикоса к стрессовым факторам среды / П.С. Прудников, А.А. Попкова, Л.В. Голышкина, Е.Н. Джигадло // Ученые записки Орловского государственного университета, 2014. – №3. – Т.59. – С.122-125.
13. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии / под общей ред. Ореховича В.Н. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
14. Шевякова, Е. И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессе / Е.И. Шевякова // Физиология растений, 1983. – Т. 30. – В. 4. – С. 768-781.
15. Якушкина, Н.И. Энергетический обмен и рост растений / Особенности гормональной регуляции процессов обмена и темпов роста растений // Под ред. Якушкиной Н.И. – М.: Изд-во МОПИ им. Н.К. Крупской., 1983. – С. 3-11.
16. Alia, S. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage / S. Alia, P.P. Saradhi, P. Mohanty. // J. Photochem. Photobiol., 1997. – Т. 38. – P. 253-257. doi:10.1016/S1011-1344(96)07470-2
17. Bates, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L.S. Bates, R.P. Waldren, I.D. Teare // Plant and Soil, 1973. – Vol. 39. – P. 205-207
18. Dat, J. Dual Action of the active Oxygen Species during Plant Stress Responses / J. Dat, S. Vandenberghe, E. Vranjva, M. van Montagu, D. Inze, F. van Breusegem // Cell Mol. Live Sci., 2000. – V.57. – P.779-795.
19. Giannopolities, C.N. Superoxid dismutase: I. Occurrence in higher. / C.N. Giannopolities, S.K. Ries // Plant Physiol., 1977. – 59 – P. 309-314.
20. Guan, L. Effect of the plant growth regulation abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes / L. Guan, J.G. Scandalios // Physiologia Plantarum, 1998. – V. 104. – P. 413-422. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040317.x
21. Mittler, R. Oxidative Stress, Antioxidants, and Stress Tolerance / R. Mittler // Trends Plant Sci., 2002. – V.7. – P. 405-409. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)

22. Thimann, K.V. Hormone Action in the whole Life of Plants. / K.V. Thimann // Amherst. Universiti of Massachusetts Press, – 1977. – 448 p.

23. Xiang, C. Coordinate activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione-S-transferase gene by auxing, salicylic acid, methyljasmonate and hydrogen peroxide / C. Xiang, Z.H. Miao, E. Lam // Plant Molecular Biology, 1996. – V. 32. – P. 415-426.

References

1. Baraboi V.A., Brekhman I.I., Golotin V.G., Kudryashov Yu.B. (1992): Lipid peroxidation and stress. Saint Petersburg, Nauka. (in Russian).

2. Veselov A.P. (2001): Hormonal and antioxidant systems in plant response on heat shock [Biol. Sci. Doctoral Thesis]. Moscow, Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences. (in Russian).

3. Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deev A.I. (1999): Free radicals in natural systems. In: The results of science and technology. Biophysics. Moscow, VINITI, **29**: 3-250. (in Russian).

4. Vlasov P.V., Mazin V.V., Turetskaya R.Kh., Gus'kov A.V., Komizerko E.I., Lozhnikova V.N., Yanina L.Ya., Kof E.M., Konopskaya L.N., Sharipov G.D., Filonova V.P., Kefeli V.I. (1979): A complex method of determining natural regulators of growth. Initial analysis of unripe corn seeds for activity of uncombined auxins, gibberellins and cytokinins. *Fiziologiya rastenii (Plant physiology)*, **26**(3): 648-655. (in Russian).

5. Gorbunov N.V., Volgarev A.N., Brailovskaya I.V. (1992): Activation of free-radical reactions and change of condition of the system of antioxidant protection in blood under toxic experimental flu infection. *Byulleten Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny (Bulletin of experimental biology and medicine)*, **7**: 42-44. (in Russian).

6. Dospekhov B. A. (1985): Methods of the field experiment (on the base of statistical processing of investigation results). Agropromizdat, Moscow. (in Russian).

7. Methods of biochemical research of plants (1987): Ermakov A.I. et al. (ed.). Agropromizdat, Leningrad. (in Russian).

8. Lukatkin A.S. (2003): About development of injury in maize seedlings at sudden and gradual chilling. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya (Agricultural Biology)*, **5**: 63-68. (in Russian).

9. Orlova A.G. (2004): A role of indole-acetic acid in the development of reciprocal reaction of green and ethylened wheat plantlets on heat shock [Biol. Sci. Cand. Thesis]: Nizhny Novgorod, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. (in Russian).

10. Polevoi V.V. (1982): Phytohormones . Leningrad, Leningrad State Univ. (in Russian).

11. Polesskaya O.G., Kashirina E.I., Alekhina N.D. (2004): Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russian journal of plant physiology*, **51**(5): 615-620. DOI: 10.1023/B:RUPP.0000040746.66725.77.

12. Prudnikov P.S., Popkova A.A., Golyshkina L.V., Dzhigadlo E.N. (2014): Physiological and biochemical assessment of plum and apricot resistance to stress environmental factors. *Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Estestvennye, tekhnicheskie I meditsinskie nauki» (Scientific Notes of Orel State University. Series Natural, technical and medicalsciences)*, **3**: 122-125. (in Russian).

13. Stalnaya I.D., Garishvili T.G. (1977): Method of MDA determination with the help of thiobarbituric acid. In: Orekhovich V.N. (ed.) Contemporary methods in biochemistry. Moscow, Medizina: 66-68. (in Russian).

14. Shevyakova E.I. (1983): Metabolism and a physiological role of proline in plants under water and salt stress. *Fiziologiya rastenii (Plant Physiology)*, **30**(4): 768-781. (in Russian).
15. Yakushkina N.I. (1983): Energetic exchange and growth of plants. In: Yakushkina N.I. (ed.) Features of hormonal regulations of metabolism processes and growth rates of plants. Moscow, MOPI: 3-11. (in Russian).
16. Alia S., Saradhi P.P., Mohanty P. (1997): Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *J. Photochem. Photobiol.*, **38**: 253-257. doi:10.1016/S1011-1344(96)07470-2
17. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973): Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**: 205-207
18. Dat J., Vandenabeele S., Vranjva E. , van Montagu M., Inze D., van Breusegem F. (2000): Dual Action of the active Oxygen Species during Plant Stress Responses. *Cell Mol. Live Sci.*, **57**: 779-795.
19. Giannopolities C.N., Ries S.K. (1977): Superoxid dismutase: I. Occurrence in higher. *Plant Physiol.*, **59**: 309-314.
20. Guan L., Scandalios J.G. (1998): Effect of the plant growth regulation abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. *Physiologia Plantarum*, **104**: 413-422. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040317.x
21. Mittler R. Oxidative Stress, Antioxidants, and Stress Tolerance (2002): *Trends Plant Sci.*, **7**: 405-409. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
22. Thimann K.V. (1977): Hormone Action in the whole Life of Plants. Amherst. Universiti of Massachusetts Press. 448 p.
23. Xiang C. Miao Z.H., Lam E. (1996): Coordinate activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione-S-transferase gene by auxing, salicylic acid, methyljasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Molecular Biology*, **32**: 415-426.