

УДК 581.13.04

ВЛИЯНИЕ КИНЕТИНА И ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ПРОДУКЦИЮ АФК В РАСТЕНИЯХ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ CO₂

© А.Н. Ершова, О.С. Бердникова

Ключевые слова: гипоксия; CO₂-среда; АФК; фитогормоны; горох; соя.

При исследовании влияния кинетина и эпибрасинолида (10 мг/л) в растениях гороха и сои в условиях гипоксии и CO₂-среды было показано, что предобработка проростков фитогормонами снижала концентрацию супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в 1,5–2 раза как в неустойчивых проростках гороха, так и в среднеустойчивых к дефициту кислорода проростках сои. Предобработка эпибрасинолидом приводила к большему снижению процессов свободнорадикального окисления.

ВВЕДЕНИЕ

При действии неблагоприятных факторов внешней среды, включая гипоксию, в растениях усиливаются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1]. Известно, что основным субстратом ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты. Отмечено [2], что процессы перекисидации липидов могут протекать в растениях в условиях гипо- и аноксии, но значительно возрастают при возвращении растений на воздух. В то же время в ряде работ [3] отмечено усиление процессов ПОЛ даже в условиях кратковременной (до суток) гипоксии. При этом высокие концентрации диоксида углерода усиливали эффекты гипоксии [1]. Возрастание скорости ПОЛ в растениях связано с процессами образования *активных форм кислорода* (АФК), таких как супероксидные анион-радикалы, гидроксильные радикалы, пероксид водорода. АФК образовывались в растениях в обычных условиях, но под действием неблагоприятных факторов среды, включая дефицит кислорода, их концентрация в клетках могла значительно возрастать [3]. Высокие концентрации АФК в клетках могут вызывать нарушения в структуре биологических мембран, усиливать окислительный распад белков, нуклеиновых кислот и одновременно процессы ПОЛ и вместе с тем могут выступать в роли сигнальных молекул [4–5].

Фитогормоны обладают высокой биологической активностью, участвуя в регуляции процессов роста и развития растений [6]. При этом цитокинины стимулируют клеточное деление и дифференцировку, задерживают процессы старения [7]. В то же время брасиностероиды влияют на активность ферментов, синтез белков, нуклеиновых кислот [8] и способны снижать степень повреждения растений при действии стрессовых факторов [9]. Показано [10], что под влиянием эпибрасинолида (ЭБ) в листьях растений картофеля снижалась скорость процессов ПОЛ и увеличивалась активность антиоксидантных ферментов. Установлено [11], что предобработка растений ЭБ и кинетином подавляла процессы образования МДА, диеновых конъюгатов, являющихся продуктами ПОЛ, и это было особенно характерно для условий гипоксического стресса

и CO₂-среды. Однако не изучались процессы образования разных типов АФК, которые также способствуют усилению процессов ПОЛ в растениях в условиях дефицита кислорода.

Изучали влияние фитогормонов кинетина и ЭБ на интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) и накопление разных типов АФК у растений, отличающихся устойчивостью, в условиях кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций CO₂.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 10-дневные проростки гороха (неустойчивые) сорта «Рамонский 77» и сои (устойчивые) сорта «Белгородская 48», выращенные на свету гидропонным способом при 12-часовом фотопериоде. В надземную часть проростков с транспирационным током в темноте вводили в течение 12 ч растворы кинетина и ЭБ (10 мг/л), и далее помещали в условия газовых сред: воздух (контроль), азот и CO₂ из баллонов. Интенсивность свободнорадикального окисления в клетках растений определяли железо-индуцированной хемилюминесценцией по описанному ранее методу [3].

Содержание супероксидного анион-радикала в тканевых гомогенатах оценивали по накоплению адrenoхрома [12]. Оптическую плотность растворов измеряли на СФ-56 («ЛЮМО», Россия) при 480 нм. Содержание супероксидного анион-радикала рассчитывали, используя коэффициент экстинкции ($\epsilon = 4020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Содержание пероксида водорода определяли спектрофотометрически с использованием пероксидазы и о-дианизидина и рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции ($\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Все определения проводились в двух биологических и двух аналитических повторностях. В табл. 1, 2 и на рис. 1, 2 представлены данные типичных опытов в виде средних арифметических значений и их отклонений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивность процессов ПОЛ в растениях можно определить с помощью хемилюминесценции [Влади-

Таблица 1

Интенсивность свободнорадикального окисления в растениях гороха в присутствии фитогормонов

	3 ч			6 ч			24 ч		
	Без фитог.	Кинетин	ЭБ	Без фитог.	Кинетин	ЭБ	Без фитог.	Кинетин	ЭБ
Воздух									
$I_{\max}$	517,4 ± 22,0 (100 %)	402,9 ± 7,8 (78 %)	344,8 ± 30,4 (67 %)	467,3 ± 41,0 (100 %)	455,4 ± 43,2 (97 %)	408,4 ± 34,0 (87 %)	262,4 ± 21,1 (100 %)	317,9 ± 22,8 (121 %)	311,5 ± 40,4 (119 %)
k	0,17 ± 0,005	0,18 ± 0,007	0,16 ± 0,006	0,20 ± 0,001	0,22 ± 0,001	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01
Гипоксия									
$I_{\max}$	453,8 ± 21,0 (88 %)	511,2 ± 46,0 (99 %)	421,9 ± 56,4 (82 %)	493,2 ± 37,0 (106 %)	450,6 ± 15,8 (96 %)	428,7 ± 15,3 (92 %)	380,8 ± 40,7 (145 %)	379,1 ± 5,1 (144 %)	395,5 ± 50,0 (150 %)
k	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,013	0,18 ± 0,005	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,006	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,007	0,16 ± 0,01
CO ₂ -среда									
$I_{\max}$	526,5 ± 35,0 (102 %)	450,9 ± 17,0 (87 %)	368,3 ± 5,0 (71 %)	533,0 ± 39,5 (114 %)	568,4 ± 12,8 (122 %)	356,7 ± 3,4 (76 %)	422,5 ± 15,0 (161 %)	314,4 ± 27,2 (120 %)	423,1 ± 10,3 (161 %)
k	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,012	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,008	0,13 ± 0,004	0,16 ± 0,01

Таблица 2

Интенсивность свободнорадикального окисления в растениях сои в присутствии фитогормонов

	3 ч			6 ч			24 ч		
	Без фитог.	Кинетин	ЭБ	Без фитог.	Кинетин	ЭБ	Без фитог.	Кинетин	ЭБ
Воздух									
$I_{\max}$	742,5 ± 16,5 (100 %)	731,5 ± 45,5 (99 %)	445,6 ± 24,6 (60 %)	272,7 ± 52,3 (100 %)	898,1 ± 93,8 (329 %)	698,6 ± 91,0 (256 %)	342,1 ± 9,5 (100 %)	394,2 ± 11,6 (115 %)	370,3 ± 40,4 (108 %)
k	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,30 ± 0,034	0,27 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Гипоксия									
$I_{\max}$	340,8 ± 35,5 (46 %)	286,9 ± 45,0 (39 %)	406,3 ± 54,9 (55 %)	481,6 ± 58,5 (177 %)	480,5 ± 93,1 (176 %)	868,2 ± 90,0 (318 %)	310,4 ± 19,3 (91 %)	479,2 ± 48,0 (140 %)	640,4 ± 131,6 (187 %)
k	0,22 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,01
CO ₂ -среда									
$I_{\max}$	236,5 ± 29,5 (32 %)	647,2 ± 23,6 (87 %)	543,4 ± 61,0 (73 %)	1021,2 ± 1,6 (374 %)	820,9 ± 90,9 (301 %)	876,3 ± 30,5 (321 %)	556,4 ± 50,7 (163 %)	614,9 ± 9,6 (180 %)	534,3 ± 81,4 (156 %)
k	0,16 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01

миров, Проскурина, 2009] по скорости образования свободных радикалов в их клетках. При этом обычно используют метод железо-индуцированной хемилюминесценции, отмечая быструю вспышку свечения ($I_{\max}$), которая переходит в стационарное и медленное свечение, характеризующееся показателем светосуммы (S). В тканевых гомогенатах растений определяли максимальную интенсивность сигнала ($I_{\max}$), светосумму (S) и коэффициент k , показывающий отношение $I_{\max}/S$. Полученные величины интенсивности СРО в растениях гороха и сои приведены в табл. 1, 2.

Как видно из данных табл. 1, в тканях растений гороха в первые часы опыта не отмечалось повышения интенсивности СРО. Однако к 6 ч оно несколько возросло, на что указывало повышение величины $I_{\max}$ у растений при действии гипоксии и CO₂-среды. К 24 ч эти показатели в клетках растений гороха увеличились при действии гипоксии на 45 и 60 % в условиях CO₂-среды. Обработка проростков гороха кинетином несколько снизила скорость этих процессов, при этом особенно значительно это проявилось при действии на растения CO₂-среды. В то же время при введении ЭБ в растения гороха при действии гипоксии этого не происходило, однако в среде CO₂ эти процессы снижались почти на 40 %. При этом падала и величина коэффициента k , которая также характеризует интенсивность СРО у растений.

В клетках более устойчивых растений сои (табл. 2) интенсивность СРО была ниже, чем у аэрируемых растений на 50–70 % в первые часы действия газовых сред. Значительное повышение интенсивности СРО наблюдалось к 6 ч действия газовых сред. В условиях CO₂-среды в растениях сои показатель $I_{\max}$ возрастал почти в 3,5 раза. К концу опыта интенсивность СРО у растений сои в условиях гипоксии оставалась на уровне аэрируемых растений, а в CO₂-среде превышала его на 60 %. Обработка растений кинетином значительно снижала показатели СРО в клетках растений при действии CO₂-среды почти на 70 %. Обработка растений сои ЭБ в условиях гипоксического стресса и CO₂-среды привела и к снижению коэффициента k .

В дальнейших опытах было проанализировано содержание в клетках растений отдельных представителей АФК, таких как супероксидный анион-радикал и пероксид водорода. В клетках проростков гороха (рис. 1) содержание супероксидного анион-радикала при действии гипоксии через 6 ч возросло на 60 %, а CO₂-среды почти в 2 раза и оставалось таким до конца всего опыта. При обработке растений кинетином отмечалось снижение уровня O₂. Через 6 ч оно падало у растений в условиях гипоксии на 50 %, а CO₂-среды почти в 2 раза. Под действием ЭБ образование супероксида снижалось более существенно, чем при обработке растений кинетином. У растений гороха ЭБ вы-

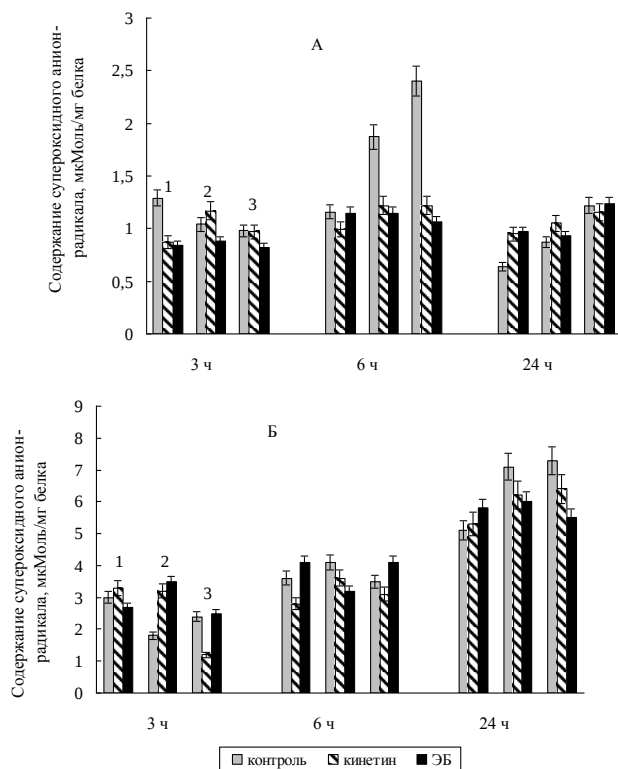


Рис. 1. Влияние фитогормонов на содержание супероксидного анион-радикала в клетках растений гороха (А) и сои (Б) при действии различных газовых сред (1 – аэрация; 2 – гипоксия; 3 – CO_2 -среда)

зывал падение уровня супероксида в условиях гипоксии на 70 %, а в CO_2 -среде более чем в 2 раза. К концу опыта ЭБ не оказывал столь значительного влияния на содержание супероксида в клетках проростков гороха, однако его действие проявлялось в проростках сои в условиях как гипоксии, так и CO_2 -среды.

Содержание пероксида водорода – наиболее стабильной формы АФК – в клетках растений гороха возрастало на 30–50 % во все сроки действия гипоксии, а в CO_2 -среде почти в 3,5 раза. Предобработка растений гороха кинетином снижала уровень пероксида водорода на 40–50 %, и этот эффект действия сохранялся до конца опыта. Фитогормон ЭБ оказывал подобное влияние на содержание в клетках пероксида водорода. Под действием ЭБ уровень пероксида водорода в условиях гипоксии в клетках проростков гороха снижался на 40–60 %, а к концу опыта уже в 2 раза. При действии на растения CO_2 -среды это падение было столь же существенным.

В клетках среднеустойчивых растений сои накопление пероксида водорода происходило на более поздних этапах действия газовых сред. При этом к концу опыта его концентрация снова падала до уровня контроля. При обработке кинетином содержание пероксида водорода в растениях на протяжении всего опыта было близко к контролю в отличие от неустойчивых растений гороха. Предобработка растений сои ЭБ также вызвала снижение уровня пероксида почти в 2 раза, особенно при 6-часовой экспозиции.

Полученные нами данные по влиянию фитогормонов кинетина и ЭБ на СРО совпадают с результатами

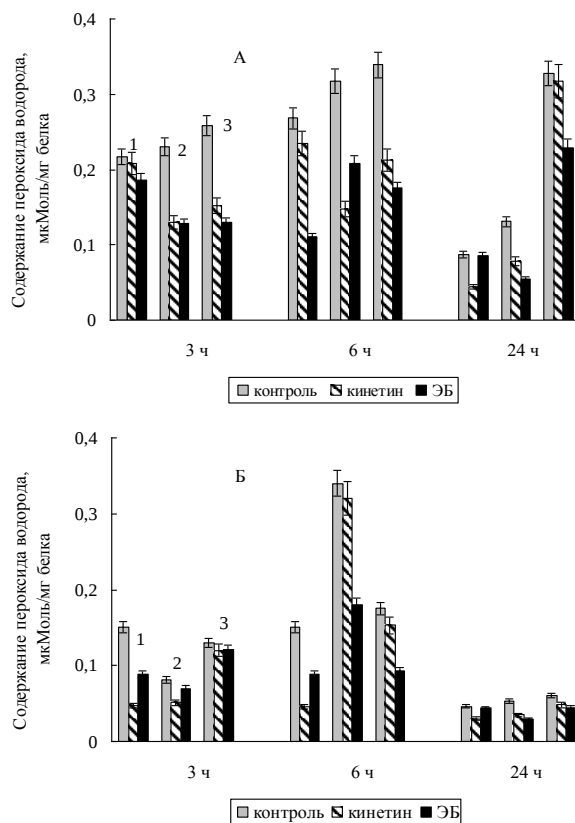


Рис. 2. Влияние фитогормонов на содержание пероксида водорода в клетках растений гороха (А) и сои (Б) при действии различных газовых сред (1 – аэрация; 2 – гипоксия; 3 – CO_2 -среда)

предыдущих работ, в которых было отмечено, что данные фитогормоны могут тормозить процессы ПОЛ, активирующиеся у растений в условиях гипоксического стресса [11]. При этом как кинетин, так и ЭБ проявляли также и способность регулировать скорость образования разных типов АФК, которые вызывают процессы окислительного распада мембранных фосфолипидов. Можно предположить, что это способствует повышению пластичности мембран, а следовательно, и устойчивости растений к условиям гипоксического стресса и среды высоких концентраций диоксида углерода.

ВЫВОДЫ

Проведенные нами опыты показали, что в условиях гипоксии в клетках растений, как гороха, так и сои, повышается скорость СРО и одновременно возрастает концентрация различных типов АФК, включая супероксидный анион-радикал и пероксид водорода. Обработка растений фитогормонами кинетином и ЭБ уменьшала интенсивность свободнорадикального окисления в клетках как неустойчивых проростков гороха, так и более устойчивых проростков сои в условиях действия кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода. Это вызывало и существенное снижение содержания супероксида и пероксида водорода в клетках данных растений в условиях гипоксического стресса и CO_2 -среды. Можно предположить,

что падение скорости СРО и образования АФК под действием данных фитогормонов повышает устойчивость растений к действию гипоксии и CO₂-среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ершова А.Н.* Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. пед. ун-та, 2007. 264 с.
2. *Blokhina O.B., Virolainen E., Fagerstedt K.V.* Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: review // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. № 2. P. 179-194.
3. *Ершова А.Н., Попова Н.В., Бердникова О.С.* Продукция активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений гороха и сои при действии гипоксии и CO₂-среды // *Физиология растений.* 2011. Т. 58. № 6. С. 834-843.
4. *Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В.* Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // *Физиология и биохимия культ. растений.* 2009. Т. 41. № 2. С. 95-108.
5. *Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В.* Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. № 2. С. 163-178.
6. *Santner A., Estelle M.* Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling // *Nature.* 2009. V. 459. № 7250. P. 1071-1078.
7. *Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку? // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. № 2. С. 295-319.
8. *Хайят Ш., Ядав С., Али Б., Ахмад А.* Взаимодействие окиси азота и брассиностероидов при их влиянии на фотосинтез и антиоксидантную систему томата // *Физиология растений.* 2010. Т. 57. № 2. С. 224-233.
9. *Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Фатхутдинова Р.А., Урусов Ф.А., Сафутдинова Ю.В., Шакирова Ф.М.* Влияние 24-эпибрасинолида на гормональный статус растений пшеницы при действии хлорида натрия // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 1. С. 109-112.
10. *Кириллова И.Г., Бобровская О.А.* Действие регуляторов роста эпибрасинолида и мелафена на физиолого-биохимические процессы растения картофеля // *Ученые записки ОГУ. Серия Естественные, технические и медицинские науки.* 2009. № 4. С. 25-29.
11. *Ершова А.Н., Хрипач В.А.* Влияние эпибрасинолида на процессы перекисного окисления липидов *Pisum sativum* в нормальных условиях и при кислородном стрессе // *Физиология растений.* 1996. Т. 43. № 6. С. 870-873.
12. *Часов А.В., Гордон Л.Х., Колесников О.П., Минабаева Ф.В.* Пероксидаза клеточной поверхности – генератор супероксид-аниона в корневых клетках пшеницы при раневом стрессе // *Цитология.* 2002. Т. 44. С. 691-696.

Поступила в редакцию 18 сентября 2013 г.

Ershova A.N., Berdnikova O.S. EFFECTS OF KINETIN AND EPIBRASSINOLIDE ON ROS PRODUCTION IN PLANTS UNDER HYPOXIA AND HIGH CONCENTRATION OF CO₂

When studying the effect of kinetin and epibrassinolide (10 mg/L) in pea and soy plants in conditions of hypoxia and CO₂-media it was shown that pretreatment of seedlings phytohormones reduced concentration of superoxide radical anion and hydrogen peroxide in 1,5–2 times as in the unstable pea seedlings, and in sredneustoychivyh to oxygen deficiency of soybean seedlings. Pretreatment epibrassinolide led to greater reduction of free radical oxidation.

Key words: hypoxia; CO₂-media; ROS; plant hormones; pea; soy.