

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 581.1

**ХОЛОД-ИНДУЦИРОВАННАЯ ДИНАМИКА
АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ
ПРОРОСТКОВ РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ
ПО МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ**

*Й.Р. Абдрахимова, М.Г. Тимофеева, А.Р. Вильданова, И.Д. Фадеева,
А.Дж. Анвар, Ф.А. Абдрахимов, Т.В. Багаева*

Аннотация

Исследованы изменения антиоксидантного статуса клеток тканей этиолированных проростков озимой (сорта Мироновская 808 и Казанская 285) и яровой (сорт Керба) форм пшеницы *Triticum aestivum* L. в зависимости от их способности к низкотемпературному закаливанию (4–5 °С, 3 сут). Степень исходной и холод-индуцируемой терморезистентности определяли по экзоосмосу электролитов после тестирующего промораживания (–15 °С, 2 ч). Установлены фазность и сортоспецифичность динамики изменений изучаемых параметров с повышением к 3-м суткам гипотермии содержания пероксида водорода, более выраженным (почти в 2 раза) у проростков ярового сорта. При этом у всех сортов выявлена значительная степень корреляции содержания H_2O_2 с активностью каталазы (в среднем $r = +0.6$). Повышенная чувствительность к гипотермии проростков ярового сорта, диагностируемая по ранним изменениям показателей, не обеспечивала статистически достоверного прироста их терморезистентности. По сравнению с другими сортами растения Казанской 285 характеризовались низкими содержанием H_2O_2 и активностями антиоксидантных ферментов, а также проницаемостью мембран как до, так и после холодового закаливания и криостресса. По данным многолетних опытов разница между морозо- и зимостойкостью полевых растений изучаемых сортов озимой пшеницы достигала 20%. Полученные результаты свидетельствуют о проявлении генетически детерминированной способности этиолированных проростков озимой пшеницы к холодовому закаливанию, адекватно отражающем разную степень морозоустойчивости полевых растений.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., этиолированные проростки, низкие температуры, пероксид водорода, антиоксидантные системы, проницаемость мембран, морозоустойчивость.

Введение

Известно, что следствием аэробного типа метаболизма большинства живых существ является генерация в клетке активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. АФК входит в обширный класс так называемых активированных кислородных метаболитов, появляющихся в результате неполного восстановления молекулы

O₂ преимущественно при функционировании электронтранспортных цепей [1–3]. Обычный в норме метаболический процесс образования АФК может провоцировать при определенных условиях окислительный стресс, смещая редокс-статус клеток в состояние превалирования прооксидантов над антиоксидантами. Такое явление часто происходит при действии стресс-факторов различной природы, в том числе низких температур, причем повышение уровня АФК играет двойственную роль. С одной стороны, АФК обладают высокой биологической активностью и участвуют в системе меж- и внутриклеточного сигналинга, запуская экспрессию защитных генов [2–4]. Недавно установлено, что в качестве сенсоров пероксида водорода могут служить факторы транскрипции генов теплового шока (HsfA8 и HsfA4), которые посредством H₂O₂ формируют активные гомотримеры с высокой аффинностью к регуляторным элементам промоторов генов стрессового ответа [4]. С другой стороны, нарастающее количество АФК при недостаточности антиоксидантной защиты является первопричиной повреждения белков и ДНК, а также неконтролируемого увеличения проницаемости мембран, что может приводить к гибели клеток [5, 6]. Отсюда выявление взаимосвязи между стресс-индуцированными изменениями концентрации АФК в клетках и количеством и/или активностью высоко- и низкомолекулярных антиоксидантов приобретает важное теоретическое и практическое значение.

Показано, что первыми по времени на действие низких температур реагируют каталаза (КАТ) и аскорбатпероксидаза (АПО) – ферменты, непосредственно участвующие в нейтрализации пероксида водорода, что, в свою очередь, указывает на активную генерацию последней при гипотермии [7]. Каталаза, в отличие от пероксидаз, имеет низкое сродство к субстрату и работает при высоких концентрациях H₂O₂, тем самым эффективно противодействуя окислительному стрессу [2, 8]. В настоящее время развивается представление, согласно которому степень холодоустойчивости растений в значительной степени коррелирует с активностью каталазы, а основное отличие холодоустойчивых растений от теплолюбивых состоит в том, что у первых образование АФК при охлаждении не приводит к возникновению окислительного стресса [6, 8, 9]. Однако исследования по антиоксидантному статусу клеток разных видов и/или сортов с отличающимся уровнем морозоустойчивости практически отсутствуют. В целом в литературе представлена неоднозначность реакции компонентов антиоксидантной системы, особенно ферментов, на действие низких температур, зависящей от видовой и сортовой принадлежности, возраста объектов, продолжительности действия стресс-фактора и т. д. В связи с этим целью работы было выявление динамики и взаимосвязи изменений некоторых характеристик редокс-статуса клеток проростков сортов яровой и озимой пшеницы, различающихся уровнем морозоустойчивости.

Объекты и методы

Объектом исследований служили этиолированных побеги (колеоптиль + зародышевый лист) проростков яровой (сорт Керб) и озимой (сорта Мироновская 808 и Казанская 285) форм пшеницы *Triticum aestivum* L.

Сорт озимой пшеницы Мироновская 808 был выведен в 60-е годы XX в. и долгое время оставался стандартом морозоустойчивости, его также отличают

высокая экологическая пластичность и ценные биологические качества [10, 11]. В настоящее время этот сорт в Республике Татарстан (РТ) не возделывается и сохраняется только в коллекционных посевах [11, 12]. Сравнение проводили с яровым сортом Керба, который происходит от скрещивания Мироновской 808 с мексиканским карликовым сортом К47336 и должен, вероятнее всего, иметь пониженный уровень морозоустойчивости. Эти сорта сопоставляли с созданным и районированным в РТ сортом озимой пшеницы Казанская 285, который характеризуется более высоким уровнем зимо- и морозостойкости по сравнению с выведенным в Украине сортом Мироновская 808 [11, 12]. Семена были предоставлены ГНУ «Татарский НИИСХ» РАСХН (г. Казань).

Растения выращивали гидропонным способом в темноте в течение 3 сут при 23–24 °С (контроль), часть из них подвергали холодовому воздействию различной длительности (4–5 °С, до 3 сут) (опыт). Спектрофотометрическое определение содержания пероксида водорода проводили с помощью красителя Xylenol Orange [13], количества аскорбиновой кислоты (АК) – гексацианоферрита калия [14]. Активности каталазы и аскорбатпероксидазы определяли согласно методикам, подробно описанным соответственно в [9] и [15]. Содержание белка оценивали по методу Лоури и др. [16].

Оценку барьерных свойств мембран, а также степени морозоустойчивости незакаленных и закаленных к холоду (в течение 3 сут) проростков проводили по экзосмосу электролитов из тканей до и после тестирующего промораживания (–15 °С, 2 ч) [17].

Перезимовку, комплексно характеризующую морозо- и зимостойкость, полевых растений изучаемых сортов озимой пшеницы оценивали согласно методике ВИР [18]. Количество выживших растений от их общего числа подсчитывали после схода снега в начале весенней вегетации на пробных площадках делянок, посеянных в 4-кратной повторности общей площадью 100 м², на опытных полях ГНУ «Татарский НИИСХ» РАСХН.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы «Пакет анализа» (Excel). На рисунках представлены средние арифметические величины и их стандартные отклонения.

2. Результаты и их обсуждение

Результаты наших исследований показали, что холод-индуцированные изменения содержания пероксида водорода в тканях этиолированных проростков пшеницы изучаемых сортов носили фазный характер с первоначальным повышением к 30-й минуте – 3-му часу гипотермии, которое после кратковременного снижения до исходных (контрольных) уровней вновь сменялось увеличением (рис. 1). Как известно, одной из ранних ответных реакций клеток на действие стресс-факторов различной природы является активация свободнорадикальных процессов [2, 4]. В данной связи следует учитывать тот факт, что понижение температуры среды способствует повышению растворимости кислорода в жидкой фазе. Например, если при 24 °С растворимость кислорода в дистиллированной воде составляет около 260 мкМ, то при 4 °С – 410 мкМ [20]. Эти концентрации приходятся на диапазон экспоненциального роста скорости образования супероксид-аниона [1], основной вклад в который вносит функционирование

цепей переноса электронов. Супероксидный радикал, как правило, превращается в более долгоживущую форму АФК – пероксид водорода, которая выполняет регуляторную функцию в последующей перестройке обмена клеток и организма в целом на новый режим в стрессовых условиях существования [2, 4].

Судя по заметному повышению содержания H_2O_2 к 30-й минуте действия пониженных температур (почти на 30%), первыми реагировали проростки сорта Керба. Реакция проростков озимых сортов проявлялась позже: к 1-му часу холодового воздействия у сорта Мироновская 808 и к 3-му часу – у сорта Казанская 285 (рис. 1). Следовательно, наиболее ранняя инициация холодом образования АФК была выявлена для проростков ярового сорта, тогда как для озимых сортов было характерно некоторое запаздывание данного процесса. Описанная динамика может быть связана с разной конститутивной мощностью антиоксидантной системы, которая в начальные моменты действия низких температур позволяет сдерживать развитие окислительного стресса. Однако к 3-м суткам гипотермии повышение содержания H_2O_2 по сравнению с исходным уровнем наблюдали у всех изучаемых сортов, причем в наибольшей степени оно было у сорта Керба – на 100% от контроля напротив 40–50% у озимых (рис. 1). Это говорит о дальнейшем холод-обусловленном усилении генерации АФК, для компенсации которого, по-видимому, необходимо увеличение мощности антиоксидантной системы. В качестве сортовых особенностей следует в первую очередь выделить повышенный уровень содержания H_2O_2 для тканей как контрольных, так и закаливающих к холоду проростков Мироновской 808 по сравнению с другими сортами (рис. 1).

Стресс-индуцированная генерация пероксида водорода хорошо описана в литературе, в том числе для тканей проростков пшеницы, например, при действии засухи [21, 22], УФ-Б-облучения [22] и т. д. Представленные нами абсолютные значения тканевого содержания H_2O_2 (рис. 1) сходны с результатами, полученными А.В. Бояршиновым с соавторами для зеленых листьев яровой пшеницы, для которых исходные значения 3–4 мкмоль H_2O_2 на 1 г сырого веса после 2 ч засухи возрастали в 2–2.5 раза [21].

Содержание АФК в клетках, как известно, регулируется «хорошо эшелонированной» [2, 3] системой низко- и высокомолекулярных антиоксидантов, к числу последних относятся антиокислительные ферменты. При этом особый интерес представляют субстрат-ферментные взаимоотношения, так как флуктуации содержания АФК могут вызывать повышение активности и/или содержания антиоксидантных ферментов, с одной стороны, и быть результатом этих индуцированных альтераций, с другой. Следует также отметить, что в литературе нет единой системы представления параметров антиоксидантной системы, что привносит дополнительные сложности при обсуждении и интерпретации экспериментальных данных.

Для сравнения нами приведены кривые динамики активности каталазы, рассчитанные как на 1 мг белка (рис. 2, а), так и 1 г сырого веса (рис. 2, б). Из представленных данных видно, что заметные различия в характере кривых в зависимости от расчетов проявляются в основном после 3 ч гипотермии. Так, при расчете активности каталазы на 1 мг белка в тканях проростков сорта Мироновская 808 она резко повышается, а у других сортов колеблется на уровне контроля

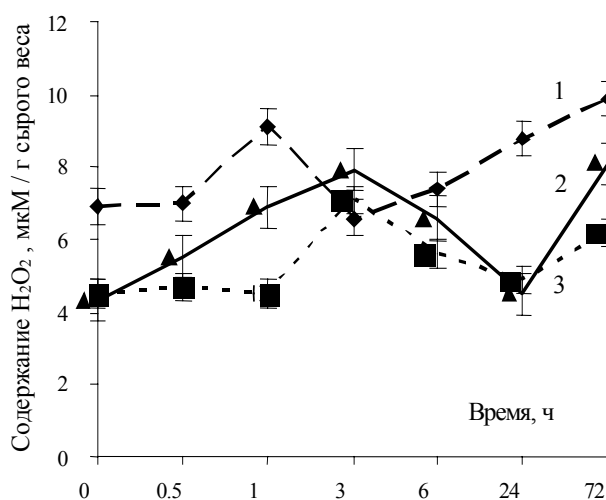


Рис. 1. Изменения содержания H_2O_2 при разной длительности гипотермии в тканях проростков пшеницы разных сортов: 1 – Мионовская 808, 2 – Керба, 3 – Казанская 285

и даже понижается (рис. 2, *a*). Следовательно, активность каталазы зависела от содержания H_2O_2 и к 3-м суткам холодого закаливания увеличивалась в ряду Казанская 285 → Керба → Мионовская 808. Яровой сорт занимает промежуточное положение, а в начале холодого воздействия (с 30 мин до 3 ч) активность фермента была аналогична его активности у сорта Мионовская 808. В дальнейшем показатели этих близкородственных сортов вели себя по-разному: активность каталазы озимого сорта поддерживалась на высоком уровне, а у ярового – она существенно снижалась до 6 ч (рис. 2, *б*) или 24 ч (рис. 2, *a*) гипотермии, компенсируясь только к концу опытов.

При пересчете на весовую единицу динамика изменений была другой: во всех случаях наблюдали увеличение показателей к 3-м суткам гипотермии, а у родственных сортов Мионовская 808 и Керба – их выравнивание (рис. 2, *б*). Сравнение данных в двух системах расчетов показало, что сортоспецифичные холодиндуцированные изменения были более выражены при расчете активности каталазы на 1 мг белка. Наши данные подтверждают имеющееся в литературе положение, что стресс-индуцированные изменения активности ферментов могут быть обусловлены процессами биосинтеза и деградации белков и/или изменениями их кинетических свойств [23]. Например, в тканях проростков сорта Казанская 285 активность каталазы (на 1 мг белка) резко снижается к 1-му часу гипотермии при неизменном уровне при пересчете на единицу сырой массы (ср. рис. 2, *a* и *б*). Можно предположить, что падение функциональной активности отдельных ферментных систем, по-видимому, компенсируется их амплификацией, поддерживая тем самым стабильный общий уровень в ткани. В целом для Казанской 285 и Кербы в большей степени, чем для Мионовской 808, было характерно усиление мощности ферментной системы антиоксидантной защиты компенсаторного типа, поскольку кинетическая активность самих ферментов достоверно не увеличивалась (рис. 2, *a*). При этом пик активности каталазы обнаруживали к 3-му часу гипотермии у сорта Керба, к 6-му часу – у Казанской 285 (рис. 2 *a*, *б*), что аналогично изменениям содержания H_2O_2 свидетельствует о более ранней

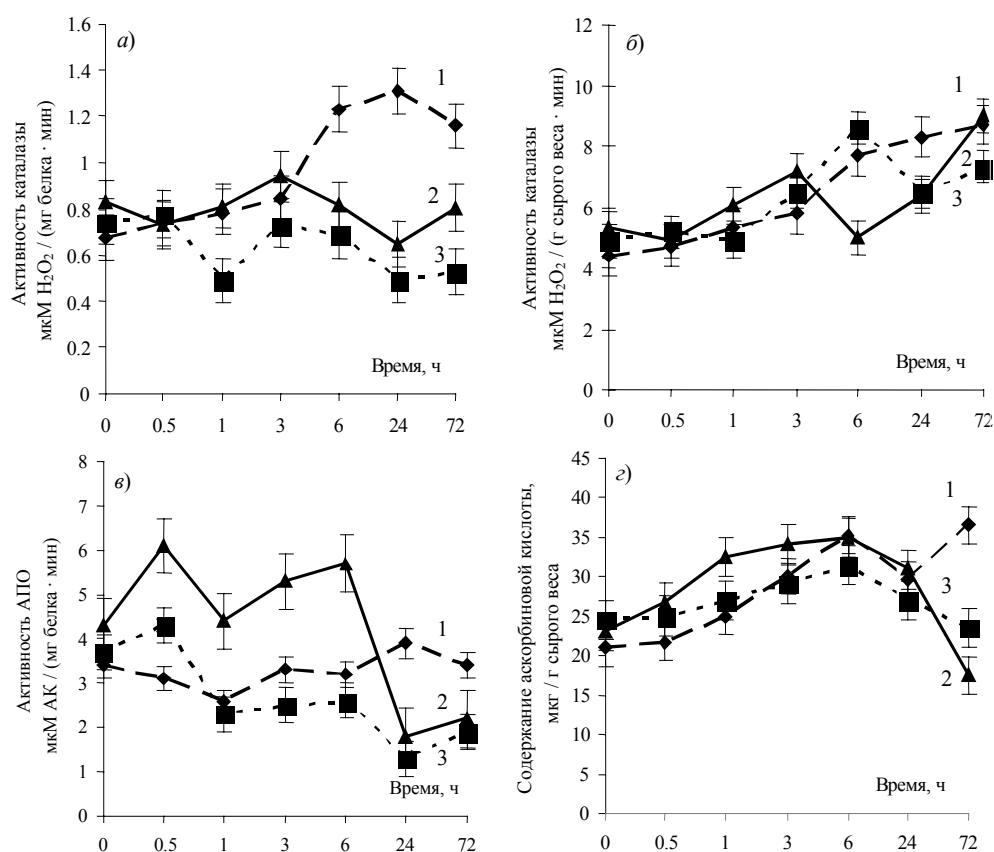


Рис. 2. Динамика активностей каталазы (а, б) и аскорбатпероксидазы (в), а также содержания аскорбиновой кислоты (г) в проростках пшеницы при разной длительности действия низких температур: 1 – Мироновская 808, 2 – Керба, 3 – Казанская 285

реакции, а значит, высокой чувствительности к действию стресс-фактора ярового сорта по сравнению с озимым. В случае Мироновской 808, когда динамика изменений в разных системах расчетов была сходной (рис. 2, а и б), вероятно, происходило резкое повышение активности самих ферментов вследствие постоянного подъема концентрации пероксида водорода после 3 ч действия низких температур (рис. 1) и/или увеличения относительной доли каталазы в общем содержании белка. Корреляционный анализ позволил выявить тесную взаимозависимость активности каталазы с содержанием пероксида водорода у всех изучаемых сортов: $r = +0.57$ ($p < 0.007$) – для Мироновской 808, $r = +0.59$ ($p < 0.005$) – для Кербы и $r = +0.67$ ($p < 0.001$) – для Казанской 285.

Как отмечалось выше, в литературе все больше накапливается фактов, свидетельствующих о том, что охлаждение теплолюбивых растений вызывает значительное снижение активности каталазы по сравнению с холодоустойчивыми видами, когда она возрастает или не изменяется [8, 9]. Это является одной из причин развития окислительного стресса у первых, поскольку антиоксидантная защита клеток запаздывает по времени или выполняет свои функции, когда уже запустились каскадные механизмы перекисного окисления липидов и нарушения

на мембранном уровне [2, 5, 8]. Судя по нашим данным, активность каталазы, рассчитанная на единицу массы, при низкотемпературном закаливании этиолированных проростков как яровой, так и озимой форм пшеницы в основном увеличивалась и не снижалась ниже контрольного уровня. С другой стороны, кинетическая активность фермента была заметно ниже при гипотермии у районированной в нашей климатической зоне озимой пшеницы Казанская 285 по сравнению с таковой даже ярового сорта Керба. В данном случае динамика изменений, по-видимому, отражала зависимость активности фермента от тканевой концентрации его субстрата, что подтверждается представленной выше более высокой степенью корреляции изучаемых показателей.

Аскорбатпероксидаза (АПО) является ключевым ферментом так называемого аскорбат-глутатионового цикла, осуществляющего тонкий контроль редокс-статуса клетки, с одной стороны, и регенерации восстановленной АК, с другой [3, 23]. Кривые активности АПО представлены в одной из систем расчетов (рис. 2, в), так как в зависимости от этого их характер существенно не различался. В отличие от каталазы активность АПО оставалась относительно стабильной у озимых сортов, особенно Мироновской 808 (рис. 2, в). В противоположность этому, активность АПО у ярового сорта Керба была подвержена колебаниям и увеличивалась уже к 30-й минуте действия гипотермии почти на 50% от контроля. Это согласуется с тем фактом, что именно у ярового сорта раньше других регистрировали повышение содержания H_2O_2 (рис. 1). Поскольку АПО имеет более высокое сродство к H_2O_2 , чем каталаза [2, 3], в отличие от последней она реагировала даже на небольшое повышение концентрации субстрата (рис. 2, в). Действительно, в этой точке мы не детектировали увеличения активности каталазы (рис. 2, а, б). До 6-го часа гипотермии активность АПО поддерживалась на более высоком уровне, чем у других сортов, затем к 1-м суткам наблюдали почти 3-кратное ее падение одновременно со снижением содержания H_2O_2 (рис. 1). Однако между этими показателями не было выявлено корреляции, в том числе и для сорта Керба. Тесная взаимозависимость обнаружена между активностями АПО и каталазы только в случае Мироновской 808 ($r = +0.63$, $p < 0.001$). Это может говорить о согласованном действии основных H_2O_2 -утилизирующих систем, связанном, по всей вероятности, с повышенным уровнем пероксида водорода в тканях как незакаленных, так и закаливаемых к холоду проростков данного сорта. У озимого сорта Казанская 285 кинетические свойства изучаемых антиоксидантных ферментов, как и содержание H_2O_2 , были в основном ниже, чем у других сортов (рис. 1). Эти факты, а также пониженная амплитуда холод-индуцированных изменений говорят о более низкой чувствительности данного сорта к стрессовому воздействию. Несмотря на это, общая мощность антиоксидантных систем была высокой (рис. 2, б), что указывает на интенсивность протекания процессов их биосинтеза, нивелирующих признаки окислительного стресса.

На листьях ячменя было показано, что первыми по времени на низкие температуры среди прочих антиоксидантных ферментов реагировали АПО и каталаза, активность которых проходила через максимум, достигающий к 8-му часу действия стрессора 35% и 25% соответственно. Однако через 1 сут гипотермии активности снижались, и к 7-м суткам они снижались на 13% и 19% по сравнению

с исходными значениями, что авторы объясняют зависимостью этих изменений от возраста проростков [7]. Детальное изучение на колеоптилях и первых зародышевых листьях этиолированных проростков пшеницы эндонуклеазной активности, детектирующей запуск запрограммированной гибели клеток, выявило, что у первых она достигает максимума к 7-м суткам, а у вторых – после 11 сут [24]. Флуктуационный характер описанных изменений (рис. 1, 2), а также ранний возраст наших объектов с большой долей вероятности позволяют предположить, что наблюдаемые изменения редокс-статуса клеток не обусловлены апоптоз-подобными процессами. При этом важен тот факт, что гипотермия заметно тормозит метаболические процессы, в первую очередь определяющие скорость такого интегрального показателя как рост, поэтому физиологический возраст «холодных» растений будет существенно меньше, чем у таковых, растущих аналогичное время в оптимальных температурных условиях [25].

Общее содержание аскорбиновой кислоты в тканях изучаемых объектов до закаливания составляло 21–25 мкг на 1 г сырого веса (рис. 2, *з*). Наиболее ранняя реакция, регистрируемая как достоверное увеличение концентрации АК к первым 30-и минутам гипотермии, была характерна для ярового сорта Керба. К 6-му часу холодового воздействия у всех сортов наблюдали максимальное содержание АК – 30–35 мкг, которое к концу опытов оставалось высоким у Мироновской 808, снижалось до уровня контроля у Казанской 285 и резко падало у Кербы (рис. 2, *з*). Таким образом после 3 сут холодового закаливания содержание АК было выше у озимых сортов по сравнению с яровым. Сходные данные были получены в наших исследованиях ранее, на основании которых мы предложили учитывать критерий содержания АК как количественно наиболее представленного в растительных тканях антиоксиданта в диагностике морозоустойчивости яровых и озимых сортов пшеницы [26]. В отличие от большинства пероксидаз, активность АПО сильно зависит от концентрации аскорбиновой кислоты: если она ниже 20 мкМ, фермент быстро инактивируется и теряет стабильность [23]. Действительно, прогрессирующее снижение к 3-м суткам холодового закаливания содержания АК до 20 мкМ и ниже у проростков Керба и Казанская 285 (рис. 2, *з*) наблюдали одновременно с падением активности АПО (рис. 2, *в*), что, в свою очередь, сопровождалось компенсаторным увеличением мощности другой антиоксидантной системы – каталазы (рис. 2, *б*). При этом у Мироновской 808 уровень АК около 35 мкМ обеспечивал стабильное функционирование АПО (рис. 2, *в, з*).

Для оценки относительной степени морозоустойчивости проростков разных сортов пшеницы, а также потенциальной способности этиолированных проростков адаптироваться к холоду изучали проницаемость мембран по выходу электролитов из незакаленных и закаленных к холоду тканей до и после тестирующего промораживания. Холодовое закаливание приводило к снижению проницаемости мембран: у Мироновской 808 – на 24% от контроля, у остальных сортов – на 40%. Следовательно, ткани проростков Мироновской 808 характеризовались повышенным экзоосмосом электролитов (табл. 1), что можно связать с такой особенностью сорта, как повышенное содержание пероксида водорода в тканях (рис. 1).

Табл. 1

Выход электролитов из тканей разных сортов пшеницы до и после холодого закаливания (4–5 °С, 3 сут) и/или криостресса (–15 °С, 2 ч), % от максимального*

Сорт	Незакаленные (1)	Незакаленные после криостресса (2)	Закаленные (3)	Закаленные после криостресса (4)
Керба (а)	5.7 ± 0.13	40.7 ± 1.05 ** по сравнению с 2б, 4а	3.3 ± 0.04	36.6 ± 0.48 ** по сравнению с 2а, 4б
Мироновская 808 (б)	9.2 ± 0.29	43.8 ± 0.80 ** по сравнению с 2а	7.0 ± 0.32	33.9 ± 0.75 ** по сравнению с 4а
Казанская 285 (в)	7.0 ± 0.30	30.8 ± 0.57	4.2 ± 0.07	19.8 ± 0.59

* За 100% принят выход электролитов из проростков, убитых кипячением.

** Недостоверно для уровня значимости $p < 0.05$; в остальных случаях разница достоверна для $p < 0.05$. В таблице приведены средние арифметические величины с их стандартными ошибками.

После тестирующего промораживания проростков проницаемость мембран увеличивалась во всех вариантах: у ярового сорта Керба – в 10–11 раз, у Мироновской 808 – в 4.8 раза, у Казанской 285 – в 4.5 раза (табл. 1). Эти данные соответствуют степени криповреждения, а значит, морозоустойчивости проростков. При этом выход электролитов из тканей незакаленных проростков близкородственных сортов Мироновская 808 и Керба, судя по результатам тестирующего промораживания, был сходным и выше такового для высокоморозоустойчивого сорта Казанская 285. Холодовое закаливание вызывало снижение степени экзоосмоса электролитов из тканей после криостресса в ряду Керба → Мироновская 808 → Казанская 285; разница с аналогичным показателем незакаленных растений составила 10%, 23% и 35% соответственно. Следует отметить, что влияние закаливания на степень повреждаемости мембран криострессом у обоих сортов озимой пшеницы было схожим. Это свидетельствует о способности этиолированных проростков повышать уровень морозоустойчивости уже после 3 сут действия низких температур, однако у ярового сорта Керба эти изменения были недостоверными. Заметное повышение морозоустойчивости этиолированных проростков озимых сортов пшеницы по сравнению с яровым сортом в литературе связывают с накоплением в процессе холодого закаливания высокомолекулярного белка с массой около 200 кДа [25]. Сравнение холод-индуцируемой экспрессии генов клеток зеленых листьев проростков яровых и озимых пшениц показало, что максимальное число экспрессируемых генов приходится уже на 1-е сутки гипотермии и достигает 150 и 225 соответственно. К 3-м суткам гипотермии разница в данном отношении между формами пшеницы увеличивается более чем в 2 раза, составляя 75 и 200 генов. Одновременно возрастало и количество репрессируемых генов. Это позволяет заключить, что именно на 3-и сутки гипотермии отличие между яровыми и озимыми сортами в превалировании количества «работающих» генов наиболее выражено – 75 генов [27].

Данные по терморезистентности этиолированных проростков разных сортов сопоставляли с таковой полевых растений, прошедших низкотемпературную акклимацию в естественных условиях. Результаты многолетних опытов

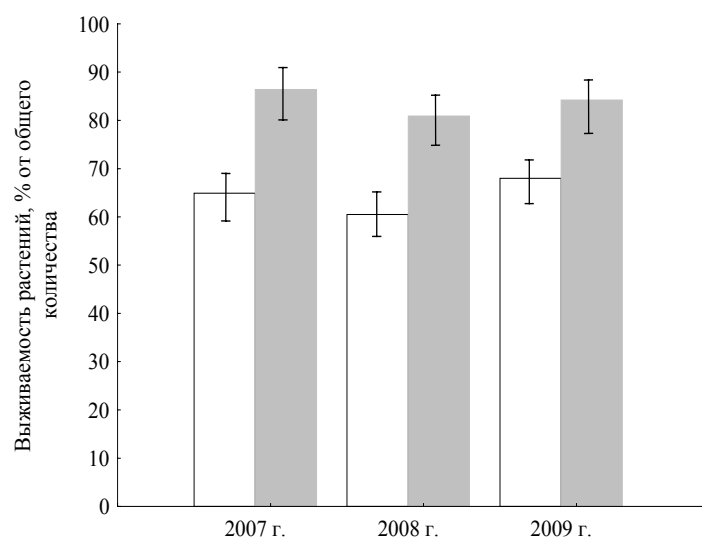


Рис. 3. Выживаемость после перезимовки полевых растений озимой пшеницы разных сортов: светлые столбцы – Мироновская 808, темные – Казанская 285

по определению выживаемости полевых растений изучаемых сортов озимой пшеницы сразу после перезимовки, отражающих общий уровень их морозо- и зимостойкости, приведены на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что выживаемость полевых растений сорта Казанская 285 в течение 3 лет была почти на 20% выше таковой созданного в условиях Украины сорта Мироновская 808. Исходя из системы оценки ВИР, морозо- и зимостойкость сорта является высокой при выживаемости 71–90% от общего числа растений и средней – при 51–70% [18]. Отсюда следует, что Казанская 285 соответствует высокоморозоустойчивым, а Мироновская 808 – среднеморозоустойчивым сортам. Таким образом, уровень морозоустойчивости проростков, установленный нами на основании данных по выходу электролитов после тестирующего промораживания, в целом отражает степень генетически детерминированной устойчивости растений, наиболее полно проявляющейся у полевых растений.

В заключение можно отметить, что холод-индуцируемая динамика активности антиоксидантных ферментов является не только сортоспецифичной, но и существенно зависит от системы расчетов. Нами показана тесная корреляция кинетических характеристик изучаемых ферментов от концентрации их субстратов. Следовательно, хорошо известный в литературе подход для оценки степени холодостойкости теплолюбивых культур по активности каталазы не может быть использован при диагностике такого комплексного параметра, как морозоустойчивость. В процессе холодого закаливания (3 сут) содержание пероксида водорода в тканях проростков возрастало у всех изученных сортов, однако оно не коррелировало с уровнем терморезистентности, достоверный прирост которого был выявлен только у озимых сортов. Получены данные, которые служат прямым экспериментальным доказательством способности этиолированных проростков озимых сортов реализовать генетически обусловленную программу повышения морозоустойчивости при достаточно короткой холодной экспозиции.

Summary

Y.R. Abdrakhimova, M.G. Timofeeva, A.R. Vildanova, I.D. Fadeeva, A.J. Anvar, F.A. Abdrakhimov, T.V. Bagaeva. The Cold-Induced Dynamics of Antioxidant Systems Activity of Seedlings of Wheat Cultivars Differing in Frost Resistance.

Changes in the antioxidant status of etiolated seedlings of winter (cultivars Mironovskaya 808, Kazanskaya 285) and spring (cultivar Kerba) wheat *Triticum aestivum* L. depending on their capacity to low-temperature hardening (4–5 °C, 3 d) were investigated. The degrees of constitutive and cold-inducible thermoresistance were determined by electrolyte leakage after testing freezing (–15 °C, 2 h). Phasic and cultivar-specific character of the dynamics of investigated parameters and the increase of hydrogen peroxide contents by the third day of hypothermia, more pronounced (almost in 2 times) in spring wheat, were ascertained. For all cultivars, essential correlation (average $r = +0.6$) between the catalase activity and H₂O₂ content was revealed. Higher sensitivity to hypothermia of spring wheat seedlings detected by the early changes of the parameters didn't provide statistically reliable growth of their thermoresistance. In comparison with other cultivars, Kazanskaya 285 seedlings were characterized by the reduced rates of H₂O₂ generation and activities of the antioxidant enzymes as well as lower membrane permeability both before and after cold hardening and cryostress. According to the data of repeated experiments, the difference between frost- and winter-resistance of field plants of used winter cultivars ran up to 20%. The obtained results are evidence of the genetically determined abilities of winter wheat etiolated seedlings to increase their thermoresistance during cold acclimation adequately reflecting different frost-resistance degrees of field plants.

Key words: *Triticum aestivum* L., etiolated seedlings, hypothermia, hydrogen peroxide, antioxidant systems, membrane permeability, frost-resistance.

Литература

1. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Соросовский образов. журн. – 1996. – Т. 5, № 3. – С. 2–7.
2. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. – 240 с.
3. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщиков Е.Б. Окислительный стресс. – М.: Наука, 2001. – 343 с.
4. Miller G., Mittler R. Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? // *Ann. Botany*. – 2006. – V. 98, No 2. – P. 279–288.
5. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 3. Повреждение клеточных мембран при охлаждении теплолюбивых растений // *Физиол. раст.* – 2003. – Т. 50, № 2. – С. 271–274.
6. Синькевич М.С., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом // *Физиол. раст.* – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 161–162.
7. Радюк М.С., Доманская И.Н., Щербаков Р.А., Шалыго Н.В. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя // *Физиол. раст.* – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 193–199.
8. Попов В.Н., Кипайкина Н.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И. Особенности окислительного стресса растений табака, трансформированных геном desCD9-ацил-липидной десатуразы из *Synechococcus vulkanus*, при гипотермии // *Физиол. раст.* – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 525–529.

9. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения // Физиол. раст. – 2002. – Т. 49, № 6. – С. 878–885.
10. Проценко Д.Ф., Колоша О.И. Физиология морозостойких сортов озимых культур. – Киев: Изд-во Киев. ун-та, 1969. – 260 с.
11. Фадеева И.Д., Шакиров Р.С., Тагиров М.Ш. Возделывание озимой мягкой пшеницы в Республике Татарстан (рекомендации). – Казань: Фолианть, 2009. – 52 с.
12. Ионов Э.Ф., Капитонова Н.П., Фадеева И.Д. О повышении устойчивости пшеницы к биотическим и абиотическим стрессам с помощью селекции // Защита растений и охрана природы в Татарстане. – Казань, 2000. – С. 58–61.
13. Gay C., Gebicki J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay // Anal. Biochem. – 2000. – V. 284, No 6. – P. 217–220.
14. Методы биохимического анализа растений / Ред. В.В. Полевого, Г.Б. Максимова. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. – 192 с.
15. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. – 1981. – V. 22, No 5. – P. 867–880.
16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, No 1. – P. 265–275.
17. Хохлова Л.П., Кучеренкова Н.Н., Абдрахимова Й.Р. Сезонные изменения митохондрий у закалённых и незакалённых к холоду растений озимой пшеницы // Физиол. раст. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 607–612.
18. Мережко А.Ф., Удачин Р.А., Зуев В.Е., Филатенко А.А. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале (Методические указания). – СПб.: ВИР, 1999. – 82 с.
19. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 224 с.
20. Зеленский М.И. Полярнографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. – Л.: Наука, 1986. – 140 с.
21. Бояришинов А.В., Картунова Ю.Е., Асафова Е.В. Окислительный стресс и образование оксида азота в листьях яровой пшеницы при обезвоживании // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2010. – Т. 152, кн. 2. – С. 56–78.
22. Тянь С.Р., Лей Ю.Б. Физиологические ответные реакции проростков пшеницы на засуху и облучение УФ-Б. Влияние нитропруссид натрия // Физиол. раст. – 2007. – Т. 54, № 5. – С. 763–769.
23. Pang C.-H., Wang B.-S. Role of Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase in Ascorbate-Glutathione Cycle and Stress Tolerance in Plants // Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants / Eds. N.A. Anjum et al. – Springer Science, 2010. – P. 91–113.
24. Александрушкина Н.И., Середина А.В., Ванюшин Б.Ф. Активность эндонуклеаз в коллептиле и первом листе развивающихся этиолированных проростков пшеницы // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 2. – С. 170–180.
25. Sarhan F., Perras M. Accumulation of High Molecular Weight Protein during Cold Hardening of Wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Physiol. – 1987. – V. 28, No 7. – P. 1173–1179.
26. Абдрахимова Й.Р., Цветкова Ю.А., Хасанова Л.Н. Влияние холодового закаливания на содержание антиоксидантов в листьях яровой и озимой пшеницы // Физиология растений: становление, развитие, перспективы / Ред. Л.П. Хохлова. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2007. – С. 125–132.

27. *Monroy A.F., Dryanova A., Malette B.* Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat // *Plant Mol. Biol.* – 2007. – V. 64, No 4. – P. 409–423.

Поступила в редакцию
18.11.10

Абдрахимова Йолдыз Раисовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Yoldez@mail.ru*

Тимофеева Марина Габдулгазизовна – студент кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

Вильданова Алина Равилевна – студент кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

Фадеева Ирина Дмитриевна – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией селекции озимой пшеницы ГНУ «Татарский НИИСХ» РАСХН, г. Казань.

E-mail: *fad-ir2540@mail.ru*

Анвар Ахмад Джассим – аспирант кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета

E-mail: *AHMADJK15@yahoo.com*

Абдрахимов Фарит Агитович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофизики транспортных процессов Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: *Abdfar@mail.ru*

Багаева Татьяна Вадимовна – профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Tatiana.Bagaeva@ksu.ru*