

УДК 632.111.5

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Стаценко А.П., Блинохватов А.А.

В работе было изучено влияние негативных факторов (низкие и высокие температуры, засоление, химический стресс) на содержание аминокислот и фермента пероксидазы в листьях пшеницы. В качестве объекта исследования использовали пятисуточные проростки озимой пшеницы сорта Базальт, которые подвергали стрессовому воздействию: низкие температуры (-3...-5°C); высокие температуры (33...35°C); засоление (5 %-ный раствор NaCl); химический стресс (почвенная вытяжка тяжелых металлов). Установлено, что химический стресс вызывал ответную реакцию растений максимальным накоплением аминокислот: пролина, изолейцина, серина, метионина, аспарагиновой кислоты и лизина. В то же время такие свободные аминокислоты, как аланин, фенилаланин, гистадин, валин, лейцин и тирозин активной реакции на стрессовые воздействия не проявляли. Фермент пероксидаза также изменялся под воздействием всех изучаемых видов стресса. Причём, наиболее существенные изменения общей активности зафиксированы на растения пшеницы химического стресса. Менее активная реакция на стрессовые воздействия отмечалась при низкой температуре и засолении. Использование показателя накопления свободных аминокислот и фермента пероксидазы в вегетативных органах может служить оценкой глубины стрессовых воздействий на растение, что позволяет объективно оценить морозостойкость, засухоустойчивость, жаростойкость, солеустойчивость и устойчивость к токсическому воздействию тяжелых металлов.

Ключевые слова: свободные аминокислоты, ферментные системы, пероксидаза, изозимный спектр, устойчивость растений, стресс, озимая пшеница.

Введение

Обменные процессы в растениях существенно изменяются под воздействием стресса. Научно доказано, что любое стрессовое воздействие на растения (высокая и низкая температуры, засуха, засоление, химическое воздействие и др.) вызывает нарушение азотного обмена, что приводит к накоплению в вегетативных органах (корнях и листьях) свободных аминокислот [7]. Это обусловлено в первую очередь изменением свойств мембранных систем клеток, что связано с перестройкой их структуры. В процессе этого увеличивается вязкость цитоплазмы, отмечается торможение деления и роста клеток [3]. Причем наиболее устойчивые к стрессу растительные формы отличаются интенсивным накоплением аминокислот, в частности, пролина, изолейцина, серина, метионина, аспарагиновой кислоты и лизина [6,7,9]. Предполагается, что эти осмотически активные низкомолекулярные соединения, образуя в период стрессового воздействия гидрофильные коллоиды, удерживают воду в тканях и тем самым защищают растительные белки от распада.

Известно, что стрессовые воздействия также вызывают трансформацию в ферментных системах растений. В частности, окислительно-восстановительный фермент пероксидаза, широко распространенный в вегетативных органах пшеницы, подвер-

гается значительной изменчивости под действием различных стресс-факторов (температурный, водный, солевой, химический стрессы) [4,8]. Отмечается количественная и качественная изменчивость этого фермента в вегетативных органах (корнях и листьях) растений в условиях стресса [1,2,5]. Причем, изменчивости подвергается как общая, так и удельная активность [5].

Следовательно, изменчивость свободных аминокислот и ферментных систем целесообразно использовать в качестве биохимических показателей глубины стресса растений, которая во многом определяет устойчивость озимых культур к неблагоприятным погодным условиям.

Цель исследований – изучить влияние негативных факторов (низкие и высокие температуры, засоление, химический стресс) на содержание аминокислот и фермента пероксидазы в листьях озимой пшеницы.

Объекты и методы исследований

В качестве объекта исследования использовали пятисуточные проростки озимой пшеницы сорта Базальт, которые подвергали стрессовому воздействию: низкие температуры (-3...-5 °C); высокие температуры (33...35 °C); засоление (5%-ный раствор NaCl); химический стресс (почвенная вытяжка тяжелых металлов).

Таблица 1 – Влияние стрессового фактора на содержание аминокислот в листьях пшеницы

Аминокислоты	Содержание свободных аминокислот, мг % (степень накопления)			
	температура		NaCl	химический стресс
	-3...-5°C	33...35°C		
Пролин	<u>21,31</u>	<u>18,45</u>	<u>19,6</u>	<u>22,93</u>
	-4,21	-3,96	-4,04	-5,11
Изолейцин	<u>1,49</u>	<u>1,3</u>	<u>1,25</u>	<u>2,05</u>
	-0,93	-0,86	-0,8	-1,19
Серин	<u>3,96</u>	<u>3,96</u>	<u>3,81</u>	<u>4,12</u>
	-1,06	-0,94	-1,11	-1,43
Метионин	<u>2,31</u>	<u>2,15</u>	<u>2,24</u>	<u>3,01</u>
	-1,12	-0,89	-0,96	-1,21
Аспарагиновая кислота	<u>1,73</u>	<u>1,52</u>	<u>1,6</u>	<u>2,12</u>
	-3,12	-2,96	-3,09	-3,84
Лизин	<u>1,56</u>	<u>1,49</u>	<u>1,38</u>	<u>2,09</u>
	-3,96	-3,18	-2,84	-4,04
Аланин	<u>9,16</u>	<u>8,42</u>	<u>7,96</u>	<u>11,03</u>
	-0,74	-0,62	-0,64	-0,9
Фенилаланин	<u>3,25</u>	<u>3,04</u>	<u>2,86</u>	<u>4,16</u>
	-0,91	-0,8	-0,73	-0,98
Гистадин	<u>1,21</u>	<u>1,14</u>	<u>1,36</u>	<u>2,2</u>
	-0,79	-0,73	-0,7	-0,91
Валин	<u>4,42</u>	<u>4,25</u>	<u>4,3</u>	<u>5,17</u>
	-0,74	-0,7	-0,69	-0,84
Лейцин	<u>3,25</u>	<u>3,17</u>	<u>3,21</u>	<u>4,12</u>
	-1,01	-0,83	-0,97	-1,16
Тирозин	<u>1,76</u>	<u>1,25</u>	<u>1,42</u>	<u>2,3</u>
	-1,11	-1,06	-1,03	-1,17

Таблица 2 – Влияние стресса на качественную изменчивость пероксидазы в листьях пшеницы

Экологический фактор	Общая активность пероксидазы, ед.	Количество новообразований в изозимном спектре		
		А-зона	В-зона	С-зона
Контроль	4,16	0	0	0
Низкая температура (-3...-5°C)	5,11	0	0	1
Высокая температура (33...35°C)	6,63	0	1	1
Засоление (5%-ный раствор NaCl)	5,49	0	1	0
Засуха (5 суток без полива)	7,01	1	1	2
Химический стресс (тяжёлые металлы)	11,22	2	1	3

Содержание свободных аминокислот в листьях определяли с помощью автоматического анализатора LKB-440M.

Для этого 3 г листьев растений фиксировали в 30 мл этанола, гомогенизировали до однородной массы на гомогенизаторе при 10 тыс. об/мин. Гомогенат фильтровали, а затем выпаривали в фарфоровых чашках на кипящей водяной бане. Осадок растворяли в 1,5 мл цитратного буфера (pH = 2,2).

Содержание каждой аминокислоты рассчитывали в мг/100 сырой растительной массы или мг%.

Разделение фермента пероксидазы на фракции проводили с использованием электрофореза. Для выделения фермента из растительной ткани навеску (2г) измельчали с помощью скальпеля, затем заливали семикратным объёмом 0,005М трис-глицинового буфера, содержащего 30% сахарозы, и гомогенизировали на холоде. Гомогенат в течение часа выдерживали при температуре 4 °С и центрифугировали при скорости 8 тыс. об/мин в течение 15 минут. Полученную жидкость использовали в качестве препарата пероксидазы.

Электрофорез пероксидазы проводили в цилиндрических гелях в 7,5% -ном полиакриламидном геле с использованием трис-глициновой буферной системы pH=8,3 с охлаждением.

Время проведения электрофореза 2 часа 20 минут. По окончании электрофореза гели опускали на 30 минут в 0,02%- ный раствор солянокислого бензидаина, а затем – в 0,01%- ный раствор пероксида водорода до появления голубых полос изопероксидаз.

Для удобства анализа изозимных спектров изопероксидазы по относительной электрофоретической подвижности были условно разделены на три зоны: А – зона; В – зона; С-Зона.

Результаты и их обсуждение

Анализ результатов эксперимента показал, что все изучаемые аминокислоты в разной степени реагируют на стрессовые воздействия. Причем, максимальная ответная реакция для всех аминокислот отмечается при воздействии на проростки пшеницы химического стресса, вызванного поливом растений почвенной вытяжкой тяжелых металлов. При этом степень накопления пролина достигла 5,11, а лизина 4,04 (таблица 1).

В большей степени реагировали на стрессовые воздействия пролин, изолейцин, серин, метионин, аспарагиновая кислота и лизин. В то же время такие свободные аминокислоты, как аланин, фенилаланин, гистадин, валин, лейцин и тирозин активной реакции на стрессовые воздействия не проявляли.

Анализ результатов экспериментальной работы с ферментными системами показал, что окислительно – восстановительный фермент пероксидаза изменяется под воздействием всех изучаемых видов стресса. Причём, наиболее существенные изменения общей активности зафиксированы на расте-

ния пшеницы химического стресса. В то же время менее активная реакция на стрессовые воздействия отмечалась при низкой температуре и засолении (таблица 2).

Анализ электрофоретического спектра пероксидазы показал, что максимальное количество новообразований в С - зоне отмечалось при воздействии на растения химического стресса, тогда как низкотемпературный стресс и засоление вызвали несущественные трансформации в изозимном спектре. Следует отметить тот факт, что наибольшей качественной изменчивости под воздействием всех изучаемых видов стресса подвергалась С - зона спектра, где число новообразований достигло семи единиц. Минимальная трансформация изоперок-

сидазного спектра отличалась в А - зоне, где число новообразований составило три единицы.

Выводы

Накопление свободных аминокислот (пролина, изолейцина, серина, метионина, аспарагиновой кислоты, лизина) и качественная изменчивость растительных пероксидаз являются объективными универсальными критериями глубины стрессовых воздействий, что позволяет использовать названные показатели для оценки морозостойкости, засухоустойчивости, жаростойкости, солеустойчивости и устойчивости к токсическому воздействию тяжелых металлов.

Список литературы

- [1] Кривобочек В.Г., Стаценко А.П., Юрова Ю.А., Городничев А.А. Использование ферментных систем в оценке морозостойкости озимой пшеницы//Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И.Вавилова. – 2013. № 6. - С. 31-33.
- [2] Кривобочек В.Г., Стаценко А.П., Горешник И.Д., Юрова Ю.А., Капустин Д.А. Ферментные системы в оценке засухоустойчивости яровой пшеницы// Аграрный научный журнал. – 2015. №7.- С. 23-26.
- [3] Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция// Физиология растений. – 1999. – Т 46. – С. 321-336.
- [4] Савич И.М. Пероксидазы – стрессовые белки растений// Успехи современной биологии. -1989. №3. – С. 306 – 317.
- [5] Стаценко А.П., Иванов А.И., Конкина Е.Е., Изменчивость изопероксидаз растений в условиях химического стресса.- Пенза: ПГСХА, 2012. – 147 с.
- [6] Стаценко А.П., Иванов А.И., Конкина Е.Е. Биохимическое тестирование загрязнения окружающей среды/ Современные проблемы экологии. – М.: МГУ, 2007. – С. 65-63.
- [7] Стаценко А.П., Перуанская О.Н. Накопление свободных аминокислот и морозостойкость озимой пшеницы// Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. – 1983. №3. – С. 35-37.
- [8] Титов А.Ф. Полиморфизм ферментных систем и устойчивость растений//Успехи современной биологии.- 1978. №1. - С. 63-70.

THE VARIABILITY OF METABOLIC PROCESSES IN THE WHEAT PLANTS UNDER STRESS CONDITIONS

Statsenko A.P., Blinokhvatov A.A.

The purpose of research - to study the influence of negative factors (low and high temperature, salinity, chemical stress) on the content of amino acids and the enzyme peroxidase in wheat leaves. The object of investigation used a five-day seedlings of winter wheat varieties of basalt, which were exposed to the stress: low temperature (-3 ... -5 ° C); high temperature (33 ... 35 ° C); salinity (5% solution of NaCl); chemical stress (soil extract heavy metals). It is found that chemical stress response of plants caused maximal accumulation of amino acids: proline, isoleucine, serine, methionine, aspartic acid and lysine. At the same time, free amino acids such as alanine, phenylalanine, glistadin, valine, leucine and tyrosine active reaction to stress effects are not exhibited. Peroxidase enzyme also varies under the influence of all the species studied stress. Moreover, the most significant change in the overall activity recorded on a wheat plant chemical stress. Less than an active response to the stressful effects observed at low temperature and salinity using indicators accumulation of free amino acids and the enzyme peroxidase in vegetative organs can serve as an estimate depth of stress on the plant, which allows to estimate the frost, drought resistance, heat resistance, salt tolerance and resistance to the toxic effects of heavy metals.

Keywords: free amino acids, enzyme systems, peroxidase isozyme spectrum of plant resistance, stress, winter wheat.

References

- [1] Krivobok V. G., Statsenko A. P., Yurov Y. A., Gorodnichev, A. A. the Use of enzyme systems in the evaluation of frost resistance of winter wheat/Bulletin of Saratov state agrarian University im. N. So.Vavilova. – 2013. No. 6. - P. 31-33.
- [2] Krivobok V. G. , Statsenko A. P., Goreshnik I. D., Yurova A. Yu., Kapustin D. A. Enzyme system in the evaluation of drought resistance of spring wheat// journal of Agricultural science. – 2015. No. 7.- P. 23-26.
- [3] Kuznetsov V. V., Shevyakova N. So. Proline under stress: biological role, metabolism, regulation// plant Physiology. – 1999. – Т 46. – P. 321-336.
- [4] Savich I. M. Peroxidase – stress proteins of plants// Advances in modern biology. -1989. No. 3. – P. 306 – 317.
- [5] Statsenko A. P., Ivanov I. A., Konkina E. E., Variability of superoxides of plants in conditions of chemical stress.- Penza: pgskha, 2012. 147 p.
- [6] Statsenko A. P., Ivanov A. I., Konkina E. E. Biochemical testing of environmental pollution/ Modern problems of ecology. – М.: Moscow state University, 2007. – P. 65-63.
- [7] Statsenko A. P., Peruvian O. N. Accumulation of summary amino acids and frost resistance of winter wheat// Bulletin of agricultural science of Kazakhstan. – 1983. No. 3. – P. 35-37.
- [8] Titov A. F. Polymorphism of enzyme systems and stability of plants//Advances in modern biology.- 1978. No. 1. - P. 63-70.