

На правах рукописи



АНТИПИНА
Ольга Валерьевна

**СПОСОБНОСТЬ ЛИСТЬЕВ И КОРНЕЙ ТЕПЛОЛЮБИВЫХ
РАСТЕНИЙ ТАБАКА К ФОРМИРОВАНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ
К ГИПОТЕРМИИ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в лаборатории зимостойкости Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук

Попов Валерий Николаевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор

доктор биологических наук, профессор

Бабаков Алексей Владимирович

Загоскина Наталья Викторовна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева

Защита состоится «15» марта 2011 г. в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (499) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « 11 » февраля 2011 г.

Ученый секретарь

совета по защите докторских

и кандидатских диссертаций,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Практически все растения на Земле подвергаются действию разных неблагоприятных факторов, в том числе действию холода (низких положительных температур) и мороза (температуры ниже 0°C). В субтропиках температура периодически опускается ниже 0°C, в умеренных зонах – до минус 20-40°C. Севернее этих районов лежит зона вечной мерзлоты, где температура бывает еще ниже (Larcher, 2003). В связи с этим проблема адаптации растений к пониженным температурам является весьма актуальной, причем эта актуальность имеет не только фундаментальный, но и практический характер в связи с большими потерями, которые несет сельское хозяйство в результате периодических снижений температуры, заморозков и критических морозов (Сандухидзе и др., 2003). Несмотря на крупные достижения в области исследований физиолого-биохимических основ устойчивости растений к гипотермии (Туманов, 1979; Levitt, 1980; Титов, 2006), до сих пор не создана единая теория адаптации к низким температурам, а меры предотвращения губительного действия не только отрицательных, но и низких положительных температур остаются крайне неэффективными.

Жизнеспособность растений в условиях низких температур обеспечивается комплексом физиологических процессов, имеющих своей целью адаптацию растительного организма к изменяющимся условиям окружающей среды. Известно, что в формировании устойчивости к низким температурам важную роль играют углеводы растений (Туманов, 1979; Трунова, 1984, 2007; Perera et al., 1995; Ma et al., 2009). Существенное значение в закаливании растений к гипотермии имеют изменения липидного состава и степени ненасыщенности жирных кислот, которые позволяют поддерживать текучесть мембран и предотвращать фазовый переход липидов (Lyons, 1973; Лось, 2005). Не вызывает сомнений существенная роль фотосинтеза для адаптации растений к низким температурам (Levitt, 1980; Климов и др., 2003; Суворова, 2009).

Процессы формирования низкотемпературной устойчивости наиболее полно изучены на растениях, относящихся к группе морозостойких. Теплолюбивые растения, в частности табак, в этом отношении менее изучены (Балагурова и др., 2001; Ти-

тов и др., 2006). Кроме того, большинство исследователей основное внимание уделяли изучению низкотемпературного стресса, развивающегося в листьях. Поскольку устойчивость целого растения к действию низких температур зависит от устойчивости его отдельных органов и в целом определяется наиболее чувствительными из них (Туманов, 1979; Lee, 2005; Сусов, 2009), то возникает необходимость в более детальном исследовании особенностей формирования холодоустойчивости не только листьев растений, но и корней, так как причины высокой чувствительности корневой системы к действию низких температур, особенно у теплолюбивых растений, всё ещё недостаточно изучены.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы заключалась в исследовании способности листьев и корней теплолюбивых растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) к формированию устойчивости к гипотермии. В соответствии с данной целью были поставлены следующие задачи:

1. Определить эффективность низкотемпературного закаливания теплолюбивых растений табака и выявить особенности холодоустойчивости их органов.
2. Изучить изменения содержания и состава жирных кислот (ЖК) липидов в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.
3. Исследовать особенности развития окислительного стресса в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.
4. Оценить эффективность работы антиоксидантных ферментов в листьях и корнях исследуемых растений при низких положительных температурах.
5. Выявить изменения интенсивности фотосинтеза и дыхания у растений табака при низких положительных температурах.
6. Изучить изменения содержания сахаров в листьях и корнях табака при низких положительных температурах.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование причин разной устойчивости листьев и корней теплолюбивых растений табака к низким температурам.

Установлено, что листья теплолюбивых растений табака реагировали на пониженную температуру (8°C, 6 сут.) увеличением содержания липидов и доли полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) в их составе, в то время как в корнях происходило снижение содержания липидов и ненасыщенных ЖК. Увеличение доли ПНЖК в листьях за время закаливания обеспечивало сохранение функциональной стабильности мембран, что способствовало предотвращению избыточной генерации активных форм кислорода (АФК) и приводило к повышению устойчивости листовой ткани к действию низких температур. Уменьшение содержания ПНЖК в корневой системе табака в условиях низких положительных температур могло приводить к увеличению скорости генерации АФК и повышению интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ). Это являлось одной из причин более слабой по сравнению с листьями устойчивости корневой системы растений табака к окислительному стрессу, вызванному пониженной температурой.

Впервые установлена возможность значительного повышения холодоустойчивости надземной части растений табака, вплоть до устойчивости к действию отрицательных температур (-3°C), и неспособность корневой системы табака к низкотемпературному закаливанию, что является лимитирующим фактором, определяющим в целом низкий потенциал устойчивости теплолюбивых растений к гипотермии.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе экспериментальные данные о роли листьев и корней в формировании устойчивости к гипотермии растений табака существенно расширяют представления о физиологических механизмах низкотемпературного закаливания теплолюбивых растений. Результаты работы имеют как фундаментальный характер, так и предоставляют возможность практического применения и могут быть рекомендованы к использованию в селекционной практике (получение новых сортов сельскохозяйственных растений, устойчи-

вых к низким температурам) и сельскохозяйственном производстве (рациональное распределение температур при выращивании растений в тепличных комбинатах, подбор подвоя и привоя теплолюбивых культур).

Теоретические обобщения и совокупность экспериментальных данных работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов ВУЗов биологических и сельскохозяйственных специальностей.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений" (Екатеринбург, 2008), на VIII международном симпозиуме "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования" (Москва, 2009), международной научно-практической конференции "Интенсификация и оптимизация продукционного процесса сельскохозяйственных растений" (Орел, 2009), научных конференциях молодых ученых ИФР РАН (Москва, 2008, 2009), всероссийском симпозиуме "Растение и стресс" (Москва, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из которых 2 статьи в рецензируемых журналах.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, включает 24 рисунка и 4 таблиц; список литературы состоит из 261 наименований, из них - 153 на иностранном языке.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили теплолюбивые растения табака (*Nicotiana tabacum* L., сортотип Samsun). Растения размножали черенкованием и культивировали на минеральном субстрате (перлит) в камере фитотрона ИФР РАН при температуре 22-24°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 5 клк. Для опытов использовали растения в возрасте шести недель.

Закаливание растений проводили в климатической камере Binder KBW-240 (Германия), в условиях 16-часового фотопериода и освещенности 5 клк в течение шести суток при температуре 8°C. Данная температура относится к диапазону закаливающих температур для теплолюбивых растений (Дроздов, 1990) и была подобрана в ходе предварительных опытов.

Холодостойкость контрольных (незакаленных) и закаленных растений табака оценивали по их выживаемости после промораживания при температуре -3°C с сохранением режима освещенности в течение суток в климатической камере Sanyo MIR-153 (Япония), а также путем измерения выхода электролитов в водную фазу из тканей листьев и корней (Herburn et al., 1986).

Определение содержания липидов и их жирнокислотного состава осуществляли методом газожидкостной хроматографии (Цыдендамбаев, Верещагин, 1980; Пчелкин и др., 2001).

Скорость генерации супероксидного радикала ($O_2^{\bullet-}$) определяли методом, в основе которого лежит способность этого радикала восстанавливать адреналин в адренохром (Часов и др., 2002) и выражали в ед. оптической плотности * 10^{-3} /мин.

Содержание перекиси водорода (H_2O_2) измеряли по реакции с хлоридом титана ($TiCl_4$) (Kumar, Knowles, 1993) и выражали в ммоль/г сыр. массы.

Об интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению продуктов окисления: диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Содержание ДК определяли путём измерения оптической плотности липидных экстрактов в смеси метанол-гексан (5:1) при 232 нм (максимум поглощения ДК) и выражали в мкмоль/г сыр. массы (Кейтс, 1975). Содержание МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой с последующим измерением оптической плотности раствора при 532 нм и рассчитывали в мкмоль/г сыр. массы (Жиров и др., 1982).

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли при помощи метода, основанного на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы и выражали в ед. активности/г сыр. массы (Kumar, Knowles, 1993).

Активность каталазы измеряли по скорости деградации H_2O_2 согласно Kumar и Knowles (1993) и выражали в мкмоль разложившейся перекиси/г сыр. массы в мин.

Активность аскорбат-пероксидазы определяли по модифицированному методу Nakano, Asada (1981), основанному на регистрации снижения оптической плотности раствора при окислении аскорбата, и выражали в мкмоль аскорбата/г сыр. массы в мин.

Активность пероксидазы гваякола определяли по методу Kumar и Knowles (1993), основанному на реакции окисления ароматического соединения (гваякола) до окрашенного соединения (тетрагваякола), и выражали в мкмоль гваякола/г сыр. массы в мин.

Изучение CO_2 -газообмена растений табака при 22°C и 8°C проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Германия). Измерения газообмена включали определение скоростей видимой ассимиляции CO_2 и темнового дыхания, которые выражали в мг CO_2 /г сух. массы в ч (Климов, 2003).

Для определения содержания сахаров в тканях листьев и корней их навески (~500 мг) фиксировали 96%-ным кипящим этанолом. Ткань растирали в фарфоровой ступке и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80%-ным этанолом. В полученных экстрактах определяли глюкозу глюкозооксидазным методом, сахарозу и фруктозу – по методу Рое (Туркина, Соколова, 1971).

Для определения содержания сахаров в апопласте целые листья подвергали вакуум-инfiltrации 50 мМ раствором $CaCl_2$ с последующим центрифугированием (Luwe et al., 1993). В полученных экстрактах определяли глюкозу глюкозооксидазным методом, сахарозу и фруктозу – по методу Рое (Туркина, Соколова, 1971).

Во всех экспериментах биологическая повторность измерений – 6-8-кратная, аналитическая – 4-6-кратная. Результаты экспериментов обработаны статистически. В таблицах и на гистограммах представлены средние значения опыта и их стандартные ошибки (Доспехов, 1977).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изменение устойчивости растений табака при низких положительных температурах. В начале работы было необходимо определить эффективность низкотемпературного закаливания (8°C , 6 сут.) теплолюбивых растений табака. Для этого был использован метод прямого промораживания растений при температуре -3°C в течение 1 сут. с последующей оценкой их выживаемости. По истечении холодной экспозиции все незакаленные растения погибали (Рис. 1А). Напротив, закаленные растения табака после оттаивания сохраняли тургор и видимых повреждений надземной части не имели (Рис. 1А). Тем не менее, эти закаленные растения погибали через 5 сут. после промораживания при их выращивании в оптимальных температурных условиях (22°C) (Рис. 1Б), что могло быть связано с гибелью корневой системы. Для проверки этого предположения у части закаленных растений после промораживания при -3°C были срезаны побеги и помещены в резервуары с водой. Спустя 5 суток эти побеги не только не засыхали, но и возобновляли ростовые процессы и формировали придаточные корни (Рис. 1В).

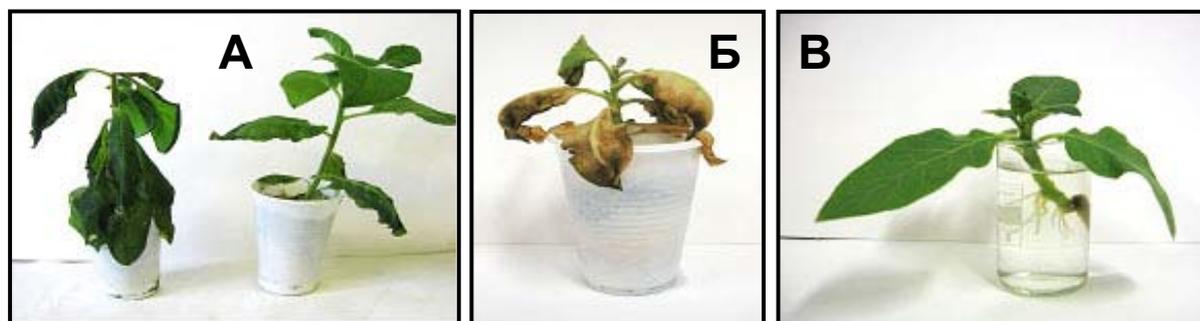


Рис. 1. Растения табака после промораживания (-3°C , 1 сут.).

А – контрольное (слева) и закаленное (справа) растения сразу после промораживания;
Б – закаленное растение через 5 сут. после промораживания;
В – побег закаленного растения через 5 сут. после промораживания.

Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой эффективности закаливания листьев теплолюбивых растений табака, способных, в отличие от корней, развивать устойчивость даже к отрицательным температурам. Корневая система была не способна формировать устойчивость к отрицательным температурам в процессе закаливания в условиях, благоприятных для побегов, что в результате приводило к гибели целого растения.

2. Изменение содержания и жирнокислотного состава липидов в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.

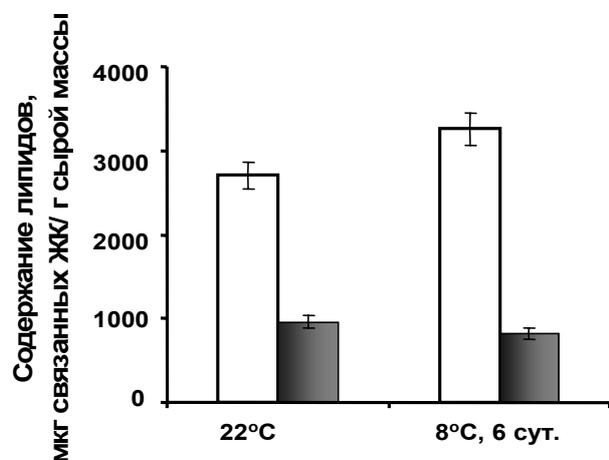


Рис. 2. Изменение содержания липидов в листьях (□) и корнях (■) растений табака при низких положительных температурах.

Способность клеток теплолюбивых растений увеличивать количество ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах является одним из важных факторов низкотемпературной адаптации, что было продемонстрировано на растениях огурца, томата (Новицкая и др., 1999, 2000), тыквы (Lee et al., 2005), табака (Попов и др., 2006) и других растениях. В связи с этим дальнейшие исследования были направлены на определение содержания липидов и их жирно-

кислотного состава в листьях и корнях исследуемых растений.

Уже до закаливания имелись существенные различия в абсолютном содержании липидов в листьях и корнях растений (Рис. 2): содержание липидов в листьях растений в 2,8 раза превышало их содержание в корневой системе.

Более того, липиды листьев и корней различались и по составу ЖК (Таблица 1). Липиды листьев включали основные жирные кислоты с длинной цепи 13-20 атомов углерода, а корней - 14-24 атома углерода, т.е. отличались бóльшим набором и разнообразием жирных кислот по сравнению с липидами листьев (содержится больше длинноцепочечных ЖК). В корнях преобладала линолевая кислота (18:2) в отличие от листьев, где максимальное содержание приходилось на линоленовую кислоту (18:3).

Холодовое закаливание приводило к 20% повышению содержания липидов в листьях, в то время как в корневой системе происходило снижение их количества на 14% (Рис. 2). При этом, в листьях при закаливании снижалось содержание насыщенных ЖК (16:0, 18:0) и мононенасыщенных ЖК (18:1) и одновременно повышалось содержание полиненасыщенных ЖК (18:2, 18:3). В корневой системе после холодо-

вой экспозиции (8°C, 6 сут.) наблюдалась другая тенденция в изменении содержания главных ЖК: количество насыщенных ЖК (16:0 и 18:0) возрастало, а ненасыщенных (18:1,18:2,18:3) – снижалось.

Таблица 1. Состав жирных кислот липидов в листьях и корнях растений табака.

Жирная кислота	Содержание ЖК в листьях, % от суммы		Содержание ЖК в корнях, % от суммы	
	22°C	8°C, 6 суток	22°C	8°C, 6 суток
13:0	2,5 ± 0,1	0,21 ± 0,1	–	–
14:0	2,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
14:1	1,3 ± 0,1	–	–	–
15:0	2,1 ± 0,2	–	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
15:1	0,5 ± 0,1	0,15 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
16:0	19,5 ± 0,5	14,8 ± 0,3	18,0 ± 0,5	19,4 ± 0,3
16:1	3,80 ± 0,1	2,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1
16:2	1,45 ± 0,2	0,8 ± 0,1	–	0,1 ± 0,0
16:3	6,05 ± 0,8	6,17 ± 0,2	–	–
18:0	2,65 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,1
18:1	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1
18:2	12,5 ± 0,3	14,85 ± 0,2	37,0 ± 0,4	30,2 ± 0,2
18:3	42,5 ± 0,7	56,56 ± 0,5	19,0 ± 0,3	18,8 ± 0,2
19:0	0,3 ± 0,1	0,46 ± 0,1	–	–
20:0	0,65 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1
20:3	–	–	2,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
21:0	–	–	0,6 ± 0,1	–
22:0	–	–	4,5 ± 0,2	6,8 ± 0,3
22:2	–	–	–	0,2 ± 0,1
22:3	–	–	–	1,4 ± 0,1
23:0	–	–	1,0 ± 0,1	–
24:0	–	–	4,4 ± 0,1	6,0 ± 0,2
24:2	–	–	5,3 ± 0,1	7,8 ± 0,1

На основании данных таблицы 1 было рассчитано соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (Рис. 3). Если до закаливания сумма насыщенных кислот в листьях растений табака составляла 29,5% и соответственно ненасыщенных – 70,5%, то после закаливания доля насыщенных ЖК снизилась до 18,8%, а сумма не-

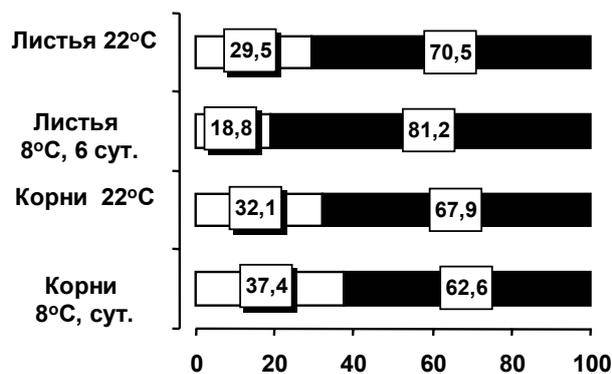


Рис. 3. Изменение соотношения (%) насыщенных (□) и ненасыщенных (■) ЖК липидов в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.

насыщенных возросла до 81,2%, то есть соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК в листьях ещё больше сместилось в сторону преобладания ненасыщенных, главным образом за счет увеличения количества линоленовой кислоты с 42,51 до 56,56% (Таблица 1). Обратная ситуация наблюдалась в корнях растений табака: если в контроле

сумма насыщенных ЖК составляла 32,1% и соответственно ненасыщенных – 67,9%, то после холодной экспозиции (8°C, 6 сут.) доля насыщенных ЖК увеличилась до 37,4%, а сумма ненасыщенных снизилась до 62,6%.

В результате таких изменений состава ЖК липидов в листьях во время закаливания происходило увеличение индекса ненасыщенности, характеризующего жидкостные свойства мембран, с 1,82 до 2,22. В корневой системе этот показатель, наоборот, снижался с 1,52 до 1,42.

Таким образом, повышение содержания в листьях мембранных липидов с более высокой степенью ненасыщенности их жирных кислот (с преобладанием триеновых ЖК), за время закаливания, в отличие от корней, где эти процессы имели противоположную направленность, могло быть одной из причин разной чувствительности листьев и корней табака к пониженной температуре. Снижение доли ненасыщенных жирных кислот в корневой системе при действии низких положительных температур могло являться результатом деградации полиненасыщенных ЖК, возможно, вызванной развитием окислительного стресса и низкой активностью антиоксидантной системы.

3. Интенсивность окислительного стресса в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.

Поскольку одной из основных причин повреждения теплолюбивых растений при действии холода является активация свободно-радикальных процессов (Мерзляк,

1989; Лукаткин, 2002, 2005), было проведено исследование изменения уровня $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 в листьях и корнях растений табака при закаливании.

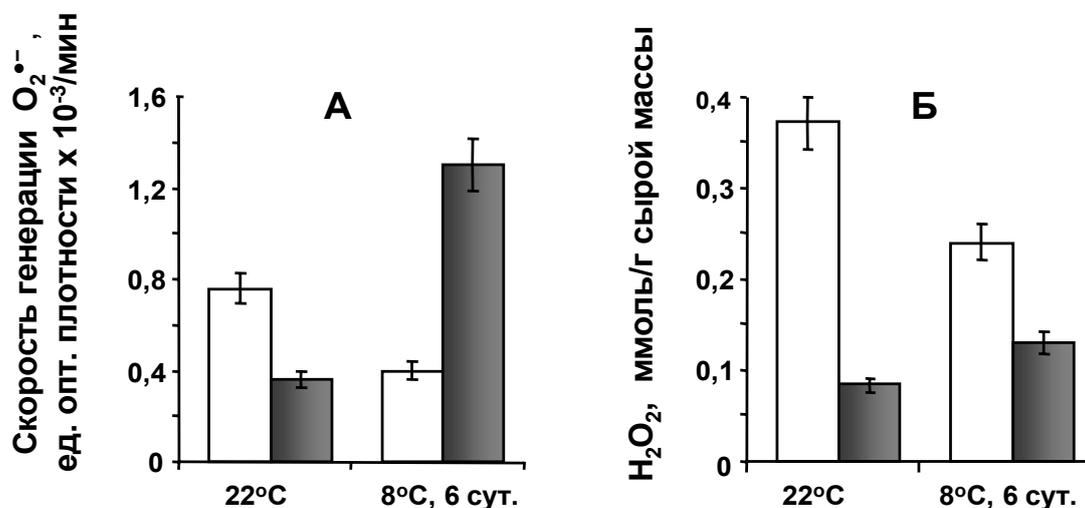


Рис. 4. Изменение скорости генерации супероксидного радикала (А) и содержания перекиси водорода (Б) в листьях (□) и корнях (■) растений табака при низких положительных температурах.

Закаливание растений табака сопровождалось почти двукратным уменьшением скорости генерации супероксидного радикала в листьях и трехкратным увеличением скорости его генерации в корневой системе (Рис. 4А), что свидетельствует о значительной интенсификации окислительных процессов в корнях за время холодной экспозиции.

Показателем интенсивности окислительного стресса во время охлаждения может служить также и содержание в клетках перекиси водорода. Опасность избытка H_2O_2 для растительной клетки заключается в том, что она, являясь относительно стабильной молекулой, может диффундировать в клетке на значительные расстояния, а также служит источником другой, более токсичной формы активного кислорода – гидроксил-радикала (Мерзляк, 1989; Полесская, 2007). Эксперименты показали (Рис. 4Б), что при закаливании в органах растений наблюдались прямо противоположные процессы: было выявлено более чем 35% снижение содержания перекиси в листовой ткани и повышение ее количества на такую же величину в корневой системе. Полученные результаты указывают на развитие окислительного стресса в корнях растений табака.

4. Перекисное окисление липидов в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.

Одной из причин повреждения растений при гипотермии является нарушение структуры клеточных мембран, а основным процессом деградации мембранных липидов является их перекисное окисление (Владимиров, 1999), которое вызывается интенсивной генерацией АФК. В связи с этим, следующим этапом нашей работы было исследование процессов ПОЛ в листьях и корнях растений табака при закаливании, которые сопровождаются накоплением первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА).

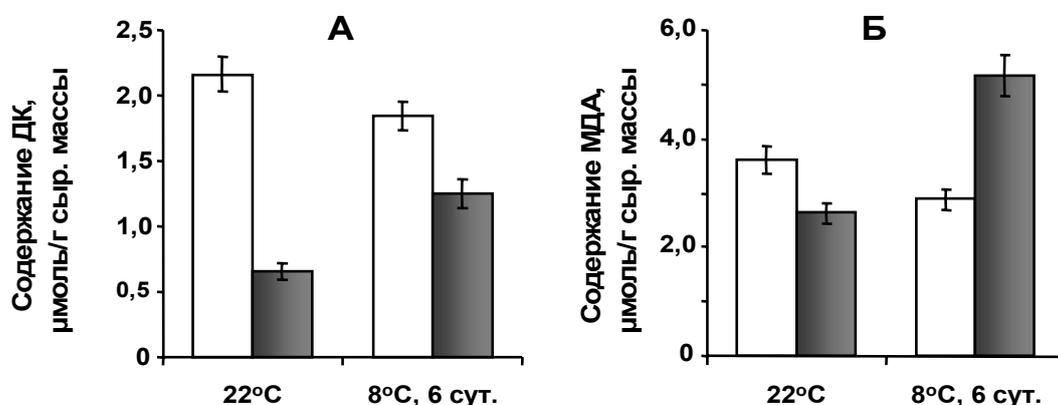


Рис. 5. Изменение содержания ДК (А) и МДА (Б) в листьях (□) и корнях (■) растений табака при низких положительных температурах.

В результате закаливания растений табака происходили существенные изменения в количестве ДК и МДА, содержание которых изменялось разнонаправлено в надземных и подземных органах (Рис. 5). В листьях наблюдалось снижение содержания ДК и МДА, что указывает на торможение ПОЛ и способность листьев адаптироваться к пониженной температуре. В корневой системе происходило двукратное увеличение уровня ДК и МДА, что позволяет предположить развитие значительных повреждений клеточных мембран и свидетельствует о повышенной уязвимости корневой системы к действию окислительного стресса, индуцированного низкими положительными температурами.

Учитывая, что увеличение интенсивности ПОЛ отражает начальные этапы повреждения клеточных мембран, для характеристики их функционального состояния

также был использован метод определения выхода электролитов из тканей растений. Полученные результаты (Рис. 6) свидетельствуют о различном влиянии низкотемпературной экспозиции на холодостойкость листьев и корней табака: если в листьях за

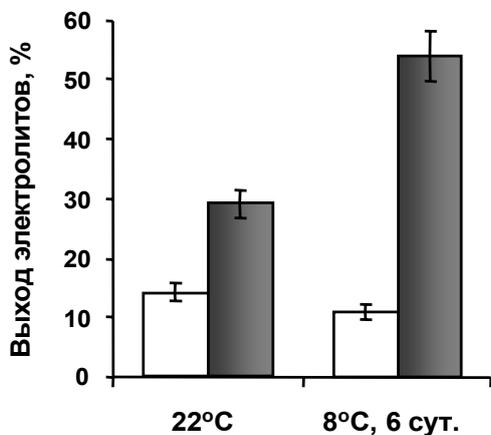


Рис. 6. Изменение выхода электролитов из листьев (□) и корней (■) растений табака при низких положительных температурах.

время закаливания наблюдалось сохранение барьерных свойств клеточных мембран, то в корнях наблюдалось резкое возрастание выхода электролитов, свидетельствующее о серьезных повреждениях мембранной системы клеток.

Таким образом, холодовая экспозиция (8°C, 6 сут.), в корневой системе наряду с усилением скорости генерации супероксидного радикала и накоплением H_2O_2 (Рис. 4) индуцировала повышение интенсивности ПОЛ (Рис. 5). В то же время в листьях происходило значительное снижение скорости образования супероксидного радикала, так же снижались содержание H_2O_2 и интенсивность ПОЛ. Более высокая интенсивность процессов ПОЛ в корнях растений приводила к повреждению клеточных мембран и утрате ими барьерных свойств (Рис. 6), тогда как листья достаточно успешно проходили процессы закаливания, приводящие к снижению интенсивности окислительных процессов и сохранению целостности клеточных мембран, что в конечном итоге обеспечивало им формирование устойчивости к низким температурам.

Более высокая интенсивность процессов ПОЛ в корнях растений приводила к повреждению клеточных мембран и утрате ими барьерных свойств (Рис. 6), тогда как листья достаточно успешно проходили процессы закаливания, приводящие к снижению интенсивности окислительных процессов и сохранению целостности клеточных мембран, что в конечном итоге обеспечивало им формирование устойчивости к низким температурам.

5. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.

Как известно, в детоксикации АФК участвуют антиоксидантные ферменты, важнейшими из которых являются супероксиддисмутаза, каталаза, аскорбат-пероксидаза, и пероксидаза гваякола. Эти ферменты играют существенную роль в снижении интенсивности окислительных процессов, вызванных гипотермией (Мерзляк, 1999; Лукаткин, 2002; Zhou, Zhao, 2004; Радюк и др., 2009).

Значительная разница в активности СОД в органах растений табака была выявлена уже при оптимальной температуре выращивания (22°C) (Рис. 7А). При этой температуре в листьях растений активность фермента была почти в 2 раза больше (22,6 ед. активности/г сыр. массы), чем в подземных органах растений (12,9 ед. активности/г сыр. массы). В процессе закаливания активность СОД (Рис. 7А) в листьях возрастала достаточно существенно (~ на 40%), а в корневой системе низкая исходная активность СОД после выдерживания растений при температуре 8°C в течение 6 суток снижалась в 6 раз.

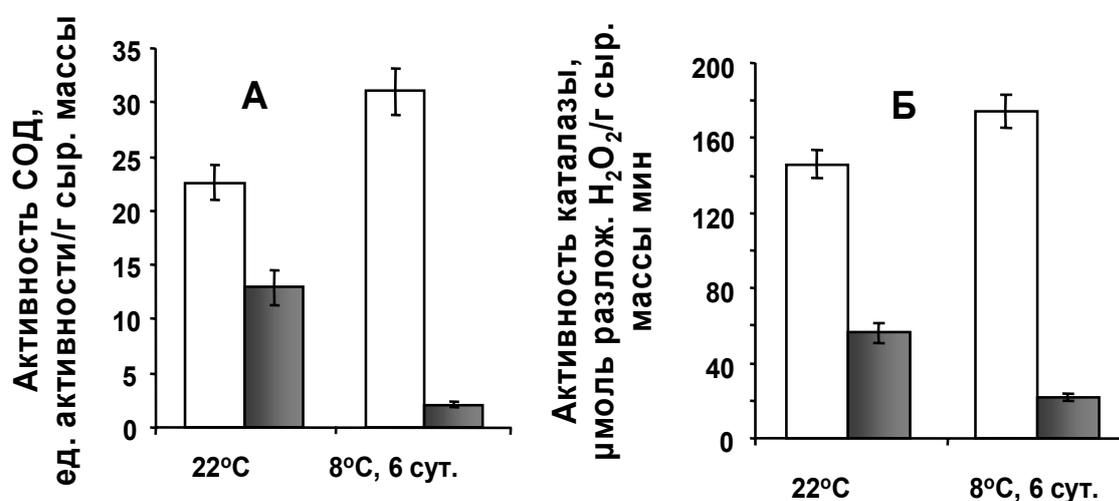


Рис. 7. Изменение активности СОД (А) и каталазы (Б) в листьях (□) и корнях (■) растений табака при низких положительных температурах.

В детоксикации активных форм кислорода, образующихся при окислительном стрессе, участвует еще один важный антиоксидантный фермент – каталаза, разлагающая перекись водорода.

Из рисунка 7Б видно, что активность каталазы, как и активность СОД, при оптимальной для роста температуре была выше в листьях растений, чем в корневой системе. Закаливание приводило почти к 20% росту активности каталазы в листьях и более чем двукратному снижению активности этого фермента в корнях (Рис. 7Б).

Исходный уровень активности пероксидазы гваякола, которая также способствует быстрой утилизации H₂O₂, при 22°C был значительно выше в корнях растений по сравнению с листовой тканью (Рис. 8А). Активность этой пероксидазы в корнях таба-

ка в результате воздействия низкими положительными температурами снижалась почти на 20%, а в листьях – возрастала более чем на 40% (Рис. 8А), повторяя тем самым тенденцию в изменении активности ферментов, рассмотренных выше.

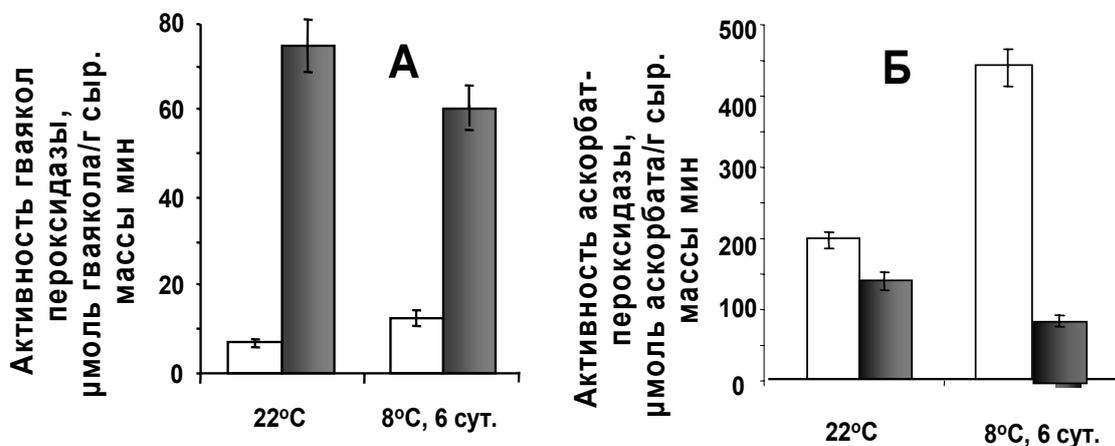


Рис. 8. Изменение активности пероксидазы гваякола (А) и аскорбат-пероксидазы (Б) в листьях (□) и корнях (■) растений табака при низких положительных температурах.

Помимо пероксидазы гваякола, при охлаждении большое значение имеет антиоксидантный фермент аскорбат-пероксидаза, которая является основным ферментом, утилизирующим H_2O_2 в хлоропластах. Активность этого фермента в листьях при 22°C превышала его активность в корнях (Рис. 8Б). После охлаждения (8°C, 6 сут.) отмечалось повышение активности аскорбат-пероксидазы в листьях практически вдвое, и снижение активности фермента в корневой системе более чем на 30%.

Таким образом, в листьях закаленных растений существенно повышалась активность СОД, каталазы и пероксидаз (Рис. 7 и 8), что могло приводить к снижению содержания АФК (Рис. 4) и интенсивности ПОЛ (Рис. 5). В то же время в корневой системе растений табака происходило снижение активности всех исследованных антиоксидантных ферментов, что сопровождалось увеличением скорости генерации супероксидного радикала и содержания H_2O_2 (Рис. 4). Накопление АФК приводило к повышению интенсивности ПОЛ (Рис. 5), что могло служить причиной пониженной по сравнению с листьями холодостойкости корней.

6. Изменение интенсивности фотосинтеза и темнового дыхания растений табака при низких положительных температурах.

Фотосинтез является поставщиком ассимилятов, которые необходимы как для жизнедеятельности растений при оптимальной температуре вегетации, так и для адаптации растений к гипотермии. В связи с этим, мы провели исследование CO_2 -газообмена как показателя интенсивности фотосинтеза и дыхания у теплолюбивых растений табака в условиях действия закаливающих температур.

Интенсивности фотосинтеза и дыхания во время закаливания снижались, но в разной степени (Табл. 2): скорость видимого фотосинтеза снижалась меньше, чем скорость темнового дыхания.

Таблица 2. Изменение CO_2 -газообмена растений табака при низких положительных температурах.

Параметры CO_2 -газообмена	Контрольные растения (измерения при 22°C)	Закаленные растения (измерения при 8°C)
Видимый фотосинтез, мг CO_2 /г сух. массы в ч	8,20±1,2	3,78±0,6
Темновое дыхание, мг CO_2 /г сух. массы в ч	4,10±0,7	1,57±0,3
Отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание	2,0±0,1	2,40±0,2

Это приводило к 20% увеличению отношения фотосинтез/дыхание, что рассматривается как положительное свойство, которое дает возможность более экономно расходовать усваиваемый углерод в условиях низкотемпературного стресса и служит количественной мерой способности растений к закаливанию (Klimov, Trunova, 1999). Изменения CO_2 -газообмена такого рода служат предпосылкой накопления бóльшего числа продуктов фотосинтеза, обеспечивающих комплекс адаптационных перестроек метаболизма, позволяющих растениям выживать при низких температурах (Klimov et al., 1999). Поэтому было необходимо исследовать изменения содержания сахаров в разных органах растений при закаливании.

7. Изменение содержания сахаров в листьях и корнях растений табака при низких положительных температурах.

Одной из особенностей закаленных растений является накопление большого количества в них сахаров, которые являются основным источником энергии и предшественниками при синтезе веществ с защитным эффектом, происходящим в период закаливания при низких положительных температурах. Обеспечение сахарами всех органов растения является важнейшим условием для успешной адаптации целого растения к гипотермии (Трунова, 2007).

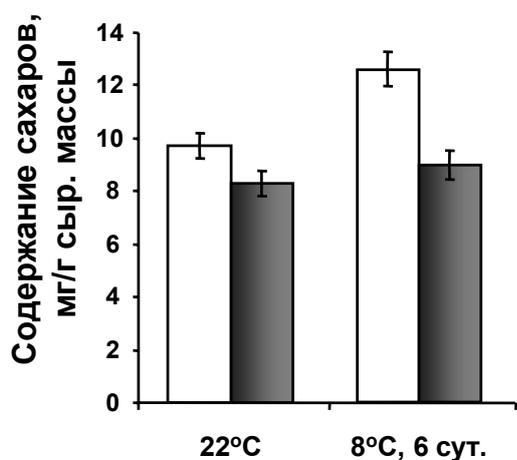


Рис. 9. Изменение содержания растворимых сахаров в листьях (□) и корнях (■) растений табака при низких положительных температурах.

Исследования показали (Рис. 9), что в результате закаливания в листьях растений табака количество растворимых сахаров увеличилось более чем на 20%, что является существенным для теплолюбивых растений, в то время как в корневой системе их содержание почти не изменялось, вследствие чего их количество, по-видимому, оказалось недостаточным для адаптации корневой системы при низких положительных температурах.

8. Загрузка флоэмы при низких положительных температурах.

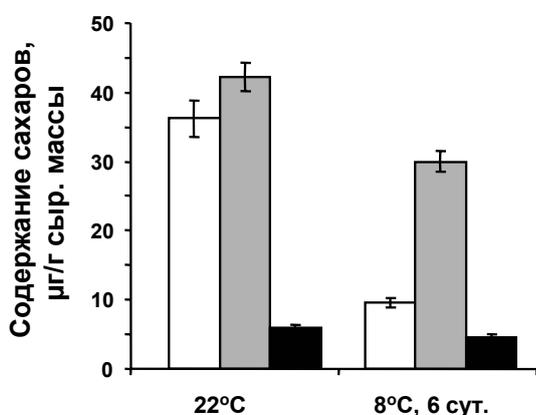


Рис. 10. Изменение содержания сахаров (□ – сахароза, ■ – глюкоза, ■ – фруктоза) в апопласте листьев растений табака при низких положительных температурах.

Обнаруженные нами различия по содержанию сахаров в разных органах растений табака при закаливании могут быть связаны с изменениями процессов оттока ассимилятов из листьев в корни. Поскольку табак как представитель семейства пасленовых имеет преимущественно апопластный тип загрузки флоэмы (Гамалей, 1990), то данные о содержании сахаров в апопласте листьев этих растений в норме

и при закаливающих температурах способны дать ответ на вопрос об интенсивности загрузки флоэмы при закаливании.

До закаливания в апопласте листьев растений табака преобладали глюкоза и сахароза, тогда как содержание фруктозы было незначительно (Рис. 10). После закаливания наблюдалось снижение содержания всех исследуемых форм сахаров, при этом содержание глюкозы уменьшалось на 30%, фруктозы – более чем на 20%, а сахарозы – в 3,5 раза.

Можно предположить, что столь существенное снижение содержания в апопласте основной транспортной формы сахаров – сахарозы приводило к существенному, хотя и не полному, ингибированию загрузки флоэмы, а, следовательно, и к торможению оттока ассимилятов из листьев в корни, что может являться одной из причин повышения содержания сахаров в листьях и неспособности корневой системы табака к их накоплению при низких положительных температурах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптация растений к низким температурам является сложным, интегральным процессом, протекающим на всех уровнях структурной организации организма и затрагивающим практически все функции растения (Klimov et al., 1999; Титов и др., 2006; Трунова, 2007; Margesin, 2007). На сегодняшний день возможности закаливания теплолюбивых растений к низким температурам изучены недостаточно полно. В литературе практически отсутствуют данные о причинах разной устойчивости листьев и корней теплолюбивых растений к гипотермии. Поэтому основное внимание в данной работе было уделено исследованию процессов низкотемпературного закаливания типичного представителя теплолюбивых растений – табака (*Nicotiana tabacum* L.) в связи с холодоустойчивостью его органов.

Установлено, что во время холодной экспозиции (8°C, 6 сут.) в листьях и корнях табака происходили разнонаправленные изменения физиологических процессов, обеспечивающие повышение холодоустойчивости листьев и неспособность корневой системы к низкотемпературному закаливанию (Рис. 11).

Листья		Корни
↗	Содержание липидов	↘
↗	Содержание ПНЖК	↘
↗	ИН	↘
↘	Генерация АФК	↗
↘	ПОЛ	↗
↗	Активность АО ферментов	↘
↘	Фотосинтез	
↘	Дыхание	
↗	Фотосинтез/дыхание	
↗	Содержание сахаров	=
↘	Загрузка флоэмы	

Повышение устойчивости к гипотермии

Снижение устойчивости к гипотермии

Рис. 11. Схема изменений физиологических процессов в растениях табака при низких положительных температурах.

Увеличение содержания ПНЖК в мембранных липидах листьев обеспечивало сохранение текучести мембран в период охлаждения, что должно стабилизировать работу электрон-транспортных цепей, и могло являться причиной снижения генерации активных форм кислорода и, как следствие, интенсивности перекисного окисления липидов. С другой стороны, поддержание жидкостных свойств мембран листьев закаленных растений позволяло сохранить клеточный гомеостаз и, тем самым, обеспечить активность антиоксидантных ферментов в условиях низких температур, что также предотвращало избыточное накопление АФК.

Уменьшение содержания ПНЖК в корневой системе при закаливании табака сопровождалось снижением активности всех исследованных антиоксидантных ферментов, накоплением АФК и повышением интенсивности ПОЛ, что приводило к тому,

что корни растений табака после шестисуточной холодной экспозиции при 8°C обладали меньшей по сравнению с листьями устойчивостью к окислительному стрессу, развивающемуся при гипотермии.

Увеличение содержания ПНЖК в мембранных липидах листьев, происходящее в основном за счет накопления линоленовой кислоты (Таблица 1), которая в значительном количестве содержится в мембранах хлоропластов, позволяло закаленным растениям поддерживать фотосинтез, хотя его интенсивность снижалась более чем в два раза по сравнению с контрольными растениями. За время закаливания интенсивность дыхания снижалась в большей мере чем фотосинтеза, что приводило к росту отношения фотосинтез/дыхание и обеспечивало увеличение содержания сахаров в листьях. В то же время в корневой системе содержание сахаров существенно не изменялось, вследствие чего их количество оказывалось недостаточным для успешного прохождения процесса закаливания. Обнаруженные различия по содержанию сахаров в разных органах растений табака в результате закаливания, по-видимому, можно объяснить ингибированием загрузки флоэмы, что приводит к торможению оттока ассимилятов из листьев в корни.

В ходе проведенной работы показана возможность значительного повышения холодоустойчивости надземной части растений табака и неспособность корневой системы табака к низкотемпературной адаптации, что является лимитирующим фактором, определяющим в целом низкий потенциал устойчивости теплолюбивых растений к гипотермии. Такие особенности теплолюбивых растений определяются, по-видимому, тем, что стратегия низкотемпературной адаптации этих растений направлена на формирование повышенной холодоустойчивости надземной части, в то время как корневая система в местах их исконного произрастания практически не подвергается повреждающему действию низких температур.

ВЫВОДЫ

1. Листья табака реагировали на холодное закаливание увеличением содержания липидов и доли ПНЖК в их составе, в то время как в корнях происходило снижение содержания липидов и входящих в их состав ненасыщенных ЖК.
2. Закаливание растений табака приводило к снижению уровня АФК и интенсивности ПОЛ в листьях одновременно с возрастанием обоих этих показателей в корнях, что свидетельствует о меньшей устойчивости корневой системы к окислительному стрессу.
3. Листья после закаливания отличались от корней повышенной активностью СОД, каталазы и пероксидаз, что противодействовало накоплению АФК и способствовало снижению интенсивности ПОЛ в листьях.
4. Снижение скорости фотосинтеза в меньшей степени, чем скорости дыхания в результате закаливания обеспечивало увеличение отношения фотосинтез/дыхание, что является предпосылкой к накоплению продуктов фотосинтеза и повышению устойчивости растений к действию низких температур.
5. Снижение содержания сахаров в апопласте листьев растений табака при закаливании вызывало ингибирование загрузки флоэмы, что может являться причиной неспособности корневой системы табака к накоплению сахаров при низких положительных температурах.
6. Листья теплолюбивых растений табака способны значительно повышать устойчивость к низким температурам. Неспособность корневой системы к низкотемпературному закаливанию определяет в целом низкую устойчивость теплолюбивых растений табака к гипотермии.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. **Антипина О.В.**, Попов В.Н., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Трунова Т.И. (2008) Холодостойкость теплолюбивых растений табака в связи с липидным метаболизмом. *Тез. докл. межд. науч. конф. "Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений"*, Екатеринбург, с. 52-53.

2. Popov V., **Antipina O.**, Trunova T. (2008) Oxidative stress in the tobacco plants at hypothermia. *Hort. Veg. Growing*, **27**, 121-127.
3. Попов В.Н., **Антипина О.В.** (2009) Исследование низкотемпературной адаптации растений табака. *Мат. симп. "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования"*, Москва, с. 216-220.
4. Попов В.Н., **Антипина О.В.** (2009) Особенности низкотемпературной адаптации теплолюбивых растений. *Мат. Межд. научно-практ. конф. "Интенсификация и оптимизация продукционного процесса сельскохозяйственных растений"*, Орел, с. 128-132.
5. **Антипина О.В.**, Попов В.Н. (2009) Влияние процессов перекисного окисления липидов на закаливание теплолюбивых растений табака к гипотермии. *Тез. докл. межд. научн. конф. "Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера"*, Апатиты, с. 33-34.
6. **Антипина О.В.**, Попов В.Н. (2010) Увеличение интенсивности ПОЛ в корневой системе табака снижает устойчивость растений к гипотермии. *Тез. докл. 14 Межд. Пущинская конф. молодых ученых "Биология – наука XXI века"*, Пущино, с. 309-310.
7. Попов В.Н., **Антипина О.В.** (2010) Интенсивность окислительного стресса в листьях и корнях растений табака при закаливании. *Мат. научн. конф. "Вторые чтения памяти профессора О.А. Зауралова"*, Саранск, с.66-69.
8. Попов В.Н., **Антипина О.В.** (2010) Роль супероксиддисмутазы в устойчивости растений табака к гипотермии. *Мат. IX Межд. научно-метод. конф. "Интродукция нетрадиционных растений"*, Мичуринск, Т. II. с. 156-160.
9. **Антипина О.В.** (2010) Роль листьев и корней в формировании устойчивости к гипотермии растений табака. *Тез. докл. Всеросс. симп. "Растение и стресс"*, Москва, с. 38-39.
10. Попов В.Н., **Антипина О.В.**, Трунова Т.И. (2010) Перекисное окисление липидов при низкотемпературной адаптации листьев и корней теплолюбивых растений табака. *Физиология растений*, **57**, 153-156.