

0-785315

На правах рукописи

Бояршинов Андрей Владимирович

**УЧАСТИЕ И ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА
В СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ НА
ОБЕЗВОЖИВАНИЕ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Уфа - 2010

Работа выполнена в лаборатории регуляторов роста и устойчивости растений кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Асафова Елена Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Пахомова Валентина Михайловна

доктор биологических наук, профессор
Кудоярова Гюзель Радомесовна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Марийский государственный университет»

Защита состоится « 16 » декабря 2010 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.013.11 в ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет» по адресу: 450074, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32, биологический факультет, ауд. 332.

Факс (347) 273-67-78; e-mail: disbiobsu@mail.ru

Официальный сайт БашУ: <http://www.bsunet.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет». Автореферат диссертации размещён на официальном сайте: <http://www.bsunet.ru/node/386>

Автореферат разослан « 15 » ноября 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета д.б.н.



НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000681309

Шарипова М.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Засуха относится к одному из самых распространённых и критически значимых для растений неблагоприятных факторов окружающей среды, вызывающих резкое снижение продуктивности многих сельскохозяйственных культур (Шматъко и др., 1989; Passioura, 2005). Одной из неспецифических реакций растений на недостаток воды является усиленное образование активных форм кислорода (АФК), что приводит к развитию окислительного стресса и перекисного окисления липидов – ПОЛ (Чиркова, 2001). Интенсивность окислительного стресса отражает эффективность работы антиоксидантных систем растительных клеток. Сравнение показателей окислительного стресса и активности антиоксидантных ферментов в условиях водного стресса может быть удобным диагностическим критерием для оценки устойчивости растений к засухе.

Начиная с 90-х гг. изучается сигнальная роль молекулы оксида азота (II) – NO. Раскрыты пути образования и сигналинга NO в клетках растений (Neill et al., 2008), показана его защитная роль в условиях биотического и абиотического стрессов (Durner et al., 1998; Zhao et al., 2004). Установлено, что стресс-протекторное действие NO на растения реализуется путем активации антиоксидантных ферментов и накопления низкомолекулярных антиоксидантов (Hung et al., 2002; Чжан и др., 2008). Однако по-прежнему существует очень мало сведений об участии NO, как сигнального соединения, в стрессовом ответе растений, в том числе сельскохозяйственных, на водный дефицит (García-Mata et al., 2001). Также очень мало данных относительно эффектов экзогенных доноров NO на активность антиоксидантных ферментов в растениях в условиях водного стресса.

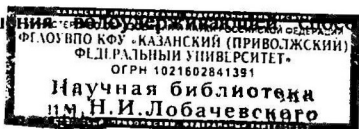
В настоящее время накапливается все больше фактов об NO-синтазном пути образования оксида азота в клетках микроорганизмов (Chen et al., 1994). Так, некоторые молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* способны продуцировать NO в ходе ферментативного окисления L-аргинина (Adawie et al., 1997; Morita et al., 1997; Яруллина и др., 2007). Правомерно предполагать, что микроорганизмы способны модулировать физиологическое состояние растений через синтез NO. Однако, в настоящее время отсутствуют сведения об участии NO-синтезирующих микроорганизмов во взаимоотношениях с растениями в условиях стресса.

Цель и задачи исследования. Целью работы было установить участие эндогенного оксида азота (NO) в стрессовых физиолого-биохимических реакциях растений яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на обезвоживание и оценить эффект экзогенного донора (SNP), а также биологического продуцента NO (*Lactobacillus plantarum* 8P-A3) на устойчивость растений к водному стрессу.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать динамику показателей водного статуса, содержания H_2O_2 и малонового диальдегида (МДА), активности антиоксидантных ферментов и уровня оксида азота (NO) в отсечённых листьях при подсушивании и в листьях целых растений яровой пшеницы в условиях почвенной засухи;
2. Установить особенности изменения содержания эндогенного NO и показателей окислительного стресса (H_2O_2 и МДА) в растениях двух различающихся по устойчивости к засухе сортов яровой пшеницы при действии водного дефицита;
3. Оценить эффект экзогенного донора NO, нитропруссид натрия (SNP), на изменение водного статуса, ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в отсечённых листьях пшеницы при обезвоживании;
4. Изучить сравнительное влияние предварительной обработки растений пшеницы бактериальной суспензией *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, биогенного продуцента оксида азота, и SNP на развитие окислительного стресса в листьях при последующем водном стрессе.

Научная новизна работы. Впервые показано быстрое и преходящее накопление оксида азота листьями пшеницы в ответ на обезвоживание и на последующую регидратацию, а также увеличение содержания NO в листьях целых растений, перенёсших почвенную засуху. С использованием двух экспериментальных подходов (подсушивание отсечённых листьев и почвенная засуха), охарактеризована сравнительная чувствительность к обезвоживанию двух сортов яровой мягкой пшеницы разного географического происхождения, различающихся по устойчивости к засухе, и выявлены сортовые особенности динамики эндогенного NO. Установлен защитный эффект экзогенного донора NO нитропруссид натрия на листья пшеницы при действии обезвоживания, который реализуется путём повышения



усиления активности антиоксидантных ферментов. Впервые показано, что предобработка растений пшеницы молочнокислыми бактериями *Lactobacillus plantarum* оказывает сходный с SNP антистрессовый эффект, снижая интенсивность окислительного стресса в листьях при их последующем обезвоживании.

Практическая значимость работы. Полученные результаты могут быть учтены при выращивании пшеницы разных сортов в районах с засушливыми условиями. Перспективным способом повышения устойчивости к засухе может являться создание новых сортов пшеницы с повышенной продукцией эндогенного NO. Защитный эффект доноров NO может быть основой для создания химических и биологических препаратов, повышающих устойчивость растений к дефициту влаги и другим абиотическим стрессорам. Материал диссертации может быть использован для чтения курса лекций по физиологии и стрессологии растений.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были доложены на Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем. VI съезд Общества физиологов растений России», Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.; на ежегодных отчётных конференциях КГУ, 2008-2010 г.; на Международной конференции «Проблемы биоэкологии и пути их решения (Вторые Ржавитинские чтения)» Саранск, 15-18 мая 2008 г.; на Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений», годичное собрание ОФР, 6-10 октября, 2008 г. – Екатеринбург; на I-м Всероссийском симпозиуме студентов и аспирантов «Симбиоз-2008. Биология: традиции и инновации в XXI веке», Казань, 2008; на 14-й Зимней студенческой школе «Биология растительной клетки» г. Пушкино, 2-6 февраля, 2009 г. (Пушино, 2009); на Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных «Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и практики в современных условиях и пути их решения», посвящённой памяти Р.Г. Гареева, Казань, 26-27 февраля, 2009 (Казань, 2009); на 13-м ежегодном Симпозиуме студентов и аспирантов-биологов Европы «SymBioSE 2009. Biology: Expansion of Borders» Казань, 30 июля - 8 августа, 2009 (Kazan, 2009). По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 3 статьи в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, изложения результатов и их обсуждения (в 4 главах), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 126 страницах, содержит 5 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 164 источников, из них 127 на иностранном языке.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований и схема опытов. Исследования проводили на разных сортах яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Два из трёх сортов – Дебют и Закамская имеют местное происхождение (Татарстан) и обладают высокой засухоустойчивостью, один – Омская 33 – выведен в Западной Сибири и является средnezасухоустойчивым. Использовали 7-суточные растения, выращенные на водопроводной воде при 25/18°C и фотопериоде 12/12 ч. Для опыта брали средние части листьев, длиной 4 см, выдержанные после отсечения 1.5 ч в дистиллированной воде для устранения последствий раневого стресса. Обезвоживание создавали путём подсушивания разложенных на белой бумаге листьев в вегетационной камере «Биотрон-3» при t 26-28°C и освещении 5 клк в течение различных промежутков времени (от 5 мин до 3 ч). По окончании экспозиции часть листьев подвергали регидратации, помещая их в пробирки с дистиллированной водой. Влияние засухи на растения изучали методом почвенных культур. Наклонувшиеся семена пшеницы высевали в сосуды, содержавшие серую лесную почву. Растения выращивали на фотопериоде 12/12 ч, при t 25/18°C, и освещённости 10 клк. В течение первых 10 сут все сосуды поливали водой до уровня 70% от полной влагоёмкости почвы (ПВП) (Сказкин и др., 1973). Засуху создавали прекращением полива опытных растений. В течение 3 сут влажность почвы в опытных сосудах опускалась до 30-25% от ПВП, на этом уровне её поддерживали ещё 5 дней. К концу засухи с растений отбирали усреднённые пробы листьев 1-го и 2-го ярусов для анализа физиологических и биохимических показателей. Оставшиеся опытные растения снова начинали поливать до 70% от ПВП и спустя 3 сут отбирали пробы листьев для анализа.

Для изучения эффектов донора NO средние части листьев 7-суточных проростков пшеницы сорта Дебют подвергали вакуум-инфильтрации (15 мин)

растворами нитропруссиды натрия (SNP) в концентрациях 25-500 мкМ или дистиллированной водой (контроль) и инкубировали 1 ч в этих же растворах в темноте. Затем промывали дважды дистиллированной водой, обсушивали фильтровальной бумагой и подвергали обезвоживанию.

Обработку целых проростков пшеницы молочнокислыми бактериями *Lactobacillus plantarum* и химическим донором NO проводили путём погружения их корнями в суспензию бактерий (10^9 клеток/мл) или в раствор SNP (250 и 500 мкМ) на 1.5-2 ч. Использовали трижды отмытые от среды и ресуспендированные клетки *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, выделенные из препарата «Лактобактерин сухой» (ФГУП «Пермское НПО «Биомед»). Для роста бактерий использовали среду MPC (De Man-Rogosa-Sharpe) с добавлением или без добавления 100 мкМ L-аргинина – субстрата NOS-активности. После инкубации листья проростков срезали и подвергали обезвоживанию в течение 3 ч, как описано выше.

Определение ОСВ, оводнённости, водного дефицита и скорости потери воды в листьях. Относительное, общее содержание воды (оводнённость) и водный дефицит (ВД) в листьях находили по формулам:

$$\text{ОСВ} = (m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) / (m_{\text{тург}} - m_{\text{сух}}) \cdot 100 \%,$$

$$\text{Оводнённость} = (m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) / m_{\text{сыр}} \cdot 100 \%,$$

$$\text{ВД} = ((m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) - (m_{\text{тург}} - m_{\text{сух}})) / (m_{\text{тург}} - m_{\text{сух}}) \cdot 100 \%,$$

где $m_{\text{тург}}$ – сырая масса листьев в состоянии тургора, $m_{\text{сыр}}$ – сырая масса листьев после завядания, $m_{\text{сух}}$ – сухая масса листьев. Для достижения листьями состояния тургора их выдерживали в воде: 2 ч – после срезания 7-суточных проростков или около суток – после взятия проб с растений, выращенных в почве. Исходя из величин потери воды листьями в ходе подсушивания, рассчитывали скорость потери воды листьями (СПВ) по формуле:

$$\text{СПВ} = (m_1 - m_2) / m_1 / t,$$

где m_1 – исходная масса навески листьев, m_2 – масса листьев после периода подсушивания, t – время подсушивания в часах. СПВ выражали в г воды/г сырой массы*час (Гунес и др., 2008).

Определение количества H_2O_2 в листьях проводили согласно Gay et al. (2000). 0.25 г листьев растирали в ледяном 50 мМ боратном буфере (pH 8.4), гомогенат центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин, супернатант добавляли в

реакционную смесь, содержащую краситель Xylenol Orange, инкубировали 15-30 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре (СФ) при $\lambda=560$ нм. Концентрацию H_2O_2 находили по калибровочной кривой и выражали в мкмоль/грамм сухой массы.

Определение ПОЛ в листьях. Навеску листьев в 0,2 г растирали с 4 мл 0,1% (вес/объем) трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин. 1 мл супернатанта смешивали с 4 мл 20% ТХУ, содержащей 0,5% (вес/объем) 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Смесь помещали в водяную баню, нагретую до $95^{\circ}C$ на 30 мин, затем охлаждали в ледяной бане и снова центрифугировали 10 мин при 8000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли на СФ при двух длинах волн: 532 и 600 нм. Содержание МДА в растительной ткани (мкмоль г/сухой массы) рассчитывали по формуле:

$$((E_{532} - E_{600})_{\text{проба}} - (E_{532} - E_{600})_{\text{холостой}}) / (\epsilon \cdot \text{сухая масса навески, г}),$$

где ϵ – коэффициент молярной экстинкции МДА, равный $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath, Packer, 1968).

Определение содержания NO в листьях проводили согласно Zhou et al. (2005). 0,2 г листьев растирали с 5 мл охлажденного 50 мМ ацетатного буфера (pH 3,6), содержащего 4% $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$. После центрифугирования 15 мин при 8000 об/мин и $+4^{\circ}C$ к супернатанту добавляли 0,1 г древесного угля, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр. 1 мл фильтрата смешивали с 1 мл реактива Грисса, выдерживали при комнатной температуре 30 мин и измеряли оптическую плотность при $\lambda=540$ нм против воды. Количество NO рассчитывали по калибровочным растворам $NaNO_2$ в ацетатном буфере и выражали в мкмоль/г сухой массы листа.

Определение активности антиоксидантных ферментов. 0,2 г листьев растирали при $4^{\circ}C$ в 4 мл 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,8), содержащем 0,1 мМ ЭДТА, 5% (вес/вес) поливинилпирролидона (PVP) и 10% (вес/объем) сорбита. Экстракт фильтровали через 2 слоя капроновой ткани и ш/ф при 8000 об/мин 30 мин. Содержание белка в ферментных экстрактах определяли по Лоури в модификации Харты (1977). Активность аскорбатпероксидазы (КФ I.11.1.11.) определяли на СФ по снижению поглощения света реакционной смесью ($\lambda=290$ нм) при окислении аскорбата за 1 мин (Nacano, Asada, 1981) и выражали в мкмоль

окисленной аскорбиновой кислоты ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на мг белка в мин. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по снижению поглощения света реакционной смесью за 2 минуты при 240 нм, вызванном разложением H_2O_2 и выражали в мкмоль H_2O_2 ($\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на мг белка в минуту. Полученные результаты обработаны статистически в программе Microsoft Excel, на графиках приведены средние значения и их стандартные ошибки, достоверность различий между средними оценена по критерию Стьюдента при $P<0.05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Окислительный стресс и динамика уровня NO в листьях при обезвоживании. При завядании отсечённых листьев происходило снижение их общей оводнённости, ОСВ и нарастание водного дефицита (табл. 1). Наиболее быстрое падение водного статуса наблюдали после 1-го часа завядания. К 3 ч листья теряли около половины своей исходной сырой массы, а оводнённость, ОСВ и ВД составили 80.1, 51.6, и 48.5%, соответственно. После 1 ч регидратации все показатели возвращались к исходным значениям, что указывает на восстановление тканями листьев нормального водного статуса (табл. 1) и сохранение их жизнеспособности.

К 3 ч обезвоживания содержание H_2O_2 и МДА в тканях листьев достигало своего максимума, превышая исходное значение в 2.7 и 1.25 раза, соответственно (рис. 1, а). После 1 ч регидратации уровень пероксида снижался до контрольного, в то время как содержание МДА достоверно не изменялось (рис. 1, а), что, вероятно, связано с его более медленной метаболизацией. Обнаружена тесная отрицательная корреляция между ОСВ и количеством H_2O_2 в листьях: $r=-0.91$. Активность аскорбатпероксидазы (АПО) в ходе 3 ч обезвоживания снижалась на 50% относительно начального уровня и восстанавливалась при регидратации (рис. 1, б). Снижение активности АПО в нашем случае может объясняться уменьшением пула восстановленного аскорбата, что часто наблюдается при водном стрессе (Iturbe-Orgaetxe et al., 1998; Гунес и др., 2008). Активность каталазы (КАТ) при обезвоживании листьев сначала снижалась, а к 3 ч – частично восстанавливалась (рис. 1, б). Такой характер изменений может быть связан с фазностью адаптивного ответа листьев на стресс и изменением уровня H_2O_2 –

Таблица 1. Изменение оводнённости, ОСВ и ВД листьев пшеницы (с. Дебют) при обезвоживании и регидратации

Время, ч	Оводнённость, % от сырой массы	ОСВ, %	ВД, %
	Завядание		
0	85.1 ± 0.3	96.1 ± 0.6	3.9 ± 0.3
1	84.8 ± 0.6	70.3 ± 1.0	29.3 ± 0.7
2	82.2 ± 0.6	61.4 ± 1.1	38.0 ± 0.9
3	80.1 ± 0.9	51.6 ± 1.0	48.5 ± 1.1
Регидратация			
1	84.7 ± 0.4	97.8 ± 0.6	2.4 ± 0.5
2	84.7 ± 0.4	97.6 ± 0.9	1.6 ± 0.5
3	84.2 ± 0.4	99.6 ± 0.5	2.0 ± 0.1

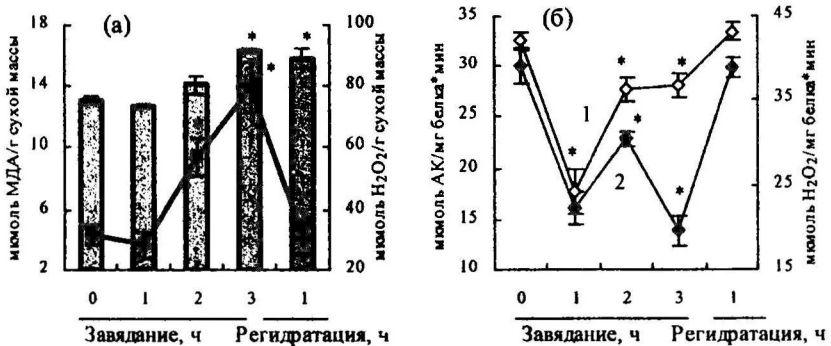


Рис. 1. Динамика (а): уровня H₂O₂ (график) и МДА (столбики) и (б): активности АПО (1) и КАТ (2) в листьях пшеницы (с. Дебют) при обезвоживании и регидратации. * – различия с контролем (0 ч) достоверны при P<0.05.

субстрата каталазы (Bai et al., 2009). Подавление активности обоих антиоксидантных ферментов указывает на ослабление системы антиоксидантной защиты, вызванное обезвоживанием.

В ответ как на обезвоживание, так и на последующую регидратацию в листьях пшеницы происходило кратковременное накопление NO. Повышение

уровня оксида азота было зафиксировано уже через 15 мин обезвоживания, и в последующем он возрастал в несколько раз (рис. 2, б). Пик увеличения – в 1.9 раза – приходился на 1-й и 2-й ч завядания и регидратации (рис. 2, а). Снижение ОСВ в листьях по времени предшествовало подъему уровня NO, а коэффициент корреляции (-0.71) указывает на обратную связь между этими показателями и предполагает, что потеря воды является причиной увеличения содержания эндогенного NO.

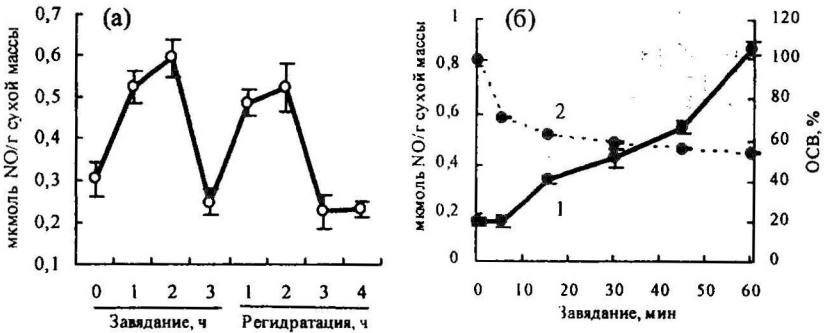


Рис. 2. Динамика уровня NO в листьях пшеницы (с. Дебют) при завядании и регидратации (а) и в ходе 1-го часа завядания (б): 1 – содержание NO, 2 - ОСВ.

2.2. Сортовые особенности стрессовых реакций листьев яровой пшеницы на обезвоживание. В свете полученных данных о накоплении NO в листьях пшеницы при изменении их водного статуса представляло интерес выяснить, обладает ли динамика эндогенного NO сортовой спецификой. Для этого исследовали изменение показателей водного статуса, окислительного стресса и динамику уровня NO в листьях растений пшеницы двух сортов, различающихся по устойчивости к засухе (Омская 33 и Закамская). За 3 ч завядания листья пшеницы с. Омская 33 испытывали большее снижение общего и относительного содержания воды, чем листья с. Закамская (рис. 3). Как видно из рис. 4, за 1-й час стресса листья пшеницы с. Закамская испаряли 0.251 г воды/г сырой массы листа, а с. Омская 33 – 0.279 г воды/г сырой массы. По мере обезвоживания скорость водопотери существенно падала, но достоверные различия между сортами сохранялись и средняя СПВ, рассчитанная за 3 часа

эксперимента, у с. Закамская составила 0.188 г воды/г сырой массы*час, у Омской 33 – 0.213 г воды/г сырой массы*час (рис. 4). Таким образом, листья с. Закамская обладали большей водоудерживающей способностью в сравнении со среднезасухоустойчивым сортом Омская 33.

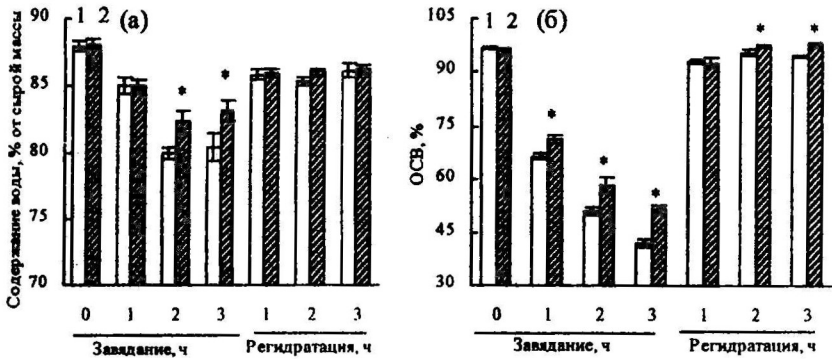


Рис. 3. Динамика общего (а) и относительного (б) содержания воды в листьях яровой пшеницы двух сортов при завядании и регидратации: 1 – Омская 33, 2 – Закамская; * – различия между сортами достоверны при $P < 0.05$

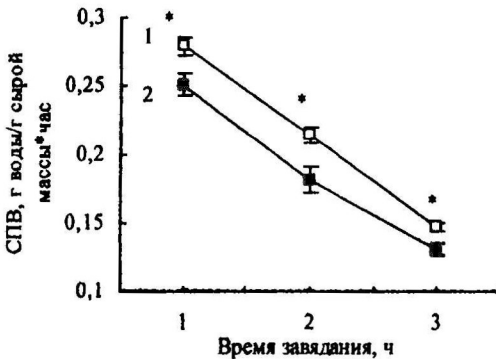


Рис. 4. Изменение скорости потери воды (СПВ) изолированными листьями в ходе завядания. 1 – Омская 33, 2 – Закамская; * – различия между сортами достоверны при $P < 0.05$

В первые 2 ч стресса между сортами не было выявлено достоверных различий в количестве накапливаемого H_2O_2 , а к 3 ч его уровень в листьях Омской 33 возрастал в 3.5 раз, а у с. Закамская – в 1.9 раз от исходного. При этом количество H_2O_2 в листьях с. Омская 33 становилось выше, чем у с. Закамская в 2 раза (рис. 5). Большее накопление H_2O_2 предполагает более интенсивное развитие

ПОЛ в клетках растений (Гунес и др., 2008; Холодова и др., 2007), однако после 3 ч стресса различия в содержании МДА между сортами были недостоверны (табл. 2). Полученные результаты указывают на большую чувствительность к обезвоживанию листьев пшеницы с. Омская 33, что проявилось в более интенсивном накоплении ими H_2O_2 , на фоне тенденции к большему уровню ПОЛ.

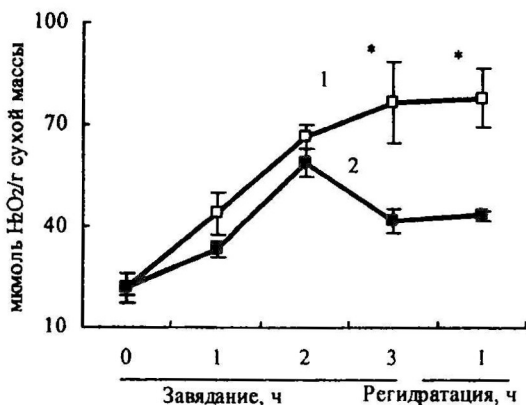


Рис. 5. Динамика содержания H_2O_2 в листьях при завядании и регидратации. 1 – Омская 33, 2 – Закамская; * – различия между сортами достоверны при $P < 0.05$

Таблица 2. Количество МДА в листьях пшеницы двух сортов в норме (контроль) и при обезвоживании (3 ч).

Вариант	Омская 33		Закамская	
	мкмоль/г сухой массы	% от контроля	мкмоль/г сухой массы	% от контроля
Контроль	17.5 ± 0.6	100	18.0 ± 0.4	100
Завядание	21.3 ± 0.7	121.8	20.6 ± 0.2	114.9

2.3. Динамика эндогенного NO в листьях двух сортов пшеницы при обезвоживании. К 1 ч обезвоживания количество NO в листьях с. Омская 33 и с. Закамская возрастало в 2.6 и 2.1 раза, соответственно. Повышенный уровень NO сохранялся ко 2-му часу обезвоживания, хотя в листьях с. Омская 33 уже начинался его спад. К 3 ч стресса содержание оксида азота возвращалось к своему начальному уровню в листьях обоих сортов. Такой же преходящий подъем уровня NO наблюдали на 1 и 2 ч регидратации листьев (рис. 6, а). Можно заметить, что пик накопления NO в листьях с. Закамкая приходился на 1-й и 2-й ч завядания, в

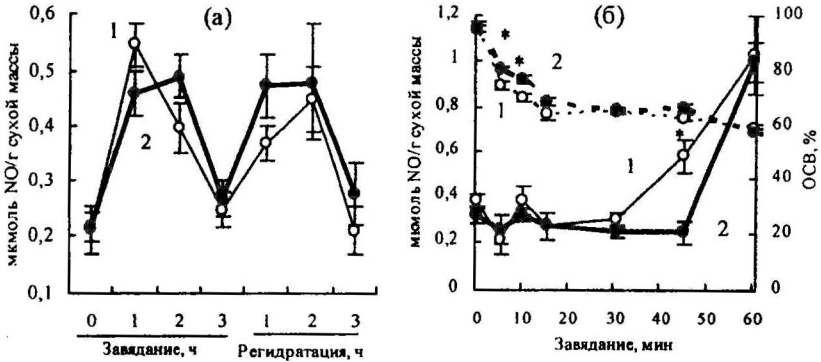


Рис. 6. Динамика уровня NO в листьях пшеницы сортов Омская 33 (1) и Закамская (2) при обезвоживании и регидратации (а) и в ходе 1-го часа завядания (б); * – различия между сортами достоверны при $P < 0.05$.

то время как у Омской 33 – только на 1 ч ($P < 0.05$). По нашему мнению, такие различия могли быть обусловлены разной скоростью потери воды листьями. Из рис. 6(б) видно, что листья пшеницы с. Омская 33 быстрее теряли воду в ходе 5 и 10 мин завядания – снижение ОСВ составило 21.2 и 25.5%, а в листьях Закамской 14.4 и 17.8%, соответственно. Возрастание уровня NO в листьях Омской 33 происходило после 45 мин, а в листьях пшеницы с. Закамская только к 60 мин обезвоживания (рис. 6, б). Следовательно, в листьях с. Омская 33 аккумуляция NO начиналась раньше, чем в листьях с. Закамская. Известно, что активация сигнальных систем в ответ на обезвоживание происходит через активацию мембранносвязанного осмосенсора, отслеживающего силу натяжения плазматической мембраны клетки (Trewavas et al., 2000; цит. по Алехина и др., 2007). Поэтому более быстрая потеря воды и тургора листьями с. Омская 33 может приводить к более раннему "включению" NO-сигнальной системы в сравнении с листьями с. Закамская.

2.4. Влияние почвенной засухи и последующего полива на водный статус, ПОЛ и содержание NO в растениях пшеницы двух сортов. Через 5 сут почвенной засухи уменьшение общего содержания воды в листьях Омской 33 и

Закамской составило 11.2% и 6.7%, ОСВ – 43 и 34%, а ВД возрастал в 13.4 и в 10.7 раз, соответственно. Следовательно, более благоприятный водный режим при действии почвенной засухи, как и при обезвоживании отсечённых листьев, сохраняли растения пшеницы засухоустойчивого сорта Закамская. После возобновления полива значения изучаемых параметров водного статуса возвращались к уровню контроля (табл. 3). В условиях засухи уровень МДА в листьях Омской 33 был на 29% выше, чем у Закамской (рис. 7, а). Вместе с тем засуха не изменяла уровень ПОЛ относительно контроля ни у одного из сортов, что может быть следствием метаболической адаптации растений к условиям длительного обезвоживания (Loggini et al., 1999). Полученные результаты указывают, что растения пшеницы с. Закамская испытывали меньшие окислительные повреждения мембранных липидов в сравнении с растениями с. Омская 33 в условиях почвенной засухи.

Таблица 3. Оводнённость, относительное содержание (ОСВ) воды и водный дефицит (ВД) в растениях яровой пшеницы двух сортов в норме (контроль), при действии почвенной засухи и после возобновления полива.

Засуха	Оводнённость, %		ОСВ, %		ВД, %	
	Омская 33	Закамская	Омская 33	Закамская	Омская 33	Закамская
Контроль	86.1 ± 0.3	87.0 ± 0.1	96.7 ± 0.3	96.7 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.3
Опыт	76.9* ± 0.9	81.6 ± 0.8	53.2* ± 2.1	62.5 ± 3.1	46.8* ± 2.4	37.5 ± 2.7
Полив	Омская 33	Закамская	Омская 33	Закамская	Омская 33	Закамская
Контроль	86.1 ± 1.1	87.3 ± 0.6	95.5 ± 0.8	95.6 ± 0.4	4.7 ± 0.5	5.3 ± 0.4
Опыт	87.1 ± 0.4	87.6 ± 0.2	95.5 ± 0.5	94.2 ± 1.3	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2

* – различия между сортами достоверны при P<0.05

В контроле содержание NO в листьях пшеницы с. Закамская было на 26% выше, чем у с. Омская 33 (рис. 7, б). Под влиянием засухи количество NO в растениях не изменялось, что может быть объяснено его фазной динамикой, а различия между сортами по этому показателю не выявлены. После возобновления полива у обоих изучаемых сортов происходило увеличение содержания NO в листьях на 30-31% по сравнению с контролем (рис. 7, б). Более высокий уровень

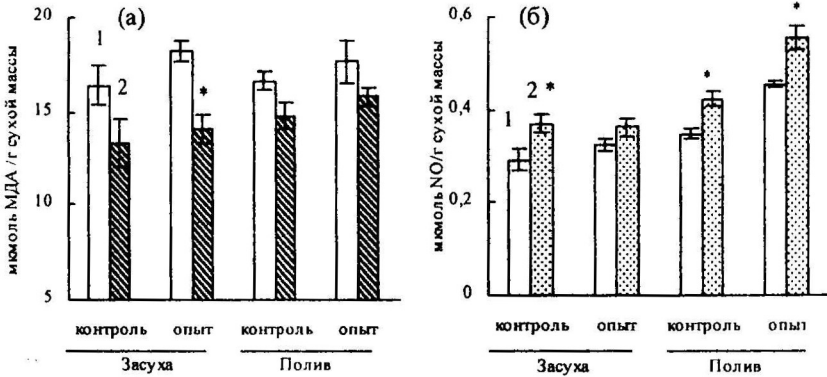


Рис. 7. Содержание МДА и NO в листьях яровой пшеницы при засухе и регидратации (полив). 1 – Омская 33, 2 – Закамская; * – различия между сортами достоверны при $P < 0.05$

NO (на 21-22%) был в растениях с. Закамская как в контрольном, так и в опытном вариантах. Принимая во внимание тот факт, что испытывавшие засуху растения приобретают повышенную устойчивость к её последующему воздействию (Саглам и др., 2008; Kosma et al., 2009), превомерно предположить, что эндогенный NO принимает участие в формировании индуцированной устойчивости растений пшеницы к засухе и водному дефициту.

2.4. Влияние донора NO на физиолого-биохимические реакции листьев пшеницы на обезвоживание. Инфильтрация листьев пшеницы (с. Дебют) донором NO приводила к увеличению их водоудерживающей способности (рис. 8, а). Наибольший эффект оказывали 100 и 250 мкМ SNP, сдерживающие снижение ОСВ после 3 ч завядания на 12 и 17%, соответственно. Данный эффект SNP обусловлен NO-индуцированным закрытием устьиц и снижением транспирации (García-Mata, Lamattina, 2001). Вместе с тем, высокие концентрации донора (500 и 1000 мкМ) не влияли на потерю воды листьями, что могло быть следствием ингибирования закрывания устьиц этими дозами нитропрусида (Neill et al., 2008). Инфильтрация SNP приводила к заметному снижению аккумуляции МДА при последующем обезвоживании. Так, после 3 ч стресса в листьях контрольного

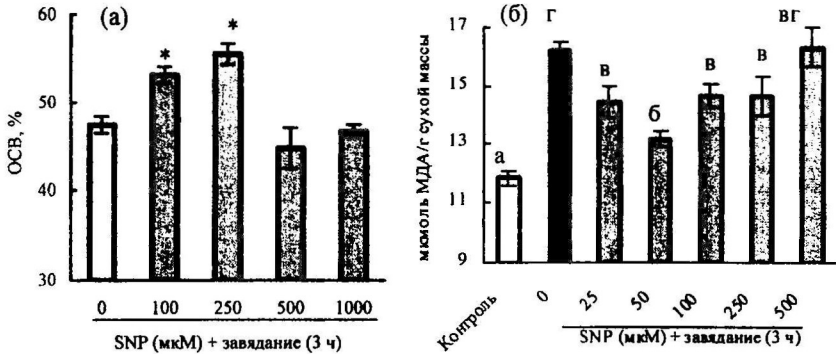


Рис. 8. Влияние SNP на ОСВ (а) и ПОЛ (б) в листьях яровой пшеницы (с. Дебют) после 3 ч завядания; * – различия с контролем (точка “0”) достоверны при $P < 0.05$. Буквы – различия между вариантами достоверны при $P < 0.05$.

варианта (вода) содержание МДА возросло на 37%, а в листьях, инфильтрированных SNP (25-250 мкМ) – на 11-24% (рис. 8, б). Наиболее эффективной была концентрация 50 мкМ. Одной из причин сдерживания ПОЛ могла быть NO-индуцированная активация антиоксидантных ферментов. В ответ на обезвоживание в листьях контрольного варианта происходило снижение активности АПО, а в листьях, обработанных 50-250 мкМ SNP, активность

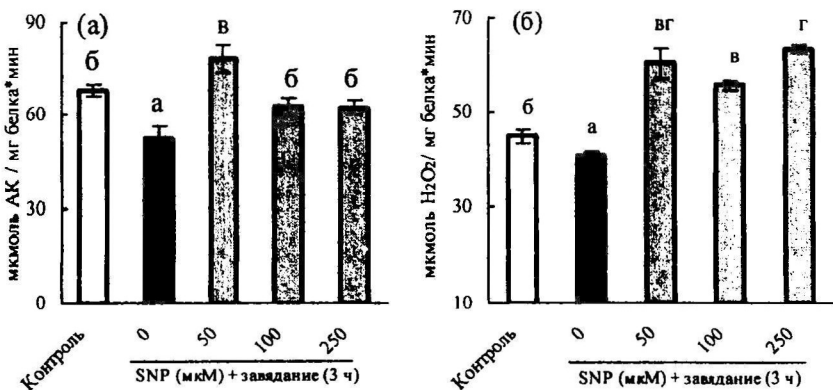


Рис. 9. Влияние донора NO на изменение активности аскорбатпероксидазы (а) и каталазы (б) в листьях пшеницы (с. Дебют) после 3 ч обезвоживания.

фермента возрастала или оставалась неизменной (рис. 9, а). Сходным образом менялась активность каталазы, которая снижалась в ответ на обезвоживание, а при обработке 50, 100 и 250 мкМ SNP возрастала на 35, 25 и 42%, соответственно (рис. 9, б). Полученные данные подтверждают, что антиоксидантный эффект донора NO на листья пшеницы при обезвоживании мог быть следствием усиления активности ферментов антиоксидантной защиты.

2.5. Влияние SNP на содержание NO в листьях пшеницы при обезвоживании. Известно, что эффекты экзогенных доноров NO на растения достигаются путём повышения уровня окиси азота в самих растительных тканях (Zhao et al., 2004; Hu et al., 2005). Увеличение содержания NO в листьях пшеницы происходило после инфильтрации их всеми исследуемыми концентрациями SNP, особенно 250 мкМ (рис. 10, а). Изучение временной динамики NO показало, что в листьях, инфильтрированных водой, незначительный подъём уровня NO происходил через 30 мин и 3 ч завядания. Обработка 50 мкМ SNP достоверно повышала как начальный уровень NO в листьях – в 1.3 раза, так и через 15 и 30 мин обезвоживания – в 2.1 и 1.4 раза. Можно заключить, что донор оксида азота кратковременно увеличивает количество NO в тканях листьев, что сопряжено с запуском защитно-приспособительных механизмов клеток и тканей.

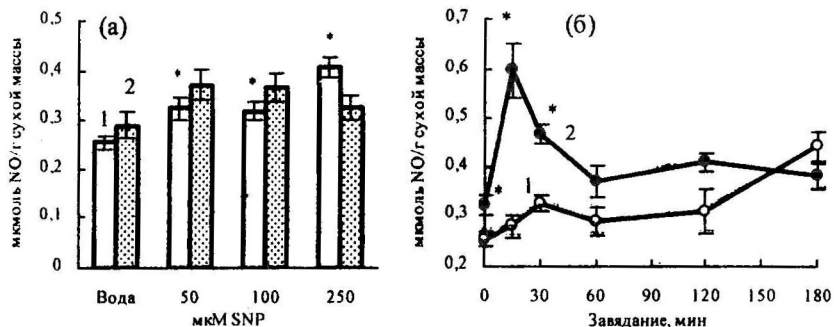


Рис. 10. (а): влияние SNP на содержание NO в листьях пшеницы до и после 1 ч обезвоживания: 1 – до завядания (контроль), 2 – после 1 ч завядания; (б): динамика NO в листьях в ходе обезвоживания: 1 – вода (контроль), 2 – SNP, 50 мкМ; * – различия с контролем (вода) достоверны при $P < 0.05$.

2.6. Эффект бактериальной суспензии *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, как потенциального источника NO, на развитие окислительного стресса и активность антиоксидантных ферментов в листьях при обезвоживании.

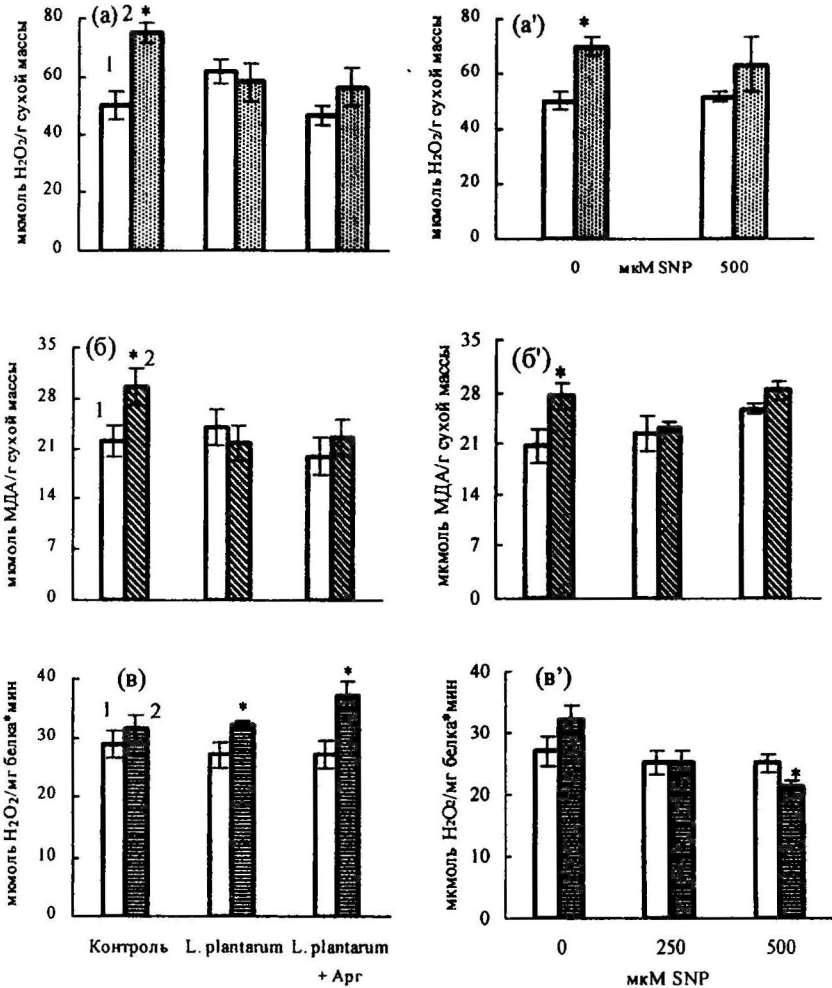


Рис. 11. Эффект *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (а-в) и SNP (а'-в') уровень H₂O₂ (а, а'), МДА (б, б') и активность КАТ (в, в') в листьях пшеницы: 1 – без стресса (контроль); 2 – обезвоживание, 3 ч; * – различия с контролем (без стресса) достоверны при P<0.05.

Предварительная обработка проростков пшеницы суспензией *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, а также 250 и 500 мкМ SNP приводили к снижению накопления H_2O_2 и МДА в листьях при их последующем обезвоживании (рис. 11, а, а', б, б'). При этом активность каталазы под действием бактерий, выращенных с добавлением L-аргинина и без него, возрастала на 18 и 37%, соответственно, а при действии SNP она оставалась неизменной (рис. 11, в, в'). Полученные данные позволяют заключить, что обработка проростков пшеницы суспензией лактобацилл оказывала защитное действие на растения в условиях последующего водного стресса, что по ряду показателей (H_2O_2 и МДА) было сходно с действием химического донора NO. Однако для выяснения вклада NO бактериального происхождения в защитный эффект *L. plantarum* на растения необходимы дополнительные исследования с применением ингибиторов NO-сигнальной системы.

ВЫВОДЫ

1. Обезвоживание листьев яровой пшеницы сопровождается накоплением H_2O_2 и МДА, фазным изменением активности АПО и КАТ, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.
2. Впервые показано, что в ходе нарастающего обезвоживания и последующей регидратации в листьях пшеницы происходит быстрое и кратковременное накопление эндогенного оксида азота (NO). Это указывает на активацию NO-сигнальной системы в ответ на изменение водного статуса тканей листа.
3. Более быстрая потеря воды листьями среднезасухоустойчивого сорта пшеницы Омская 33 в сравнении с листьями сорта Закамская при завядании соответствует более раннему подъёму уровня NO в них, что может отражать различия в метаболической чувствительности растений разных сортов к действию водного стресса.
4. Растения яровой пшеницы в период восстановления водоснабжения после действия почвенной засухи характеризуются повышенным содержанием NO в листьях.
5. Экзогенный донор NO – нитропруссид натрия (SNP) – в микромолярных концентрациях (50-250 мкМ) снижает потерю воды, накопление МДА и усиливает

активность аскорбатпероксидазы и каталазы в листьях пшеницы при обезвоживании, что сопряжено с непродолжительным повышением содержания оксида азота и указывает на его защитное значение.

6. Впервые показано, что обработка проростков яровой пшеницы суспензионной культурой молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 – продуцентов NO – сдерживает накопление H_2O_2 , развитие ПОЛ и повышает активность каталазы в листьях при последующем водном стрессе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, включённых ВАК МОН РФ в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий»

1. **Бояршинов, А.В.** Цитоскелет-зависимые эффекты нитропруссиды натрия на активность аскорбатпероксидазы и содержание H_2O_2 в корнях пшеницы /А.В. Бояршинов, Е.В. Асафова, Ю.Е. Картунова // Учёные записки Казанского государственного университета. – 2008. – Т.150. – С.91-100.
2. **Бояршинов, А.В.** Физиолого-биохимические реакции растений яровой пшеницы на засуху и обезвоживание /А.В. Бояршинов, Е.В. Асафова, З.С. Боброва // Вестник КГАУ. – 2009. – Т. 14, № 4. – С. 135-138.
3. **Бояршинов, А.В.** Окислительный стресс и образование оксида азота (NO) в листьях яровой пшеницы при обезвоживании / А.В. Бояршинов, Ю.Е. Картунова, Е.В. Асафова // Учёные записки Казанского государственного университета. – 2010. – Т.152, кн.2. – С.78-86.

Публикации в сборниках и материалах всероссийских и международных конференций

1. **Бояршинов, А.В.** Изменение содержания воды и уровня H_2O_2 в листьях яровой пшеницы при завядании / А.В. Бояршинов, Е.В. Асафова // Физиология растений: становление, развитие, перспективы. – Казань: Изд-во КГУ, 2007 – С.141-145 .
2. **Бояршинов, А.В.** Физиолого-биохимические ответы листьев трёх сортов яровой пшеницы на обезвоживание / А.В. Бояршинов, Ю.Е. Картунова, З.С.

Боброва // Биология: традиции и инновации в XXI веке. – Казань: Изд-во КГУ, 2008. – С.23-26.

3. Картунова, Ю.Е. Продукция пероксида водорода в растениях пшеницы в условиях стресса / Ю.Е. Картунова, **А.В. Бояршинов**, Е.В. Асафова // Биология: традиции и инновации в XXI веке. – Казань: Изд-во Казанск. Гос. Ун-та, 2008. – С.55-57.

4. **Бояршинов, А.В.** Окислительный стресс и продукция оксида азота в листьях яровой пшеницы при обезвоживании / А.В. Бояршинов, Ю.Е. Картунова, З.С. Боброва, Е.В. Асафова // Актуальные проблемы сельскохозяйственной науки и практики в современных условиях и пути их решения: материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных, посвящённой памяти Р.Г. Гареева, Казань, 26-27 февр., 2009. – Казань: Фолиантъ, 2009. – С.178-181.

5. **Бояршинов, А.В.** Участие NO в стрессовых ответах листьев яровой пшеницы на обезвоживание / А.В. Бояршинов, Ю.Е. Картунова, З.С. Боброва, Е.В. Асафова // Симбиоз Россия 2009: материалы II Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов (25-29 мая 2009 г., Пермь) – Пермь, 2009 – С.92-94.

6. Картунова, Ю.Е. Окислительный стресс в растениях яровой пшеницы: значение *Lactobacillus plantarum* / Ю.Е. Картунова, **А.В. Бояршинов**, О.А. Смоленцева, К.Р. Мамедзаде, Д.Р. Яруллина, Е.В. Асафова // Симбиоз Россия 2009: материалы II Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов (25-29 мая 2009 г.) – Пермь, 2009 – С.32-34.

7. Асафова, Е.В. Влияние абиогенного и биогенного NO на развитие окислительного стресса в растениях пшеницы / Е.В. Асафова, Ю.Е. Картунова, **А.В. Бояршинов** // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: Материалы Всероссийской научной конференции, 24-28 августа 2009 г. – Иркутск. – С.33-36.



**Отпечатано с готового оригинал-макета
в типографии Казанского университета
Тираж 100 экз. Заказ 81/11**

**420008, ул. Профессора Нужина, 1/37
тел.: (843) 233-73-59, 292-65-60**

10-