

УДК 581.19:57.045

С. М. ПАВЛЮЧКОВА, Е. А. СПИВАК, И. В. ВЕРШИЛОВСКАЯ, Е. Л. НЕДВЕДЬ, Е. В. ШКРАБА

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ
КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM*) ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ СТРЕССЕ**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: ibce@ibp.org.by

(Поступила в редакцию 12.12.2013)

Введение. Картофелеводство является одной из приоритетных областей сельскохозяйственного производства в Республике Беларусь. Однако неблагоприятные факторы окружающей среды, в частности, низкотемпературный стресс, значительно снижают продуктивность картофеля. Известно, что низкие положительные температуры (2–10 °С) замедляют рост и развитие растений картофеля, а отрицательные температуры (ниже –1 °С) приводят к гибели всходов, отмиранию ботвы, препятствуют формированию корней и клубней, что существенно снижает урожайность картофеля [1]. В связи с этим разработка новых технологий повышения холодоустойчивости данной культуры представляет особый интерес. Неотъемлемой частью современной стратегии земледелия является использование регуляторов роста растений, которые не только усиливают их ростовые процессы, но и повышают стрессоустойчивость. Известно, что низкие концентрации 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – естественного метаболита систем синтеза хлорофиллов и гемов – могут оказывать не только стимулирующий эффект на рост и урожайность ряда сельскохозяйственных культур [2], но и повышать защитные свойства растительных организмов за счет снижения интенсивности окислительных процессов в растениях, а также повышения активности антиоксидантных ферментов [3–9].

Цель данной работы – изучение влияния экзогенной АЛК на функционирование антиоксидантной системы растений картофеля при низкотемпературном стрессе.

Материалы и методы исследования. Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Одиссей) выращивали в пластмассовых емкостях в грунте «Восторг» (РБ) под люминесцентными лампами белого света Philips TL-D 36W/765 в режиме 14 ч света (интенсивность 160 мкмоль квантов · м⁻² · с⁻¹) и 10 ч темноты при температуре 25 ± 2 °С и относительной влажности воздуха 50–60 %. 14-дневные растения обрабатывали экзогенной АЛК (Sigma, Германия) в концентрации 1 мг/л путем нанесения кисточкой на листья из расчета 2 мл раствора на 1 растение и продолжали выращивать в течение 1 сут, после чего подвергали действию низкой температуры (–4 ± 1 °С) в холодильной камере в течение 1 ч. Оптимальная концентрация АЛК и интенсивность низкотемпературного стресса (температура и продолжительность ее воздействия на растения) были подобраны экспериментально [10]. Для анализа использовали 3–4-й лист растений картофеля. Контролем служили растения, обработанные дистиллированной H₂O путем нанесения кисточкой на листья из расчета 2 мл воды на 1 растение и не подвергавшиеся действию низкой температуры.

Содержание восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона измеряли по методу, описанному в работе [11].

Содержание общего и восстановленного аскорбата, пероксида водорода, а также активность аскорбатпероксидазы (АПП) определяли согласно методам, изложенным в работе [12].

Количественное определение фенольных соединений проводили по методике [13], адаптированной для растений картофеля.

Содержание антоцианов в листьях растений картофеля определяли по методу, описанному в работе [13]. Навеску растительного материала 0,05 г гомогенизировали в 1%-ной HCl. К экстракту добавляли 1 мл хлороформа, центрифугировали 10 мин при 3000 g и температуре +4 °C. Затем измеряли оптическую плотность супернатанта при 525 нм на спектрофотометре Solar PB 2201. Для расчета использовали коэффициент молярной экстинкции 31,6 М⁻¹ · см⁻¹ [13].

Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли регистрируя кинетику потребления НАДФН. Подготовку проб и получение супернатанта осуществляли так же, как и для определения активности АПР [12]. Для расчета активности ГР использовали коэффициент молярной экстинкции 6,2 мМ⁻¹ · см⁻¹ [14].

Для определения общей активности фенольной пероксидазы (ФПР) 0,25 г свежих листьев картофеля растирали в охлажденной (+4 °C) фарфоровой ступке в 1 мл среды выделения (0,1 М К₂Na-фосфатного буфера pH 7,8, содержащего 0,1 мМ ЭДТА и 0,5 % Тритона X-100, а также гваякол из расчета 2 мкл на 50 мл среды). Гомогенат переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 18000 g при +4 °C, используя центрифугу с охлаждением Sigma 1-15 K. Для определения активности ФПР супернатант разбавляли в 10 раз. В кварцевую кювету последовательно наливали 3 мл 0,1 М К₂Na-фосфатного буфера pH 7,0 и 10 мкл супернатанта. Реакцию запускали добавлением 10 мкл 0,3%-ного H₂O₂ и регистрировали кинетику потребления гваякола в течение 10 мин при 420 нм на спектрофотометре Solar PB 2201. Для расчета активности ФПР использовали коэффициент молярной экстинкции 25,5 мМ⁻¹ · см⁻¹ [15].

Активность ферментов рассчитывали в нмоль · мкг белка⁻¹ · ч⁻¹. Белок в супернатанте определяли по методу Bradford [16].

В статье представлены результаты трех опытов, проведенных в 3-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2007.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было показано [10], что обработка растений картофеля экзогенной АЛК в концентрации 1 мг/л способствует поддержанию тургора листьев в период охлаждения (-4 °C, 1 ч) по сравнению с потерей тургора листьев необработанных растений. Растения, подвергнутые обработке АЛК, характеризовались и более низким количеством продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), более низкой проницаемостью мембран, а также повышенным содержанием пролина, хлорофиллов и каротиноидов по сравнению с контролем [10]. Известно, что один из механизмов повышения устойчивости растений под действием АЛК в стрессовых условиях реализуется на уровне функционирования антиоксидантной системы [3–9]. Однако характер изменения антиоксидантного потенциала обработанных АЛК растений определяется видом растения, концентрацией АЛК, а также способом и продолжительностью обработки [3–6]. Для выявления механизмов, обуславливающих интактность обработанных АЛК растений картофеля в условиях низких температур, мы попытались сопоставить активности антиоксидантных ферментов, содержание основных антиоксидантов с накоплением пероксида водорода и продуктов ПОЛ [10] в данных растениях.

На первом этапе работы изучали влияние экзогенной АЛК на накопление активных форм кислорода в растениях картофеля, в частности, на содержание в них H₂O₂ как в нормальных условиях выращивания, так и при действии низкой температуры. Установлено, что в нормальных условиях выращивания обработка листьев картофеля АЛК в концентрации 1 мг/л приводит к увеличению в них содержания пероксида водорода на 34 % по сравнению с контролем (рис. 1). При низкотемпературном стрессе уровень пероксида водорода увеличивался как в необработанных АЛК растениях, так и в рас-

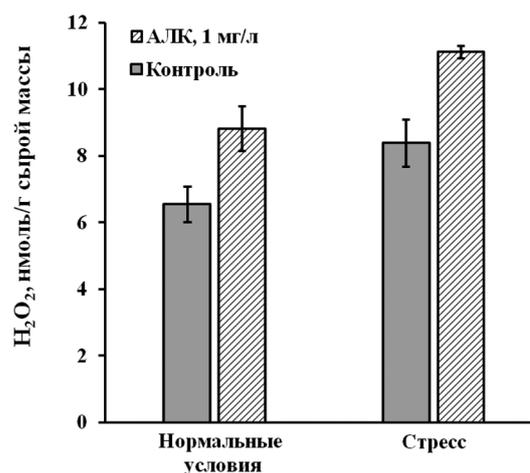


Рис. 1. Содержание пероксида водорода в контрольных (контроль) и обработанных экзогенной АЛК (1 мг/л) растениях картофеля в нормальных условиях выращивания (+25 °C) и при стрессе (-4 °C, 1 ч)

тениях, подвергнутых обработке АЛК (на 13 и 26 % соответственно по сравнению с исходным уровнем). Накопление H_2O_2 под действием экзогенной АЛК в концентрациях 1,8–10 мг/л было ранее зафиксировано в листьях гинкго билоба [17] и шпината [9]. Авторы отмечают, что механизм увеличения уровня H_2O_2 пока не известен. Причиной может служить повышение скорости фотосинтеза под действием АЛК [17]. Не исключено, что повышенное образование H_2O_2 в растениях, обработанных АЛК, также может быть связано с фотодинамическим эффектом, в результате чего образуется супероксидный анион-радикал, детоксикация которого осуществляется супероксиддисмутазой с образованием пероксида водорода. Согласно современным представлениям, H_2O_2 также является важным участником передачи сигнала температурного стресса и может обеспечивать запуск защитных реакций растительной клетки в ответ на стресс [18]. В частности, имеются данные о том, что пероксид водорода индуцирует экспрессию генов белков холодового шока в условиях пониженных температур, а также экспрессию генов ряда антиоксидантных ферментов [19]. В работах, посвященных изучению холодоустойчивости растений, отмечается, что индуктором повышения активности ферментативной системы антиоксидантной защиты при пониженных температурах может быть именно пероксид водорода. Так, в плодах баклажана наблюдается синхронизация увеличения активности каталазы, АПР, ГР и экспрессии их генов с накоплением H_2O_2 при 10-суточном воздействии температурой +10 °С [20]. Повышение содержания пероксида водорода под действием АЛК при одновременном возрастании активности антиоксидантных ферментов отмечалось и в работах [7, 9].

Для дальнейшего изучения влияния АЛК на холодоустойчивость в растениях картофеля была исследована активность антиоксидантных ферментов, принимающих участие в детоксикации пероксида водорода – АПР, ФПР и ГР. Результаты экспериментов показали, что обработка листьев картофеля АЛК не приводила (в пределах погрешности измерений) к изменению активности ГР и АПР в нормальных условиях выращивания, но при этом наблюдалась активация ФПР (таблица). В условиях действия низкой температуры (–4 °С, 1 ч) было зафиксировано повышение общей активности АПР как в растениях, обработанных АЛК, так и в контрольных растениях (на 26 и 68 % соответственно по сравнению с исходным уровнем), причем активность данного фермента в образцах, подвергнутых обработке АЛК, была выше, чем в необработанных образцах (таблица).

Активность антиоксидантных ферментов в 3–4-м листе необработанных (контроль) и обработанных АЛК растений картофеля

Вариант	Ферменты		
	ФПР, мм/мкг белка·ч	АПР, нмоль/мкг белка·ч	ГР, нмоль/мкг белка·ч
Нормальные условия выращивания			
Контроль	20,7±1,8	219±15	10,0±0,8
АЛК, 1 мг/л	29,8±1,7	193±25	10,0±0,7
Низкотемпературный стресс (–4 °С, 1 ч)			
Контроль	24,7±2,3	277±36	6,4±0,5
АЛК, 1 мг/л	24,7±1,0	325±13	9,5±0,9

При низкотемпературном стрессе в вариантах без экзогенной АЛК наблюдали снижение активности ГР на 36 % по сравнению с исходным уровнем. Напротив, в растениях, обработанных АЛК, активность ГР практически не изменялась (таблица). При этом общая активность ФПР в необработанных АЛК растениях увеличивалась на 20 % по сравнению с исходным уровнем, а в обработанных АЛК – снижалась на 17 % (таблица). Из литературных данных известно, что АЛК в низких концентрациях (5–25 мкМ) вызывает рост активности антиоксидантных ферментов как в нормальных условиях выращивания [7], так и под действием стрессов – засухи [8], засоления [2, 9], низких температур [6]. В наших экспериментах при низкотемпературном стрессе в обработанных АЛК растениях картофеля наблюдали активацию только АПР, что может быть связано с повышенным содержанием H_2O_2 в данных растениях.

Низкомолекулярные компоненты антиоксидантной системы, такие как аскорбат, глутатион и фенольные соединения, играют важную роль в защите растительной клетки от избыточного накопления АФК. На рис. 2 представлены результаты по изменению содержания аскорбата и глутатиона в растениях картофеля, обработанных АЛК, в нормальных условиях выращивания и под действием низкой температуры. В образцах без экзогенной АЛК в условиях стресса содержание общего и восстановленного аскорбата практически не изменялось, в то время как в растениях, обработанных АЛК, общее содержание аскорбата, а также содержание его восстановленной формы снижалось (на 34 и 18 % соответственно) по сравнению с исходным уровнем (рис. 2, а). Как уже отмечалось, растения, обработанные АЛК, в условиях стресса обладали повышенной активностью АПР (таблица). При этом они характеризовались меньшей степенью повреждения компонентов клеточных мембран и меньшим уровнем продуктов ПОЛ по сравнению с контролем [10]. Кроме того, в растениях, обработанных АЛК, при низкотемпературном стрессе было зафиксировано повышенное содержание глутатиона (рис. 2, б). Снижение количества аскорбата при низкотемпературном стрессе на фоне возрастания содержания глутатиона в растениях картофеля, подвергнутых обработке АЛК, указывает на интенсивное потребление аскорбата при активации защитных механизмов в растительной клетке данных растений в условиях стресса. В качестве показателя устойчивости растений к абиотическому стрессу часто используют соотношение GSH/GSSG [21]. В наших экспериментах низкотемпературный стресс приводил к возрастанию соотношения GSH/GSSG на 50 % в обработанных АЛК растениях и к снижению на 64 % в необработанных растениях. Высокое соотношение GSH/GSSG в обработанных АЛК растениях картофеля при низкотемпературном стрессе поддерживается ГР, которая катализирует НАДФН-зависимое восстановление окисленной формы глутатиона GSSG до его сульфгидрильной формы GSH [22]. Так, при действии низких температур ГР в обработанных АЛК растениях сохраняет свою активность, в то время как в контрольных растениях ее активность снижается на 36 % по сравнению с исходным уровнем (таблица).

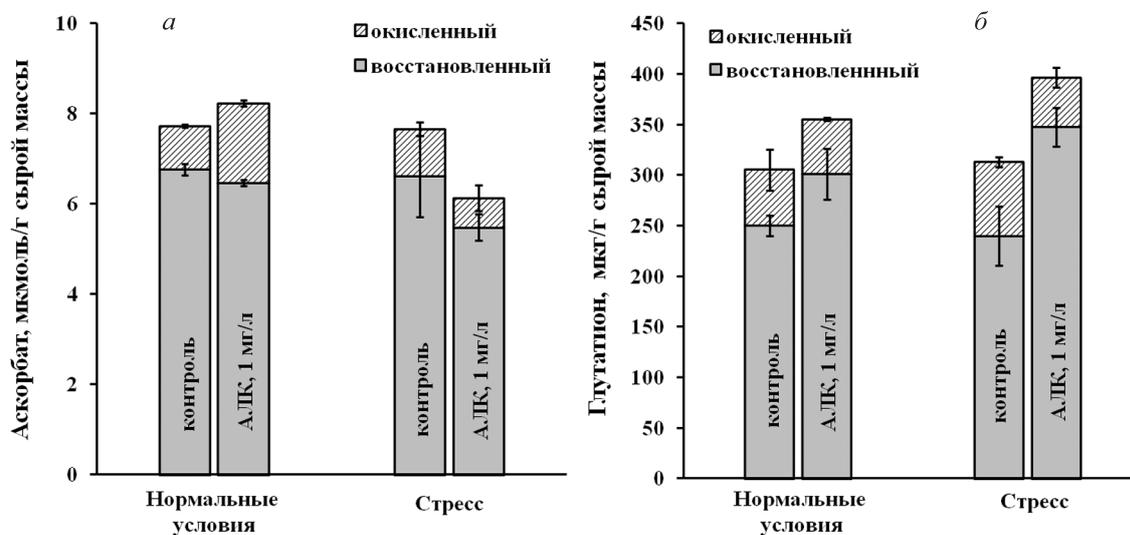


Рис. 2. Содержание аскорбата (а) и глутатиона (б) в контрольных (контроль) и обработанных экзогенной АЛК (1 мг/л) растениях картофеля в нормальных условиях выращивания (+25 °С) и при стрессе (-4 °С, 1 ч)

В работах [23] и [24] было показано, что в листьях растений гинко билоба и плодах яблок, обработанных АЛК в концентрациях 10 и 100 мг/л, значительно возрастает общий уровень фенолов. Авторы отмечают, что существенную долю в увеличении содержания фенольных соединений под воздействием АЛК вносят антоцианы [23, 24]. Обработка растений картофеля АЛК приводила к повышению в них общего уровня водорастворимых фенолов (на 50 % по сравнению с контролем) (рис. 3, а). В обработанных АЛК растениях картофеля в нормальных условиях выращивания наблюдали и тенденцию к накоплению антоцианов (рис. 3, б). Низкотемпературный

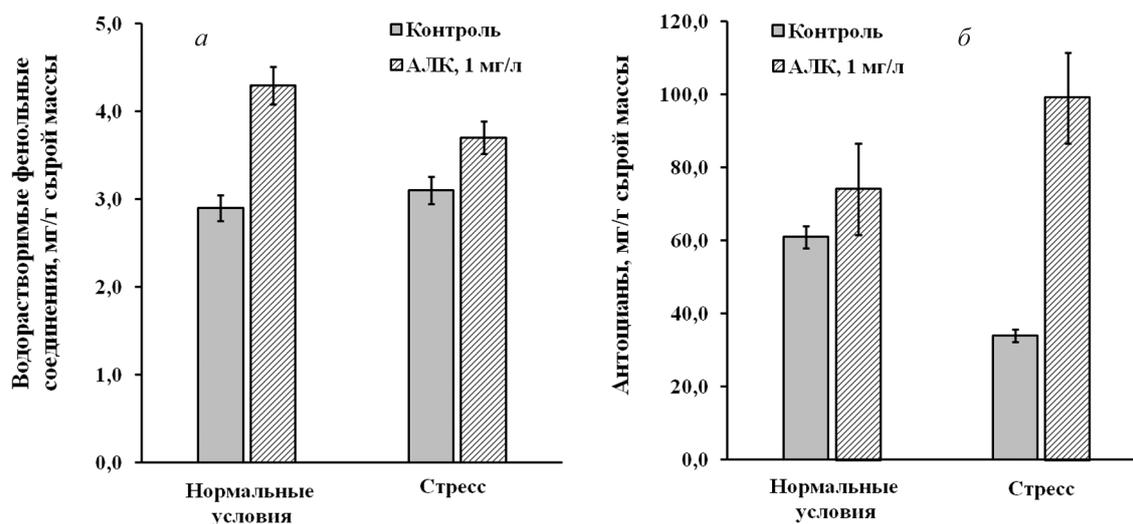


Рис. 3. Содержание водорастворимых фенолов (а) и антоцианов (б) в контрольных (контроль) и обработанных экзогенной АЛК (1 мг/л) растениях картофеля в нормальных условиях выращивания (+25 °С) и при стрессе (–4 °С, 1 ч)

стресс в контрольных растениях не приводил к изменению содержания водорастворимых фенольных соединений и снижал количество антоцианов в 2 раза по сравнению с исходным уровнем. В обработанных АЛК вариантах количество водорастворимых фенолов при стрессе несколько понижалось по сравнению с исходным уровнем, но было выше, чем в образцах без экзогенной АЛК на 20 %. Накопление фенольных соединений под действием низкой температуры в растениях, обработанных АЛК, может быть обусловлено снижением активности ФПР (таблица). Растения, подвергнутые обработке АЛК, в условиях стресса характеризовались также высоким уровнем антоцианов, превышающим данный показатель в необработанных растениях более чем в 3 раза (рис. 3, б). Таким образом, обработка растений картофеля экзогенной АЛК приводит к изменению фенольного метаболизма, сопровождаемого накоплением водорастворимых фенолов и антоцианов, что также способствует увеличению устойчивости растений к действию низкой температуры.

Закключение. Установлено, что растения картофеля, обработанные АЛК (1 мг/л), в нормальных условиях выращивания обладают более высоким антиоксидантным потенциалом по сравнению с контролем за счет более высокого содержания глутатиона, водорастворимых фенолов и антоцианов. При низкотемпературном стрессе (–4 °С, 1 ч) в обработанных АЛК растениях происходит активация АПР, ГР, возрастание пулов глутатиона, водорастворимых фенолов и антоцианов, значительно превышающих данные показатели в необработанных АЛК растениях, что согласуется с полученными нами ранее данными о более низком уровне продуктов ПОЛ и низкой проницаемости мембран в растениях, обработанных АЛК, при низкотемпературном стрессе. Таким образом, полученные результаты показывают, что обработка растений картофеля экзогенной АЛК способствует повышению их устойчивости к действию низких температур.

Литература

1. Давыденко О. В. // Вестн. БГУ Сер. 2. Химия. Биология. География. 2010. №3. С. 56–62.
2. Яронская Е. Б., Аверина Н. Г., Кисель М. А. // Тр. БГУ. 2012. Т. 7. Ч. 1. С. 127–134.
3. Wang L. J., Jiang W. B., Huang B. J. // *Physiol. Plant.* 2004. Vol. 121. P. 258–264.
4. Hotta Y., Tanaka T., Luo B. // *Journal of Pesticide Science.* 1998. Vol. 23, Issue 1. P. 29–33.
5. Balestrasse K. B., Tomaro M., Batlle A., Noriega N. O. // *Phytochemistry.* 2010. Vol. 71. P. 2038–2045.
6. Korkmaz A., Korkmaz Y. // *Scientia Horticulturae.* 2009. Vol. 11. P. 998–102.
7. Shen M., Zhang Z. P., Wang L. J. // *Artificial Photosynthesis.* 2012. Vol. 11. P. 240–256.
8. Li D.-M., Zhang J., Sun W.-J. et al. // *Scientia Horticulturae.* 2011. Vol. 130. Issue 4. P. 820–828.
9. Nishihara E., Kondo K., Parvez M. et al. // *J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 160. P. 1085–1091.
10. Стивак Е. А., Недведь Е. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. №4. С. 71–77.

11. Шалыго Н. В., Щербаков Р. А., Доманская И. Н., Радюк М. С. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2007. Т. 39, №3. С. 264–270.
12. Павлючкова С. М., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2012. №2. С. 91–95.
13. Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. М., 1974.
14. Aono M. // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 645–648.
15. Mika A., Lüthje S. // Plant Physiology. 2003. Vol. 132. P. 1489–1498.
16. Bradford M. // Analit. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
17. Feng Xu, Jie Chang, Shui Yuan Cheng et al. // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8(16). P. 3769–3776.
18. Suzuki N., Mittler R. // Physiol. Plant. 2006. Vol. 126. P. 45–51.
19. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2009. Т. 41, №2. С. 95–108.
20. Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е. // Вісник Харківського Національного аграрного університету. Сер. біологія. 2009. Вип. 1, №16. С. 19–38.
21. Van Heerden P. D. R., Kruger G. H. J. // Journal of Plant Physiology. 2002. Vol. 159. P. 1077–1086.
22. Шалыго Н. В. Биосинтез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях. Мн., 2004.
23. Xie L., Wang Z. H., Cheng X. H. et al. // Plant Growth Regulation. 2013. Vol. 69. Issue. 3. P. 295–303.
24. Xu F., Cheng S., Zhu J. et al. // Notulae Botanica Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. Vol. 39 (1). P. 41–47.

S. M. PAULIUCHKOVA, E. A. SPIVAK, I. V. VERSHILOVSKAYA, E. L. NEDVED, E. V. SHKRABA

THE EFFECTS OF EXOGENOUS 5-AMINOLEVULINIC ACID ON THE OPERATION OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN POTATO PLANTS (*SOLANUM TUBEROSUM*) UNDER LOW TEMPERATURE STRESS

Summary

It was shown that potato plants treated with ALA (1 mg / L) under normal growth conditions have higher antioxidant capacity compared with control plants due to higher content of glutathione, water-soluble phenols and anthocyanins. Under low temperature stress (-4 ± 1 °C, for 1 h) in ALA treated plants APX, GH are activated, glutathione pools, water-soluble phenols and anthocyanins are increased, significantly exceeding these values in ALA untreated plants, that is consistent with our previous results that showed lower level of lipid peroxidation products and the low membrane permeability in ALA treated plants under stress. Thus, the results indicated that application of exogenous ALA improves potato tolerance to low temperature.