

ИНДУКЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА КАРБОНАТНЫМ ЗАСОЛЕНИЕМ В ПРОРОСТКАХ ТРИТИКАЛЕ

Т.Н. Евграшкина, аспирант, В.В. Иванищев, доктор биологических наук,
О.И. Бойкова, кандидат химических наук, Н.Н. Жуков, кандидат биологических наук

Тульский государственный педагогический университет имени
Л.Н. Толстого, 300026, Тула, пр. Ленина, 125
E-mail: TatyanaI9339@gmail.com

Изучено влияние кратковременного солевого стресса, индуцируемого карбонатным засолением, на основные показатели окислительного стресса и активность антиоксидантных ферментов в проростках тритикале озимого. Эксперимент проводили на 7-дневных растениях через 12, 24, 48, 72 и 96 часов экспозиции на 120 мМ растворе карбоната натрия. Определяли содержание малонового диальдегида, пероксида водорода, активность ферментов: каталазы, гваяколовой пероксидазы и аскорбатпероксидазы. Показано, что карбонатное засоление приводит к значительному изменению всех указанных характеристик. Уже к 12 ч эксперимента отмечено более чем 3-кратное повышение содержания пероксида водорода в побегах тритикале. Кроме того, наблюдали интенсификацию перекисного окисления липидов в побегах в течение первых суток засоления. В корнях выявлено меньшее повышение обоих показателей. В побегах увеличилась активность ферментов аскорбатпероксидазы, гваяколовой пероксидазы, каталазы. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что к специфике действия карбонатного засоления можно отнести более интенсивное накопление пероксида водорода в побегах, чем в корнях, снижение содержания малонового диальдегида в побегах к 48 ч экспозиции.

INDUCTION OF OXIDATIVE STRESS WITH CARBONATE SALINIZATION IN TRITICALE SEEDLINGS

Evgrashkina T.N., Ivanishchev V.V., Boykova O.I., Zhukov N.N.

Lev Tolstoy Tula State Pedagogical University,
300026, Tula, pr. Lenina, 125
E-mail: tatyanaI9339@gmail.com.

The effect of short-term salt stress induced by carbonate salinization on the indicators of oxidative stress, the activity of antioxidant enzymes and the content of some metabolites in winter triticale seedlings was studied. The experiment was carried out on 7-day-old plants after 12, 24, 48, 72 and 96 hours of exposure to 120 mM sodium carbonate solution. The content of malonic dialdehyde, hydrogen peroxide, the activity of enzymes: catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase were determined. It is shown that carbonate salinization causes significant changes in all the above characteristics. Thus, more than threefold increase in the content of hydrogen peroxide was noted in triticale shoots already by 12 o'clock in the experiment. The intensification of lipid peroxidation in the shoots during the first days of salinization was also observed. In the roots it was showed a less significant increase in both indicators. In the shoots, an increase in the activity of the studied enzymes was noted: ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase. The analysis of the results allowed to say that the specificity of carbonate salinization can be attributed to: more intense accumulation of hydrogen peroxide in the shoots than in the roots, a decrease in MDA content in triticale shoots by 48 hours of exposure.

Ключевые слова: тритикале озимое (*xTriticosecale*), карбонатное засоление, пероксид водорода, малоновый диальдегид, ферменты антиоксидантной защиты

Key words: winter triticale (*xTriticosecale*), carbonate salinization, hydrogen peroxide, malonic dialdehyde, antioxidant protection enzymes

Засоленные почвы широко распространены во многих странах мира, причем площади засоленных территорий постепенно увеличиваются [1]. Один из видов засоления почв – карбонатное засоление, которое возникает в условиях аридного климата при близком залегании жестких грунтовых вод [2]. Почвенное засоление карбонатного типа обнаружено в отдельных районах Тульской области. Так, превышение предельно допустимой концентрации карбонат-ионов в почвах Белевского и Суворовского районов связано с поступлением солей вместе с грунтовыми водами, обладающими высоким содержанием известняков [3].

Карбонатное засоление относят к наиболее слабо изученному типу засоления по сравнению с хлоридным и сульфатным. Однако, по мнению ряда авторов [4, 5], карбонат-ион оказывает более пагубное влияние на растения. Это можно объяснить тем, что карбонат-ионы подвержены частичному гидролизу, в результате происходит защелачивание среды, что также отрицательно воздействует на процессы, происходящие в растениях.

Мы изучали тритикале озимое – гибрид ржи и пшеницы как перспективную культуру, которая по ряду таких важных показателей, как биологическая продуктивность, питательная ценность продукта, может превосходить обоих родителей, а по устойчивости к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям и наиболее опасным болезням – пшеницу и не уступает ржи [6]. Особый интерес представляет исследование ответных реакций растений на ранних этапах развития, поскольку этот вопрос еще недостаточно изучен, особенно в условиях карбонатного засоления.

Целью настоящей работы было изучение ряда биохимических показателей стресса у растений тритикале на ранних этапах онтогенеза в условиях стресса, вызванного присутствием в среде избытка карбонат-ионов, для обнаружения специфики действия этого типа засоления.

Методика. Объектом исследования были проростки тритикале озимого (*xTriticosecale*) сорта Трибун. Семена стерилизовали в 2,5%-ном растворе перманганата

калия, промывали проточной и трижды – дистиллированной водой. Растения выращивали на питательной среде Кнопа с добавлением микроэлементов по Холланду при 12-часовом световом дне, температуре воздуха 23/20 °С (день/ночь) и средней влажности 65%. Освещенность составляла 1900 лк. По достижении фазы кущения питательную среду заменяли на аналогичную с добавлением карбоната натрия в концентрации 120 мМ. Пробы отбирали для анализа через 12, 24, 48, 72 и 96 часов экспозиции [7].

Содержание пероксида водорода определяли спектрофотометрическим методом по G.N. Kumar и N.R. Knowles, основанным на образовании комплекса пероксида титана [8]; интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) – методом R.L. Heath и L. Packer по накоплению продукта окисления – малонового диальдегида (МДА) [9]; активность аскорбатпероксидазы – по методу, описанному в работе [10]; активность гваяколовой пероксидазы – спектрофотометрическим методом [11], по скорости окисления пирогаллола; активность каталазы – спектрофотометрически по модифицированному методу [12], основанному на определении скорости разложения пероксида водорода каталазой исследуемого образца.

Эксперименты проведены в четырех биологических повторностях. Результаты экспериментов статистически обработаны с использованием статистических программ. На рисунках представлены средние арифметические значения величин. Парное сравнение показателей в разные периоды экспозиции проведено с использованием критерия *Duncan* ($P < 0.05$). На основании этого на графиках разными буквами обозначены величины, статистически отличающиеся друг от друга.

Результаты и обсуждение. Карбонатное засоление уже к 12 ч эксперимента вызывало более чем 5-кратное увеличение концентрации пероксида водорода в побегах (рис. 1 а). В дальнейшем отмечали постепенное снижение концентрации этой АФК (активной формы кислорода), но даже к концу опыта она была выше начального значения в 2 раза. В корнях к этому времени также увеличивалась концентрация пероксида водорода, хотя и не так значительно – в 1,5 раза. При

дальнейшей экспозиции в корнях сохранялся повышенный уровень содержания пероксида водорода. Сравнение полученных результатов с известными данными о влиянии хлоридного засоления [13] позволяет сделать вывод, что карбонатное засоление в большей степени отражается на содержании пероксида водорода в побегах, где происходит его более интенсивное накопление, чем в корнях. В аналогичных условиях сульфатное засоление, напротив, приводило к более интенсивному накоплению пероксида водорода в корнях [7, 14]. Такие результаты говорят о специфике образования пероксида водорода в условиях засоления среды разного типа.

Концентрация другого маркера окислительного стресса – МДА в побегах возрастала более чем в 2 раза уже в течение первых суток опыта (рис. 1 б). Но в дальнейшем его содержание резко снижалось и оставалось ниже исходных значений до конца эксперимента. В корнях в течение 3 суток наблюдали 2-кратное повышение концентрации МДА, а при дальнейшей экспозиции его концентрация снижалась практически до исходных значений. Схожие результаты для карбонатного и гидрокарбонатного засоления получены и другими авторами [15, 16]. Эти данные сопоставимы с результатами, полученными в условиях NaCl-засоления [17]. Но в отличие от сульфатного засоления [7] при карбонатном уровне МДА снижался уже к 48 ч экспозиции, в то время как при действии сульфат-ионов еще сохранялось повышенное содержание ПОЛ. Таким образом, можно говорить о сходстве накопления МДА при обоих типах засоления.

Активность различных ферментов, которые используют пероксид водорода в качестве субстрата реакции, напрямую влияет на содержание пероксида водорода. К таким ферментам относят: гваяколовую пероксидазу, каталазу, аскорбатпероксидазу, изменение которых определяли в ходе исследования. В условиях карбонатного засоления пик активности аскорбатпероксидазы в побегах приходился на первые сутки эксперимента (рис. 2 а). Активность фермента возрастала более чем в 1,5 раза, после чего резко снижалась к 48 ч, а в дальнейшем вновь увеличивалась и оставалась близкой к исходным значениям. В корнях максимальное значение

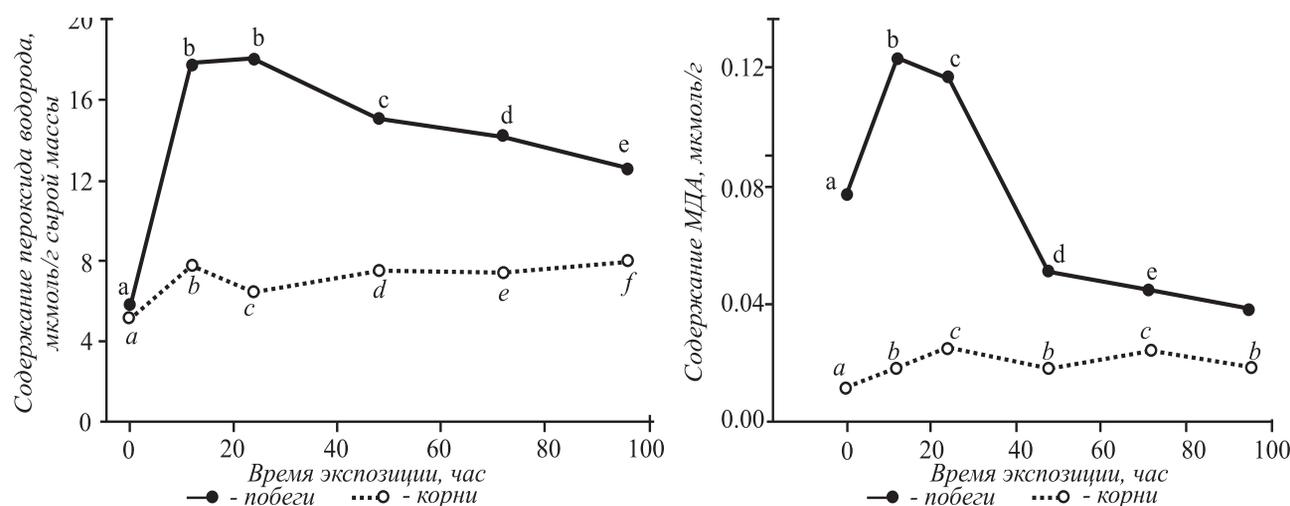


Рис. 1. Динамика накопления пероксида водорода (а) и МДА (б) в побегах и корнях тритикале сорта Трибун в присутствии 120 мМ Na₂CO₃.

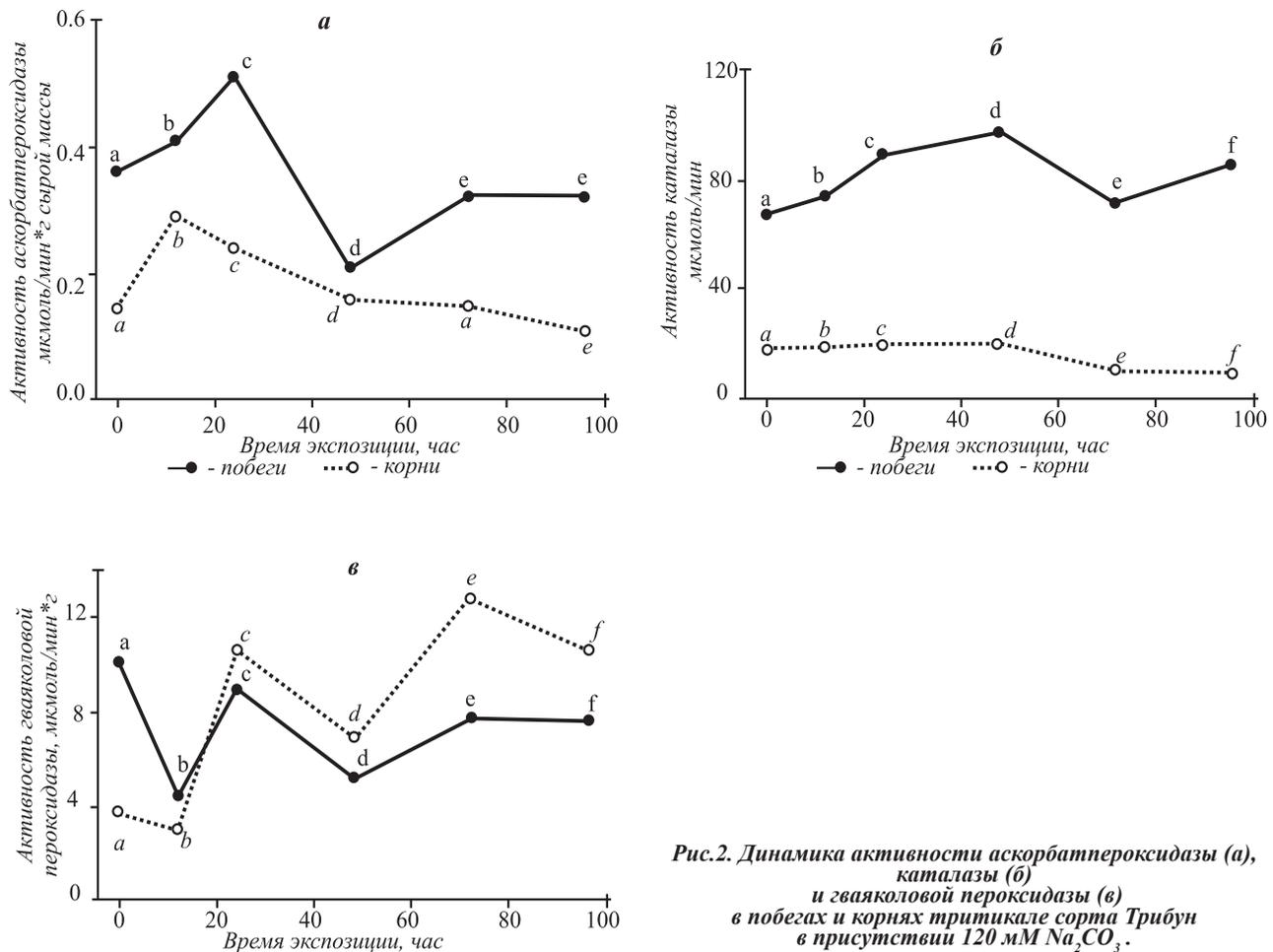


Рис.2. Динамика активности аскорбатпероксидазы (а), каталазы (б) и гваяколовой пероксидазы (в) в побегах и корнях тритикале сорта Трибун в присутствии 120 мМ Na₂CO₃.

активности фермента, в 2 раза превышающее исходное, достигалось уже к 12 ч опыта. Такая же динамика активности аскорбатпероксидазы в побегах тритикале отмечена и другими авторами в условиях хлоридного засоления [18], а также при избыточной концентрации сульфат-ионов [7], но максимальная активность проявлялась раньше – уже через 12 ч эксперимента. Некоторые исследователи наблюдали угнетение активности этого фермента, но при более длительном – 30-дневном воздействии засоления [19].

Изменение активности каталазы в побегах оказалось сходным с изменением активности аскорбатпероксидазы (рис. 2 б), но с пиком активности при более позднем времени экспозиции проростков в условиях засоления. Активность фермента повышалась в течение первых двух суток примерно в 1,5 раза, с последующим снижением практически до исходной величины, но при 96-часовой экспозиции наблюдали новый рост активности каталазы в побегах. В корнях активность фермента незначительно увеличивалась к 48 ч экспозиции, после чего она снижалась ниже начальных значений (рис. 2 б). Аналогично с NaCl-стрессом при действии карбонат-ионов пик активности каталазы приходился на 48 ч [17]. В условиях сульфатного засоления максимальная активность каталазы была при более короткой экспозиции – 12 ч [7]. Повышение активности каталазы также описано для растений *Morus alba* L. при стрессе, вызванном использованием гидрокарбоната натрия [15].

Активность гваяколовой пероксидазы в условиях карбонатного засоления изменялась более резко и непредсказуемо (рис 2 в). В побегах в течение первых суток эксперимента сначала она значительно снижалась, затем повышалась, хотя оставалась ниже исходных величин. Данные отличаются от известных результатов для хлоридного и сульфатного засоления [18, 20]. Так, при натрий-хлоридном стрессе у проростков тритикале наблюдали иную картину, а именно: активность фермента снижалась и в побегах, и в корнях уже к 12 ч [18], что, возможно, связано со стрессом, вызванным карбонатным засолением.

Таким образом, к специфике действия карбонатного засоления можно отнести более интенсивное накопление пероксида водорода в побегах, чем в корнях; снижение содержания МДА в побегах тритикале к 48 ч экспозиции; более раннее проявление максимальной активности аскорбатпероксидазы (через 12 ч) и более поздний пик активности каталазы (к 48 ч); значительное изменение активности гваякопероксидазы и в корнях, и в побегах.

Литература

1. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник. – М.: Дрофа. – 2010. – 638 с.
2. Лопатовская О. Г. Мелиорация почв. Засоленные почвы: учеб. пособие. в побегах тритикале. в побегах тритикале. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. университета, 2010. – 101 с.

3. Кудреватых И.Ю., Пильгуй Л.С. Геохимические свойства черноземов в районе завода по производству азотных удобрений, Тульская область // Известия Самарского научного центра РАН. – 2016. – №2.1 – С.119-122.
4. Biea Z., Ito T., Shinoharaba Y. Effects of sodium sulfate and sodium bicarbonate on the growth, gas exchange and mineral composition of lettuce *Acta Horti* // *Scientia Horticulturae*. – 2003. – 99(3/4) – P.215-224.
5. Patil N.S., Karadge B.A. Effect of carbonates on seed germination and seedling growth in *Portulaca oleracea* L. // *Adv. Sci. Res.* – 2014. – 5(1). – P.5-7.
6. Ружов Ю.Л. Тритикале – первая зерновая культура, созданная человеком. – М.: Колос, – 1977. – 300 с.
7. Евграшкина Т.Н., Иванищев В.В., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Проявления окислительного стресса в проростках тритикале в условиях сульфатного засоления // *Бутлеровские сообщения*. – 2018. – №4. – С.128-133.
8. Kumar G.N., Knowles N.R. Changes in Lipid Peroxidation and Lipolytic and Free-Radical Scavenging Enzyme during Aging and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seed-Tubers // *Plant Physiol.* – 1993. – V.102. – P.115
9. Health, R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – V.125. – P.189–198.
10. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // *Физиология растений*. – 2011. – Т.58. – №6. – С.875-882.
11. Hishida M., Ascencio Valle F., Fujiyama H., Orduño-Cruz A., Endo T., Larrinaga-Mayoral J.A. Antioxidant enzyme responses to salinity stress of *Jatropha curcas* and *J. cinerea* at seedling stage // *Физиология растений*. – 2014. – Т.61. – №1. – С.59-68.
12. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // *Clinica Chimica Acta*. – 1991. – V.196. – P.143-152.
13. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Пантюхин Ю.О., Иванищев В.В. Особенности NaCl-индуцированного окислительного стресса и динамики активности антиоксидантных ферментов в органах тритикале озимого // *Доклады Россельхозакадемии*. – 2012. – № 2. – С. 9-11.
14. Keshavkant S., Padhan J., Parkhey S., Naithani S.C. Physiological and Antioxidant Responses of Germinating *Cicer arietinum* Seeds to Salt Stress // *Физиология растений*. – 2012. – Т.59 – №2. – С. 232–237.
15. Ahmad P., Ozturk M., Sharma S., Gucel S. Effect of sodium carbonate-induced salinity-alkalinity on some key osmoprotectants, protein profile, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in two mulberry (*Morus alba* L.) cultivars // *Journal of Plant Interactions*. – 2014. – V.9. – №1. – P.460–467.
16. Patil N.S., Apradh V.T., Karadge B.A. Effects of alkali stress on seed germination and seedlings growth of *Vigna aconitifolia* (Jacq.) // *Article in pharmacognosy journal*. – 2013. – P.125-127.
17. Иванищев В.В., Жуков Н.Н. Проявления окислительного стресса в проростках тритикале при кратковременном действии хлорида натрия // *Бутлеровские сообщения*. – 2017. – Т.52. – №11. – С. 123-130.
18. Жуков Н.Н., Гарифзянов А.Р., Иванищев В.В. Динамика активности антиоксидантных ферментов в органах *Triticosecale* на фоне NaCl-засоления // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. – 2012. – Вып. 2. – С. 285-291;
19. Tarchoune I., Sgherri C., Izzo R., Lachaal M., Ouerghi Z., Navari-Izzo F. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2010 – №48 – С.13-15
20. Wang H., Xiao X., Yang M., Gao Z., Zang J. Effects of salt stress on antioxidant defense system in the root of *Kandelia candel* // *Botanical studies*. 2014. – V.55. – P.57.

Поступила в редакцию 15.05.19
 После доработки 28.06.19
 Принята к публикации 10.07.19