

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ПРОРОСТКОВ ГОРОХА В ПЕРИОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

И.П. Генерозова, П.А. Буцанец, А.Г. Шугаев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, igenerozova@mail.ru

Аннотация. Исследовали влияние отдельного и совместного похолодания и обезвоживания на содержание МДА в тканях и дыхательную активность митохондрий эпикотилей этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L. Содержание МДА превышало контрольные значения в условиях засухи, после холода и совместного стресса оно возрастало в период восстановления проростков в контрольных условиях. Снижение V_{alt} на вторые сутки восстановления проростков коррелировало с возрастанием МДА во всех вариантах

Ключевые слова: этиолированные проростки гороха, пониженная температура, обезвоживание, окислительный стресс, дыхательный метаболизм митохондрий

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-221-225

Различные типы абиотических стрессов вызывают ответную защитную реакцию растений на уровне митохондрий (МХ). Этот ответ состоит в поддержании, как их метаболической активности, так и неизменного баланса активных форм кислорода (АФК), которые неизбежно появляются в стрессовых условиях, при этом сами комплексы электрон-транспортной цепи МХ являются источниками АФК [Belt et al., 2017]. Процесс преодоления окислительного стресса часто вызывает активирование альтернативных оксидоредуктаз, таких как альтернативная CN -резистентная оксидаза (АО) и ротенон-нечувствительные NADH-дегидрогеназы. Получено множество данных в пользу предположения, что в условиях стресса одной из главных функций АО и других альтернативных путей разобщенного электронного транспорта становится поддержание транспорта электронов при подавлении стрессовыми условиями цитохромного пути и предотвращение избыточной генерации АФК [Vanlerberghe, 2013].

Закономерности влияния на растения не одного неблагоприятного фактора (НФ), а их комбинации, включающей два, а порой и три фактора, привлекают все большее внимание. Обычно авторы исследуют действие такого сочетания факторов, которое часто встречается в природе и приводит к понижению защитных сил организма, например сочетание жары и засухи [Zandalinas et al., 2018]. Между тем, как показали Rizcky et al. [2006], сочетание НФ является новым стрессовым воздействием, и предположение о том, что при этом может не понижаться, а даже повышаться сопротивляемость организма по сравнению с действием отдельно взятых факторов, кажется вполне оправданным. Примером тому могут служить данные о позитивном влиянии на растения сочетания, например, повышенного содержания CO_2 и озона [Zandalinas et al., 2018]. В настоящей работе исследовали действие пониженной температуры и обезвоживания, предположив, что пониженная температура может снизить неблагоприятное воздействие обезвоживания, в частности, потому, что испарение воды в этом случае понижается. Надо отметить, что данная комбинация НФ часто встречается в природе, например, при нередких похолоданиях весной после малоснежной зимы. Насколько нам известно, действие такой комбинации НФ на растения ранее не изучалось.

Целью настоящей работы было исследование генерации АФК, а именно, перекисного окисления липидов мембран, выявляемое с помощью МДА, в условиях

адаптивного изменения активности путей окисления субстратов МХ после 1-суточного совместного и раздельного действия обезвоживания и пониженной температуры и последующего восстановления проростков в контрольных условиях.

Двухдневные этиолированные проростки гороха *Pisum sativum* L. сорта Флора-2, выращенные при температуре 24 °С, переносили на 1 сутки на сухую фильтровальную бумагу, либо помещали на температуру 15 °С, либо применяли оба воздействия одновременно. Контрольные проростки оставались в стандартных условиях. Через сутки растения всех вариантов помещали в контрольные условия. МХ выделяли из эпикотилей и исследовали по методу, описанному ранее [Генерозова и др., 2009]. Поглощение кислорода измеряли амперометрически на полярографе LP-7 (Чехия). Добавку малата (10 мМ) и сукцината (10 мМ) сопровождали внесением глутамата (10 мМ) для устранения оксалоацетата. Максимальную активность АО (V_{alt}) определяли по чувствительности дыхания МХ к 2 мМ СГК в присутствии 1 мМ цианида. МДА определяли по [Hodges et al., 1999].

Результаты показали, что в условиях воздействий НФ изменялся дыхательный метаболизм МХ – снижалась активность окисления малата и сукцината (данные не приводятся), а также изменялось соотношение активности различных путей транспорта электронов – возрастала активность альтернативного цианид-резистентного пути и снижалась активность цитохромного пути транспорта электронов (рис. 1).

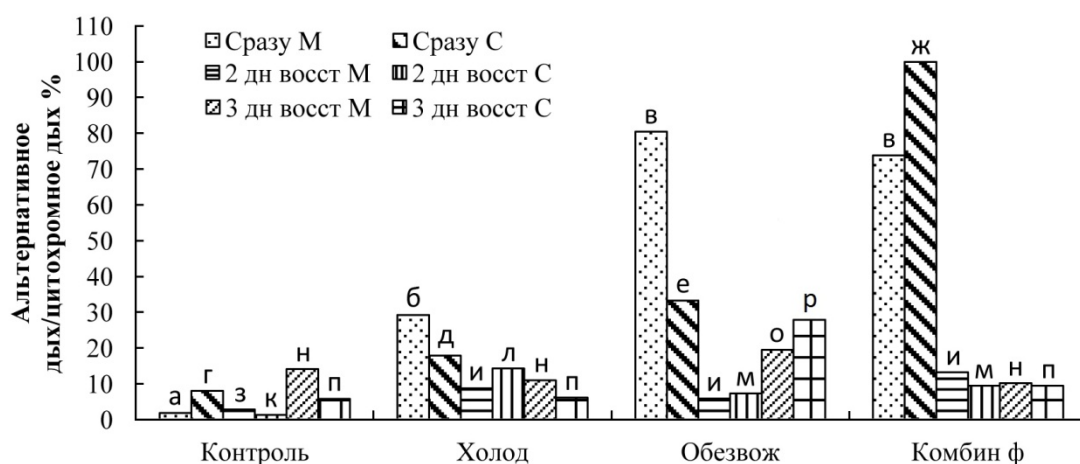


Рис. 1. Соотношение альтернативного/цитохромного путей в контроле и после 1 - суточного воздействия похолодания (Холод), обезвоживания (Обезвож) и совместного действия НФ (Комбин ф) на 2 дневные проростки: сразу после воздействия, (М - малат, С - сукцинат), после 2-х и 3-х дней восстановления в контрольных условиях. Разные буквы в пределах одного субстрата при разных воздействиях означают достоверное различие при $p < 0.05$.

После двухсуточного восстановления проростков в контрольных условиях активность окисления субстратов возросла, но она не достигала контрольных значений. При этом возрастала активность цитохромного пути на фоне снижения активности альтернативного цианид-резистентного пути окисления субстратов (рис. 1). Наиболее значительно возросла скорость окисления сукцината. Целью дальнейших экспериментов было выяснить, когда восстановится окисление малата. Ранее были представлены убедительные доказательства ключевой роли окисления НАД-зависимых субстратов, особенно малата, в процессах роста растений и восстановления метаболизма после действия НФ [Fromm et al., 2016], а также в предотвращении изменений в дыхательной цепи, связанных с процессом старения [Priault et al., 2007].

Мы показали, что после трехсуточного восстановления проростков скорость окисления малата значительно возрастала в варианте «комбинированный фактор», причем одновременно возрастала скорость роста проростков (данные не приводятся). Соотношение V_{alt}/V_{cyt} не изменялось (рис. 1).

Под влиянием неблагоприятных факторов возрастала генерация активных форм кислорода в тканях эпикотилей. Характерной особенностью этого показателя в данных условиях было то, что содержание МДА было выше контрольных значений только сразу после засухи. В условиях похолодания и совместного действия НФ содержание МДА возросло на 2-й день восстановления проростков от стрессовых условий (рис. 2). На 3-й день содержание МДА было повышено только после похолодания. Повышение содержания МДА в период восстановления растений пшеницы после окончания засухи описала Simova-Stoilova et al. [2008], причем, по мнению авторов, снижение антиоксидантной защиты на уровне мембран сочеталось с укреплением антиоксидантной защиты на уровне цитоплазмы. Также в ряде исследований показано, что реводнение может индуцировать дополнительный окислительный стресс [Mittler, Zilinskas, 1994; Flexas et al., 2006; Wang, Vanlerberghe, 2013]. Авторы пришли к заключению, что многие антиоксиданты перестают работать по окончании стресса. Именно снижение активности компонентов антиоксидантной защиты в этот период является ключевым фактором, способным усложнить процесс восстановления растений после реводнения.

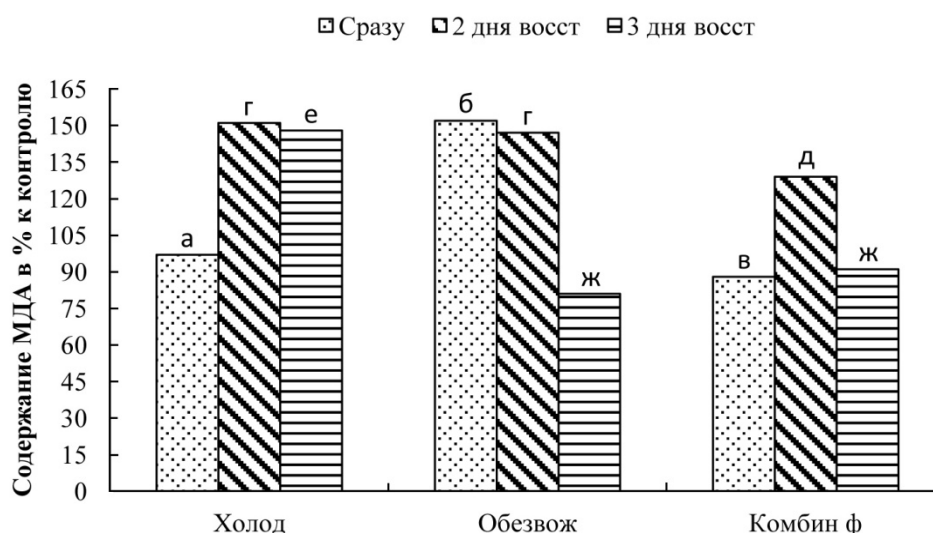


Рис. 2. Содержание МДА (в процентах к контролю) после 1 - суточного воздействия похолодания (Холод), обезвоживания (Обезвож) и совместного действия НФ (Комбин ф) на 2 дневные проростки: сразу после воздействия, после 2-х и 3-х дней восстановления в контрольных условиях. Разные буквы в пределах одного субстрата при разных воздействиях означают достоверное различие при $p < 0.05$.

В нашей работе модуляции в активности альтернативного и цитохромного путей окисления субстратов в период восстановления проростков после стрессовых воздействий в значительной степени отражают, по нашим представлениям, состояние антиоксидантной системы на уровне мембран. Так, снижение мощности V_{alt} на вторые сутки восстановления могло означать снижение антиоксидантной защиты на уровне мембран, что коррелировало с возрастанием уровня МДА в тканях проростков во всех вариантах. В дальнейшем в варианте «комбинированный НФ» содержание МДА по отношению к контролю падало, а скорость окисления субстратов, как и рост проростков, возрастали, что может происходить на фоне повышения антиоксидантной защиты на клеточном уровне (данные не приводятся).

Полученные нами результаты показали, что 1) избыточное образование АФК и увеличение уровня ПОЛ не всегда тормозится с прекращением неблагоприятного воздействия, оно может активизироваться в ходе восстановления проростков и сочетаться со снижением соотношения V_{alt}/V_{cyt} в дыхательной цепи МХ; 2) совместное влияние на растения двух разных по силе воздействия НФ (засухи и умеренного охлаждения) оказывает менее выраженное повреждающее действие, чем действие одного наиболее сильного повреждающего фактора, т.е. засухи, что наиболее отчетливо проявлялось в период восстановления растений.

Литература

Генерозова И.П., Маевская С.Н., Шугаев А.Г. Ингибирование метаболической активности митохондрий в этиолированных проростках гороха, подвергнутых водному стрессу // Физиология растений, – 2009. – Т. 56. – С. 45–52.

Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H. Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase // Plant Physiol. – 2017. – V. 173. – P. 2029–2040.

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbo M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress // Physiol. Plant. – 2006 – V. 127. – P. 343–352.

Fromm S., Senkler J., Eubel H., Peterhänsel H., Braun H.-P. Life without complex I: proteome analyses of an Arabidopsis mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex // J. Exp. Bot. – 2016. – V. 67. – P. 3079–3093.

Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // Planta – 1999 – V. 207. – P. 604–611.

Mittler R., Zilinskas B.A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought // Plant Journal. – 1994. – V. 5, No. 3. – P. 397–405.

Priault P., Vidal G., De Paepe R., Ribas-Carbo M. Leaf age-related changes in respiratory pathways are dependent on complex I activity in *Nicotiana sylvestris* // Physiologia Plantarum. – 2007. – V. 129. – P. 152–162.

Rizhsky L., Liang H., Shuman J, Shulaev V., Davletova S., Mittler R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress // Plant Physiology. – 2004. – V. 134. – P. 1683–1696.

Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T., Tsenov N., Feller U. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage // Plant Soil Environ. – 2008 – V. 54. – P. 529–536.

Vanlerberghe, G.C.: Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14, No. 4. – P. 6805–6847.

Wang J., Vanlerberghe G.C. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress // Physiologia Plantarum. – 2013. – V. 149. – P. 461–473.

Zandalinas S.I., Mittler R., Balfagyn D., Arbona V., Gymez-Cadenas A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures // Physiologia Plantarum. – 2018. – V. 162. – P. 2–12.

OXIDATIVE STRESS AT PEAS SEEDLINGS DURING RESTORATION AFTER ADVERSE FACTORS

Generozova I.P., Butsanets P.A., Shugaev A.G.

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
igenerozova@mail.ru

Abstract. The impact of the individual and combined action of dehydration and moderate chilling on the content of tissues MDA and respiratory activity of mitochondria isolated from epicotyls of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings was investigated. MDA content exceeded control values in a drought, after cold and a joint stress MDA content increased during restoration of seedlings in control conditions. Decrease in V_{alt} on second day of seedling restoration correlated with increase MDA in all options.

Keywords: *etiolated pea seedlings, moderate chilling, dehydration, oxidative stress, respiratory metabolism of mitochondria*