

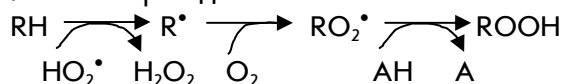
РОЛЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПРОРАСТАНИИ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Ключевые слова: зерновки пшеницы, покой семян, прорастание, проростки пшеницы, антиоксиданты, перекисное окисление липидов.

Введение

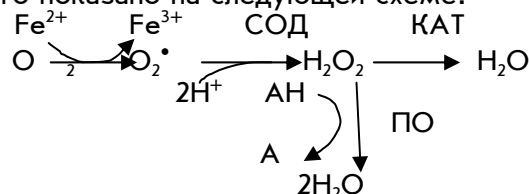
Зерновки злаковых растений при отсутствии воды и низкой температуре находятся в состоянии вынужденного покоя. Однако с возрастанием оводненности в семенах активируются основные метаболические процессы и повышается дыхание до максимального уровня, характеризующие их рост и развитие [1]. Период прорастания зерновок делится на три этапа [2, 3]: 1) этап физического набухания (20-24 ч), когда происходит активация метаболизма и насыщение зерновок водой до 45-50%; 2) этап наклеивания семян, за счет перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша и подготовка их к началу роста растяжением (20-24 ч); 3) этап собственного роста органов проростка (3-7 сут.), в результате которого происходит формирование корней и зеленых семядолей (надземная часть).

Известно, что для нормального прорастания в воздушно-сухих семенах должны присутствовать все компоненты белок синтезирующей системы: рибосомы, тРНК, факторы инициации и элонгации, аминокислоты и аминоксил-тРНК-синтетазы, все ферменты метаболизма, белки теплового шока и их мРНК [4]. Во влажных семенах наблюдается активное потребление кислорода, сопровождаемое возрастанием процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут вызывать окислительное повреждение тканей.

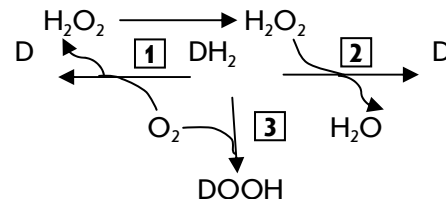


В развитии окислительного стресса играют роль активные формы кислорода (АФК): O_2^\bullet , H_2O_2 , HO^\bullet , HOCl и др. [5]. Накопление АФК в клетках приводит к нарушению протекания процессов транскрипции и репликации, изменяет состав липидов мембран [6]. Активные формы кислорода модифицируют белки, нарушают структуру ДНК, разрушают гормоны и другие функционально активные вещества [7]. Поэтому изучение проявления компенсаторных механизмов в семенах на действие АФК является общебиологической задачей.

В живых организмах существует физиологически нормальный уровень свободно-радикальных процессов и перекисного окисления липидов, необходимый для регулирования липидного состава, проницаемости мембран, и ряда биосинтетических процессов [8, 9]. Контроль за содержанием АФК в семенах осуществляют антиоксиданты (АО). Компонентами антиоксидантной системы живых организмов являются низко- и высокомолекулярные антиоксиданты. В состав низкомолекулярных антиоксидантов входят стероиды, убихиноны, некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, мочевая кислота, глутатион, аскорбат, билирубин, токоферолы и др. К группе высокомолекулярных антиоксидантов относятся ферменты (супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза (ПО), каталаза (КАТ) и др.), а также белки (альбумин, трансферрин, ферритин и т.д.). СОД, каталаза и пероксидаза формируют единый ферментативный комплекс живых организмов, действие которого показано на следующей схеме:



В целом пероксидаза способна катализировать реакции оксидазного (1), пероксидазного (2) и оксигеназного (3) окисления. Субстратами фермента могут быть неорганические и органические соединения, окисляющиеся кислородом и перекисью водорода.



Однако роль фермента в процессах прорастания семян практически не изучена. Набухание и прорастание семян всегда сопровождаются активированием оксидазных процессов. УФ-облучение семян может инициировать возрастание ПОЛ, регулируемое в живых организмах компонентами антиоксидантной системы [10]. Однако взаимодействие их основных метаболитов, принимающих участие в формировании гипобиотических состояний у живых организмов,

обитающих в экстремальных условиях, мало исследовано.

Цель нашей работы состояла в изучении изменений, происходящих в перекисном окислении липидов, содержании антиоксидантов и активности пероксидазы в зерновках и проростках пшеницы на различных этапах прорастания семян.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили на зерновках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Приленская 19, которые замачивали в дистиллированной воде в течение 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 23°C на свету в течение 7 сут., смачивая их дистиллированной водой (10 мл на чашку Петри). Количество семян в одной чашке – 100 шт., повторность опыта 4-кратная.

Для анализа продуктов тиобарбитуровой кислоты 1 г сырой массы семян или проростков семян гомогенизировали в фарфоровой ступке с 3 мл 50%-ного раствора этанола, гомогенат центрифугировали 10 мин. при 7000 г. Содержание малонового диальдегида исследовали по реакции с тиобарбитуровой кислотой при 532 нм, $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [6] с нашими модификациями. К 0,5 мл супернатанта последовательно добавляли 0,5 мл 1%-ного раствора тритона X-100; 0,2 мл 0,6 М HCl и 0,8 мл 0,06 М ТБК. Смесь нагревали на кипящей водяной бане 10 мин. Охлаждение проводили при 15°C 30 мин. Для стабилизации окраски добавляли 0,2 мл 5 мМ трилона Б и 5-10 мл 96%-ного этанола. Контролем служила проба, в которую добавляли те же растворы, кроме ТБК. Содержание МДА в проростках выражали в нмоль/г сухой массы.

Анализ антиоксидантов проводили по методике [11]. К 0,2 мл супернатанта последовательно добавляли 0,2 мл 0,5%-ного о-фенантролина в 96%-ном этаноле и 0,2 мл 0,2%-ного FeCl₃ в 96%-ном этаноле.

Затем объем доводили до 3 мл 96%-ным этанола и выдерживали 10 мин. в темноте. Определение антиоксидантов проводили по калибровочному графику, построенному для кверцетина. Количество антиоксидантов рассчитывали в мг/г сухой массы.

Супернатант для определения активности пероксидазы и других ферментов, получали путем гомогенизирования в фарфоровой ступке навески семян (1 г) или сырой массы проростков в 3 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), а затем гомогенат центрифугировали в течение 10 мин. при 7000 г. Активность пероксидазы выявляли при 22°C по начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода [12]. Для этого к 2,1 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,0) добавляли 0,2 мл раствора супернатанта и 0,1 мл 0,43 мМ раствора о-дианизидина в 96%-ном этаноле. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ перекиси водорода. Увеличение поглощения раствора для продукта окисления о-дианизидина регистрировали после быстрого перемешивания реагентов на спектрофотометре при $\lambda=460 \text{ нм}$ ($\epsilon = 30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [12]. За единицу активности фермента принимали количество о-дианизидина (мкмоль), окисленного за 1 мин. в 1 г сухой массы.

Спектрофотометрические исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S («Varian», США). В работе использовали этанол, очищенный перегонкой, о-дианизидин марки «ч.», очищенный возгонкой в вакууме, перекись водорода (30%-ный водный раствор) и антиоксиданты марки «о.ч.». Статистическую обработку данных проводили по Лакину [13].

Результаты и обсуждение

Изучена динамика содержания МДА, АО и активность пероксидазы в зародыше зерновок пшеницы в процессе их набухания и проклевывания (табл. 1).

Таблица 1

Содержание антиоксидантов, МДА и активность пероксидазы в зародыше со щитком зерновок пшеницы в процессе набухания и проклевывания

Время набухания зерновок, ч	МДА, нмоль/г сухой массы	АО, мкг/г сухой массы	Активность ПО, мкмоль/мин. г сухой массы
Период набухания			
6	30,3±1,9	295,9±18,3	83,5±5,6
12	26,8±1,6	275,9±17,5	104,0±8,9
18	37,4±2,1	336,4±19,8	117,5±7,4
24	29,5±1,8	277,5±17,4	108,5±7,5
Период проклевывания			
30	36,4±2,2	348,2±18,6	120,4±8,2
36	33,2±1,7	343,2±18,0	150,8±9,4
42	28,3±1,6	400,0±24,5	134,7±8,8
48	20,3±1,2	417,9±21,3	182,6±16,2

Из данных таблицы 1 следует, что между компонентами АОС зерновок в течение 24 ч набухания зерновок наблюдается взаимная зависимость, проявляемая в том, что в ответ на возрастание содержания АО отмечается понижение содержания МДА ($r = -0,29$), коррелирующее с повышением активности пероксидазы ($r = 0,82$), тогда как показатели содержания МДА и пероксидазной активности находятся в обратной зависимости ($r = -0,49$). Показатели содержания МДА, АО и активности пероксидазы в течение 48 ч периода набухания и проклевывания зерновок имели выраженную колебательную динамику. При этом уровень ПОЛ понизился в 1,5 раза, содержание АО и активность пероксидазы возросли, соответственно, в 1,4-1,5 и 1,75-2,18 раз (табл. 1).

Возрастание пероксидазной активности свидетельствует о том, что антиоксиданты способны индуцировать синтез фермента, который регулирует на этом этапе прорастания зерновок как содержание перекиси водорода, так и антиоксидантов. Причем установленные зависимости характеризуют специфичность механизмов начальных этапов набухания и проклевывания зерновок пшеницы, обусловленные взаимным влиянием пероксидазы и низкомолекулярных антиоксидантов. По-видимому, в процессе метаболизации антиоксидантов изменяется их концентрация в клетках зерновок, что проявляется в регулировании активности пероксидазы и осуществлении общего контроля над деятельностью АОС. Взаимное влияние низко- и высокомолекулярных антиоксидантов обусловлено особенностью механизма действия пероксидазы, способностью фермента катализировать реакции окисления различных биогенных соединений,

среди которых могут быть различные антиоксиданты.

Низкие величины корреляции компонентов АОС, по-видимому, обусловлены тем, что при исследовании процессов набухания и проклевывания зерновки представляли гетерогенную группу, в которой присутствуют зерна с разной степенью готовности к прорастанию. Причем часть из них могут быть погибшими или слабыми зерновками.

Для того, чтобы это выяснить, мы изучили содержание МДА, АО и пероксидазную активность только у проклюнувшихся зерновок пшеницы (табл. 2), откуда следует, что характер зависимостей между компонентами АОС несколько отличается от предыдущих значений. Так, показатели содержания МДА и АО в проклюнувшихся зерновках приобретают более выраженную обратную коррелятивную зависимость ($r = -0,52$), тогда как повышение активности пероксидазы преимущественно сопровождается повышением уровня ПОЛ ($r = 0,80$). В случае увеличения содержания АО отмечается понижение активности пероксидазы ($r = -0,51$). При этом у проклюнувшихся зерновок уровень ПОЛ и активность пероксидазы возрастали, соответственно, в 1,3-1,6 и 3,9-5,6 раз, тогда как содержание АО понижалось в 1,4-1,7 раза (табл. 2).

Более значительные показатели корреляции между компонентами АОС были выявлены при исследовании корневой и надземной части проростков пшеницы (табл. 3).

Таким образом, что в процессе прорастания содержание антиоксидантов в корнях и зеленых семядолях снижается, соответственно, в 5,4 и 1,7 раз. При этом активность пероксидазы в корнях возрастает в 1,95 раза, а в надземной части – в 1,5 раза.

Таблица 2

Содержание антиоксидантов, МДА и активность пероксидазы в проклюнувшихся зерновках пшеницы (измерения проводились после 24 ч набухания зерновок в дистиллированной воде)

Время проклевывания зерновок, ч	МДА, нмоль/г сухой массы	АО, мкг/г сухой массы	Активность ПО, мкмоль/мин. г сухой массы
0	19±0,8	193±19	3,4±0,12
3	18±0,8	128±13	2,6±0,09
6	21±0,9	213±21	3,9±0,18
12	14±0,6	211±21	4,5±0,22
15	20±1,0	197±19	4,3±0,20
18	14±0,5	197±19	5,3±0,26
21	25±1,2	165±14	10,3±0,54
24	19±0,8	166±15	7,0±0,35
48	29±1,8	135±12	19,2±1,23

Содержание МДА (нмоль/г сухой массы), антиоксидантов (мкг/г сухой массы) и активность пероксидазы (мкмоль/мин. г сухой массы) в корнях и надземной части проростков пшеницы

Время прорастания, сут.	Корни			Надземная часть		
	МДА	АО	ПО	МДА	АО	ПО
2	128±5,6	546±32	140±9	215±16	824±76	38±0,3
3	108±4,8	956±84	130±8	226±18	764±56	32±0,2
4	158±6,8	395±28	160±11	343±26	533±48	56±0,4
5	144±6,1	137±7	165±12	318±21	510±37	63±0,5
6	164±7,8	116±6	180±15	284±24	554±51	68±0,5
7	178±9,7	92±3	200±19	236±20	498±35	74±0,6

Полученные данные свидетельствуют о том, что в корневой системе регулятором уровня ПОЛ преимущественно служит пероксидаза, а надземной части – низкомолекулярные антиоксиданты. Последних в надземной части проростков пшеницы больше, чем в корнях, в 1,5-5,4 раза. Причем в корнях между антиоксидантами, уровнем ПОЛ и активностью пероксидазы наблюдается обратная зависимость ($r = -0,88$ и $r = -0,89$), а между содержанием МДА и активностью пероксидазы – прямая зависимость ($r = 0,95$).

В надземной части проростков пшеницы содержание МДА находится в обратной зависимости от содержания антиоксидантов ($r = -0,69$) и активности пероксидазы ($r = -0,91$). При этом устанавливается корреляция между активностью пероксидазы и уровнем ПОЛ ($r = 0,44$). Эти данные свидетельствуют о том, что в зеленых семядолях процесс ПОЛ регулируется преимущественно за счет антиоксидантов, высокая концентрация которых может регулировать активность пероксидазы.

Заключение

В результате проведенных исследований установлена взаимная зависимость компонентов АОС, регулирующих процессы ПОЛ в клетках растений. Причем активность пероксидазы на этапе набухания и прорастания зерновок находится под контролем низкомолекулярных антиоксидантов, которые могут быть субстратами фермента и поэтому окисляются в оксидазных и пероксидазных реакциях. Взаимная регулируемость системы позволяет контролировать ПОЛ в зерновках пшеницы на начальных этапах прорастания и поддерживать его на определенном уровне. Подтверждением этому служат результаты содержания МДА, АО и активности пероксидазы в надземной части проростков. Высокое содержание в зеленых семядолях АО обуславливает проявление специфичности в корреляции компонентов АОС. Механизм действия АОС растений основан на том, что в реакциях, катализи-

руемых пероксидазой, могут образовываться свободные радикалы, содержание которых можно контролировать по показателям уровня ПОЛ. Низкомолекулярные АО способны регулировать содержание свободных радикалов и влиять на величину пероксидазной активности, являясь субстратами пероксидазы. Кроме того, высокие концентрации АО служат индукторами синтеза пероксидазы. Таким образом, устанавливаются взаимная связь и взаимное влияние компонентов АОС. При этом особая роль отводится пероксидазе, которая на начальных этапах прорастания может выступать в качестве инициатора дыхательной активности митохондрий, которые проявляли минимальную активность в покоящихся зерновках. Кроме того, пероксидаза способна утилизировать избыток кислорода и перекиси водорода в клетках на этапе набухания и проклеивания зерновок путем участия в катализе оксидазных и пероксидазных реакций окисления, субстратами которых могут быть АО. Содержание АО и активность пероксидазы в клетках находятся под взаимным контролем, регулируя ПОЛ в зерновках на разных этапах прорастания.

Библиографический список

1. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.
2. Обручева Н.В., Антипина О.В. Физиология инициации прорастания семян. // Физиол. растений. – 1997. – Т. 44. – № 2. – С. 287-302.
3. Обручева Н.В., Антипова О.В. Общность физиологических механизмов подготовки к прорастанию у семян с различным типом покоя // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 3. – С. 426-431.
4. Гумилевская Н.А., Чуმიкина Л.В., Шатилова В.Р. Синтез белка и РНК в прорастающих семенах // Биохимия. – 1995. – Т. 60. – № 1. – С. 35-45.
5. Половникова М.Г., Воскресенская О.Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у

газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – № 5. – С. 777-785.

6. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

7. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М., Пальмина Н.М., Храпова Н.Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. – М.: Наука, 1975. – 241 с.

8. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран // Биофизика. – 1987. – Т. 32. – № 5. – С. 830-844.

9. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Про-

оксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слова», 2006. – 556 с.

10. Рогожин В.В., Курилюк Т.Т., Филиппова Н.П. Изменение реакции антиоксидантной системы проростков пшеницы после ультрафиолетового облучения семян // Биофизика. – 2000. – Т. 45. – № 4. – С. 730-736.

11. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.

12. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена // Биохимия. – 1977. – Т. 42. – № 8. – С. 1372-1379.

13. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.



УДК 632.981.4

**Ю.И. Захарьева,
А.Л. Верещагин,
В.В. Еремина,
В.В. Овчаренко,
В.Г. Рыбников,
В.В. Теплов**

ПОВЫШЕНИЕ ФИТОТОКСИЧНОСТИ РЯДА ГЕРБИЦИДОВ ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ СО СВЕРХМАЛЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Ключевые слова: сверхмалые концентрации органических кислот (СМК), гербицид, баковая смесь, N-(фосфоно-метил)глицин, лабораторные опыты, микрополевые опыты, полевые испытания, фитотоксичность.

Введение

Глифосат – N-(фосфонометил)глицин – послевсходовый, неселективный гербицид системного действия, используемый для уничтожения однолетних и многолетних сорняков на посевах и посадке многих полевых сельскохозяйственных, плодовых и цитрусовых культур, на виноградниках, в лесном и городском хозяйстве, для уничтожения водных сорняков, а также для десикации листы определенных сельскохозяйственных культур [1]. В РФ глифосат разрешен к применению в качестве гербицида в составе 38 формуляций на 23 сельскохозяйственных культурах и в качестве десиканта в составе 14 формуляций на 7 культурах [2].

Гербициды на основе глифосата широко применяются в посевах генно-модифицированных растений (ГМ). Эти растения могут аккумулировать гербициды, к которым они устойчивы, и вместе с растением человек или животные будут поглощать остаточные количества глифосата и его метаболитов. Имеются данные о негативном воздействии ГМ-культур в виде аллергических реакций и ряда заболеваний [3].

Цель работы – изучение возможности снижения норм внесения формуляций гербицидов на основе глифосата при их совместном использовании с препаратом № 3 на основе сверхмалых концентраций природных органических кислот [4].

В 2010 г. на полях «АКГУП Птицефабрика Смоленская» (Смоленский район, Алтайский край) было проведено исследование по совместному использованию препарата № 3 на основе природных органических кислот (СМК) с концентрацией 10^{-11} М с гербицидом «Триатлон». Опыт был заложен в пер-