ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotex-journal.ru>

СНИЖЕНИЕ СТЕПЕНИ ИНДУЦИРУЕМЫХ ЗАСУХОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДОНОРОМ NO

**Аллагулова Ч.Р., Авальбаев А.М.,
Федорова К.А., Шакирова Ф.М.**

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, г. Уфа, Россия
E-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

Проведен анализ влияния предобработки донором оксида азота нитропруссидом натрия (SNP – sodium nitroprusside) в концентрации 200 мкМ на физиолого-биохимические показатели растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в норме и в условиях засухи, моделируемой присутствием в среде инкубирования проростков 12%-го полиэтиленгликоля (ПЭГ). Предобработка 3-сут проростков пшеницы донором NO оказывала на них рост-стимулирующий эффект в нормальных условиях произрастания, и способствовала поддержанию ростовых процессов при засухе, о чем судили по показателям биомассы и внешнему виду проростков. Данные по снижению стресс-индуцированного накопления малонового диальдегида и выходу электролитов из тканей SNP-предобработанных проростков указывают на снижение в них уровня перекисного окисления липидов и вовлечение NO в защиту мембранных структур, что может быть обусловлено его участием в регуляции антиоксидантной системы (АОС) защиты растений.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., выход электролитов, засуха, малоновый диальдегид, нитропруссид натрия, окислительный стресс, оксид азота

NO-INDUCED REDUCTION OF OXIDATIVE STRESS LEVEL IN WHEAT PLANTS UNDER DROUGHT CONDITIONS

**Allagulova Ch.R., Avalbaev A.M.,
Fedorova K.A., Shakirova F.M.**

Institute of Biochemistry and Genetics
of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, Russia
E-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

An analysis of pretreatment with the sodium nitroprusside (SNP), which is a donor of nitric oxide, of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) subjected to drought was performed. The drought conditions were designed by using of 12% polyethylene glycol (PEG). Pretreatment of the 3-d-old seedlings by 200 μM SNP reduced the negative effect of drought on growth processes as evidenced by data on fresh mass dynamics of seedlings and their visual appearance. Data on the reduction of stress-induced accumulation of malondialdehyde and electrolyte leakage level from seedlings pretreated with SNP indicate a decrease in the lipid peroxidation level and NO involvement to membrane structures protection. These results indicate the NO participation in the regulation of the plant's antioxidant system activity.

Keywords: *Triticum aestivum* L., electrolyte leakage, drought, malondialdehyde, sodium nitroprusside (SNP), oxidative stress, nitric oxide

Поступила в редакцию: 26.04.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-181-186](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-181-186)

ВВЕДЕНИЕ

В связи с глобальными изменениями климата возрастает частота и непредсказуемость возникновения засух. В условиях дефицита влаги вследствие усиления интенсивности транспирации и дыхания, сопровождающееся снижением фотосинтетической и водоудерживающей способности тканей происходит угнетение роста и снижение продуктивности культурных растений [Osakabe et al., 2014]. Эффективным способом повышения урожайности растений и их защиты от неблагоприятных внешних воздействий может стать применение природных регуляторов роста, среди которых все большее внимание исследователей привлекает оксид азота (NO) [Карпец, 2016]. Оксид азота

функционирует в качестве внутриклеточной сигнальной молекулы, вовлекаемой в регуляцию базовых физиологических процессов растений на всех этапах их онтогенеза. Выявлено его участие в регуляции клеточного цикла растений, дифференциации тканей, морфогенеза, прорастания семян, корнеобразования, цветения и созревания плодов. Показано, что оксид азота задействован в трансдукции сигналов, стимулирующих синтез различных фитогормонов, например, этилена, цитокининов и АБК, с чем может быть связана его антистрессовая активность [Карпец, 2016]. Многие исследования подтверждают защитное действие NO на растения в условиях неблагоприятных температур, засоления, засухи, вызывающих, как известно дефицит влаги и водный стресс в растениях [Бояршинов, Асфарова, 2011; Карпец, 2016]. В этих условиях в растениях развивается окислительный стресс, характеризующийся избыточной генерацией активных форм кислорода (АФК), обладающих чрезвычайно высокой реакционной способностью. К основным мишеням АФК принадлежат липиды мембран, подвергающиеся деградации с образованием различных продуктов перекисного окисления, в частности малонового диальдегида (МДА). Основываясь на сведениях об активации антиоксидантных ферментов под влиянием SNP, можно предположить, что протекторное действие NO связано с его способностью запускать антиоксидантную систему (АОС) защиты растений и снижать степень вызываемых засухой окислительных повреждений мембранных структур растительной клетки. С целью изучения эффектов оксида азота на растения в качестве донора эндогенного NO широко применяется нитропруссид натрия (SNP – sodium nitroprusside). Ранее нами было выявлено, что использование SNP в концентрации 200 мкМ способствует повышению устойчивости растений пшеницы к натрий-хлоридному засолению. Данная работа посвящена выявлению защитного эффекта 200 мкМ SNP на интенсивность ростовых процессов и целостность мембранных структур проростков пшеницы, подвергнутых действию засухи, моделируемой с помощью 12%-гополиэтиленгликоля (ПЭГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 4–5 суточные растения пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев. Семена после стерилизации проращивали на светоплощадке в течение 3 суток (16 часовой световой день, 15 клк) при 22–24°C. После отделения эндосперма 3-суточные проростки инкубировали 24 ч в присутствии 200 мкМ SNP. Затем подвергали действию обезвоживания в течение 24 ч, которое моделировали с использованием 12%-го ПЭГ. О росте судили по накоплению сырой массы и внешнему виду проростков (рис. 1). Количественную оценку свободных фитогормонов проводили с помощью метода иммуноферментного анализа. Процедура очистки и извлечения ИУК, АБК и цитокининов, а также последовательность этапов иммуноанализа этих фитогормонов описаны ранее [Масленникова и др., 2017]. Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию в проростках МДА с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 532 нм и 600 нм. Концентрацию МДА рассчитывали, используя коэффициент экстинкции при $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Проницаемость клеточных мембран проростков оценивали по уровню выхода электролитов с использованием кондуктометра ОК 102/1 (Radelkis, Венгрия), измеряя омическое сопротивление водных экстрактов в постоянном токе. На рисунках представлены данные средних арифметических трех-четырех независимых опытов, каждый из которых проведен не менее чем в трех биологических повторах, и стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интегральным показателем степени повреждающего действия стрессовых факторов на растения служат данные об их росте. В связи с этим был проведен анализ ростовых показателей проростков пшеницы, предобработанных SNP в концентрации 200 мкМ в норме и при воздействии моделируемой ПЭГ засухи. Результаты, представленные на рис. 1, четко демонстрируют, что присутствие в среде инкубирования проростков 200 мкМ SNP оказывает стимулирующее действие на их рост, о чем судили по значениям сырой массы и внешнему виду растений. Засуха, моделируемая обработкой проростков ПЭГ в концентрации 12% в течение 24 часов, заметно тормозила накопление сырой массы, что отразилось и на их внешнем виде. Предобработанные SNP и подвергнутые засухе растения характеризовались существенно меньшим уровнем повреждающего действия обезвоживания на показатели роста (рис. 1а, б). Полученные результаты согласуются с полученными нами ранее данными о рост-стимулирующем и протекторном действии оксида азота на рост растений пшеницы [Масленикова и др., 2017].

Рис. 1. Сырая масса (а) и внешний вид (б) 5-сут проростков пшеницы, предобработанных 200 мкМ SNP и подвергнутых воздействию 12%-го ПЭГ.

Проявление стимулирующего и протекторного эффектов оксида азота на рост растений пшеницы можно объяснить его влиянием на состояние гормональной системы, поскольку именно ей отводится ключевая роль в регуляции роста и развития растений. Поэтому важно было исследовать характер влияния обработки SNP на гормональный статус проростков пшеницы в норме и в условиях моделируемой ПЭГ засухи. Выявлено, что 5-часовая обработка 3-сут проростков 200 мкМ SNP в нормальных условиях произрастания на фоне отсутствия существенных изменений в содержании ИУК и некотором повышении уровня АБК вызвала почти 2-кратное увеличение концентрации цитокининов уже к первому часу воздействия SNP, при этом повышенный вдвое уровень содержания цитокининов поддерживался в ходе всего опыта. Засуха вызвала в проростках существенное накопление АБК, снижение содержания ИУК и особенно цитокининов, тогда как SNP-предобработанные и подвергнутые стрессу растения характеризовались снижением уровня стресс-индуцированного накопления АБК, уменьшением падения содержания ИУК, а также и поддержанием концентрации цитокининов на уровне, сопоставимым с контрольными

растениями. Эти данные подтверждают важную роль эндогенных цитокининов в реализации рост-стимулирующего и защитного эффектов SNP в растениях пшеницы.

Известно, что в результате негативного влияния внешних факторов, включая засуху, в растениях развивается окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной генерации АФК, таких как супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($OH^{\cdot}$), перекисные радикалы ($RO_2^{\cdot}$), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), характеризующиеся наличием неспаренных электронов, что обуславливает их нестабильность и чрезвычайно высокую реакционную способность [Колупаев, Кокорев, 2019]. Для своей стабилизации АФК активно захватывают электроны из молекул липидов, белков и нуклеиновых кислот, дестабилизируя макромолекулы и надмолекулярные структуры. Одной из основных мишеней АФК являются остатки ненасыщенных жирных кислот в составе липидов мембран, подвергающиеся свободно-радикальному окислению по месту двойных связей с образованием гидроперекисей и диеновых конъюгатов, которые быстро метаболизируют, превращаясь в альдегиды и диальдегиды. Одним из продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является МДА, способный реагировать с N-концевыми аминокислотами белков или боковыми аминокислотами в составе аминокислот, индуцируя образование шиффовых оснований. В результате такой атаки возникают неспецифические поперечные сшивки внутри одной молекулы белка, либо между молекулой белка и фосфолипидами мембран. Эти конформационные изменения активизируют процессы коагуляции и агрегации белков, индуцируя нарушения активности ферментов, а также деформирование структурных и каналобразующих мембранных белков, вызывая нарушения структурной целостности и проницаемости клеточных мембран, что в конечном итоге приводит к снижению жизнеспособности и функциональной активности клеток [Sharma et al., 2020]. Обезвреживание АФК в растениях обеспечивается антиоксидантной системой (АОС) защиты, включающей антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) и компоненты неферментативной природы (глутатион, аскорбиновая кислота, токоферолы, пролин) [Колупаев, 2016; Колупаев, Кокорев, 2019]. В литературе имеются сведения о способности оксида азота индуцировать АОС защиты растений. Так в листьях кукурузы под влиянием нитропруссид натрия повышалась активность супероксиддисмутазы, цитозольной аскорбатпероксидазы, каталазы и глутатионредуктазы [Zhang et al., 2007]. У растений сои наблюдалось повышение активности каталазы и гваяколпероксидазы при обработке SNP на фоне действия солевого стресса [Simaei et al., 2011]. Показана роль оксида азота в индуцировании синтеза флавоноидов и антоцианов [Oz et al., 2015], обладающих антиоксидантными свойствами и выполняющих разнообразные стресс-протекторные функции в растениях [Колупаев, Ястреб, 2015; Карпец 2016].

Основываясь на сведениях о способности NO усиливать активность АОС в растениях, можно было предположить, что предобработка SNP проростков пшеницы будет способствовать нейтрализации в них стресс-индуцируемой продукции АФК. Это должно найти отражение в снижении уровня повреждающего действия засухи на целостность мембранных структур, о чем можно судить по показателям перекисного окисления липидов, в частности по содержанию МДА, а также по уровню выхода электролитов из тканей. Результаты опытов показали, что присутствие донора NO в среде инкубирования проростков в течение суток не оказывала влияния на содержание в них МДА и выход электролитов из тканей (рис. 2), что неудивительно, поскольку данная обработка не является стрессовой и не вызывает повреждений мембранных структур в растениях пшеницы. Засуха вызвала сильно выраженный повреждающий эффект на мембранные структуры клеток растений пшеницы, о

чем свидетельствуют данные по значительному усилению накопления МДА (рис. 2а) и двукратному увеличению выхода электролитов из тканей проростков (рис. 2б). Вместе с тем предобработанные SNP растения характеризовались существенно меньшим уровнем стресс-индуцированного накопления МДА и экзоосмоса электролитов. Эти данные указывают на то, что протекторное действие оксида азота на растения пшеницы в условиях засухи может обуславливаться его способностью снижать уровень стресс-индуцируемых окислительных повреждений клеточных структур.

Рис. 2. Содержание МДА (а) и выход электролитов (б) в тканях 5-сут проростков пшеницы предобработанных 200 мкМ SNP и подвергнутых воздействию 12%-го ПЭГ.

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить, что SNP в оптимальной в стимуляции роста концентрации (200мкМ) характеризуются ярко выраженным защитным эффектом на растения пшеницы, подвергнутых засухе. Реализация рост-стимулирующего и протекторного эффектов оксида азота на растения пшеницы может быть обусловлена его влиянием на состояние гормональной системы в норме и при засухе. Данные о снижении стресс-индуцированного накопления МДА и выхода электролитов под влиянием предобработки SNP подтверждают предположение, что NO-ассоциированная защита растений может быть связана с его активным участием в функционировании антиоксидантной системы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350029-1) при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-04-00904а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бояршинов А.В., Асафова Е.В. Стрессовые реакции листьев на обезвоживание: участие эндогенного NO и эффект нитропруссид натрия // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 891–897.
2. Карпец Ю.В. Влияние донора NO на содержание пигментов в листьях, рост и продуктивность яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Вестник Харьковского ун-та. 2016. Т. 3 (39). С. 48–56.

3. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А. Функциональное взаимодействие оксида азота и пероксида водорода при формировании индуцированной теплоустойчивости проростков пшеницы // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 72–78. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060090>
4. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Физиологические функции неэнзиматических антиоксидантов растений // Вестник Харьковского ун-та. 2015. Т. 2 (35). С. 84–105.
5. Масленникова, Д. Р., Аллагулова, Ч. Р., Федорова, К. А., и др. Вклад цитокининов в реализацию рост-стимулирующего и протекторного действия оксида азота на растения пшеницы // Физиология растений. 2017. Т. 64 (5). С. 355–362. <https://doi.org/10.1134/S1021443717040094>
6. Burgess P., Huang B. Mechanisms of hormone regulation for drought tolerance in plants. In: Drought stress tolerance in plants. Ed. by Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran L.S. Springer, Cham., 2016. V. 1. P. 45–75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28899-4_3
7. O'Donnell N. H., Moller B. L., Neale A. D., Hamill J. D., Blomstedt C. K., Gleadow R. M. Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 73. P. 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.09.001>
8. Osakabe Y., Osakabe K., Shinozaki K., Tran L.-S.P. Response of plants to water stress // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. 86. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
9. Oz M.T., Eyidogan F., Yuce M., Öktem H.A. Functional role of nitric oxide under abiotic stress conditions. In: Nitric oxide action in abiotic stress responses in plants. Ed. by. M.N. Khan et al. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2015. P. 21–42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17804-2_2
10. Sharma, A., Soares, C., Sousa, B., et al. Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects // Physiologia Plantarum. 2020. V. 168 (2). P. 318–344. <https://doi.org/10.1111/ppl.13004>
11. Simaei M., Khavari-Nejad R.A., Saadatmand S. Bernard F., Fahimi H. Effects of salicylic acid and nitric oxide on antioxidant capacity and proline accumulation in *Glycine max* L. treated with NaCl salinity // Afr. J. Agricult. Res. 2011. V. 6. P. 3775–3782. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.1088>
12. Zhang A., Jiang M., Zhang J., et al. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leave // New Phytol. 2007. V. 175. P. 36–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02071.x>.