

ВНЕСОК БІОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ СТІЙКОСТІ У ПРОЦЕС АДАПТАЦІЇ ПРОРОСТКІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ

Г.М. Левчук

Запорізький національний університет

На проростках двох генотипів льону олійного була досліджена динаміка накопичення проліну та моносахаридів у процесі їх адаптації до абіотичних стресових факторів. Встановлено, що динаміка накопичення цих речовин у генотипів з різним рівнем стійкості неоднакова: у нестійкого генотипу більш активно накопичується пролін і зовсім не накопичуються моносахариди, а у стійкого генотипу накопичуються обидві протекторні речовини - максимум накопичення проліну спостерігається через 6 та 24 години адаптації, а моносахаридів – через 12 та 24 години. Тому нами було запропоновано використовувати вільний пролін та моносахариди у якості маркерів стійкості до абіотичних стресових факторів проростків льону олійного через 24 години адаптації.

Ключові слова: льон олійний, пролін, моносахарид, стійкість, адаптація, абіотичний стресовий фактор.

Вступ. Унікальний набір реакцій рослинних організмів на дію факторів оточуючого середовища, якого вони не можуть уникнути з-за відсутності мобільності, складає основу для включення цих зовнішніх сигналів у здійснення нормальних шляхів їх розвитку та життєдіяльності. Тому виявлення стратегії формування функціональних взаємовідносин рослин з оточуючим середовищем та іншими організмами, яке забезпечує їх ріст, репродукцію та розповсюдження є одним з самих актуальних напрямків сучасної біології рослин [1].

Центральне місце в цьому займають дослідження структурно – функціональних перебудов клітинної організації при зміні абіотичних факторів оточуючого середовища у зв'язку з загальнобіологічною проблемою адаптації рослин до несприятливих зовнішніх умов. При цьому у рослинах проходять значні перебудови метаболізму клітин, які стосуються усіх сторін їх життєдіяльності [2].

При дії абіотичних стресів уповільнюються синтетичні процеси та активізуються процеси розкладу. Тому кількість полімерів знижується, а кількість мономерів (амінокислоти та моносахариди) – збільшується. Вивільнені мономери є осмотично активними речовинами та здатні зв'язувати вільну воду. Суттєве збільшення їх кількості у процесі адаптації є проявом стійкості. Тому такі мономери як амінокислота пролін та розчинні моносахариди відносять до маркерів стійкості до дії абіотичних стресів [3, 4].

Метою роботи було встановлення вкладу біохімічних маркерів на різних стадіях процесу адаптації проростків льону олійного до дії гіпертермії, осмотичного стресу та дії цих стресів одночасно у зв'язку з тим, що у природних умовах рослини льону піддаються дії саме цих стресів.

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом дослідження слугували 8-денні проростки льону олійного сортів Айсберг та Авангард. У наших

попередніх дослідах [8] був встановлений рівень стійкості до різних абіотичних стресових факторів деяких генотипів льону олійного. Стійким до осмотичного стресу та гіпертермії виявився сорт Айсберг, а нестійким – сорт Авангард. Тому у цій роботі ми використовували ці генотипи як модельні об'єкти: сорт Айсберг – як модель стійких генотипів, а сорт Авангард – як модель нестійких.

Насіння льону пророщували на фільтрувальному папері у чашках Петрі в вологій камері у темряві. Контролем у всіх варіантах досліду слугували проростки, що вирощувались на дистильованій воді при кімнатній (22 °С) температурі на протязі 8 діб у темряві.

При моделюванні стресових умов насіння пророщували на дистильованій воді при кімнатній температурі протягом 5 діб, після чого проростки разом з вологою камерою впродовж 6 годин піддавали дії стресу (40 °С при гіпертермії та пророщування на 15 % розчині хлориду натрію – при осмотичному стресі та за дії обох стресових факторів одночасно) та знову вирощували при кімнатній температурі на дистильованій воді протягом 2 діб.

Проби для аналізу відбирали через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 та 48 годин.

Вільні сахара визначали за методом Бертрану [4, 5]. Кількість вільного проліну за методикою Бейтса [6, 7].

Результати досліджень та їхнє обговорення. У нестійкого сорту, скоріше за все, пролін грає суттєву роль в процесі адаптації до досліджених нами стресів, оскільки концентрація вільного проліну значно підвищується у процесі адаптації до цих стресів (табл. 1).

Так, спостерігається три піки підвищення концентрації вільного проліну в процесі адаптації (рис. 1): через 6, 12 та 20 годин адаптації.

Таблиця 1

Накопичення вільного проліну у процесі адаптації проростків льону олійного сорту Авангард до деяких абіотичних стресів, мкг/г (дані за 2005-2010 рр.)

Вид стресу	Тривалість адаптації після стресу (години)									
	2	4	6	8	12	16	20	24	36	48
Контроль	0,56 ± 0,08	0,36 ± 0,05	0,51 ± 0,12	0,2 ± 0,05	0,18 ± 0,08	0,37 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,47 ± 0,03	0,75 ± 0,12	1,42 ± 0,26
Осмотич-ний	0,2 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,53 ± 0,13	0,11 ± 0,01	1,08 ±* 0,21	0,58 ±* 0,12	0,64 ±* 0,14	0,6 ± 0,18	0,87 ± 0,09	1,1 ± 0,16
Гіпертер-мічний	0,19 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,51 ± 0,11	0,47 ±* 0,21	0,48 ± 0,15	0,82 ± 0,17	1,1 ± 0,12
Подвійний	0,49 ± 0,20	0,59 ± 0,18	1,24 ±* 0,36	0,28 ± 0,08	0,76 ±* 0,10	1,02 ±* 0,25	0,71 ±* 0,15	0,79 ±* 0,13	1,37 ±* 0,43	0,56 ± 0,13

Примітка:

* - достовірність різниці між контролем та дослідом при $P > 0,95$

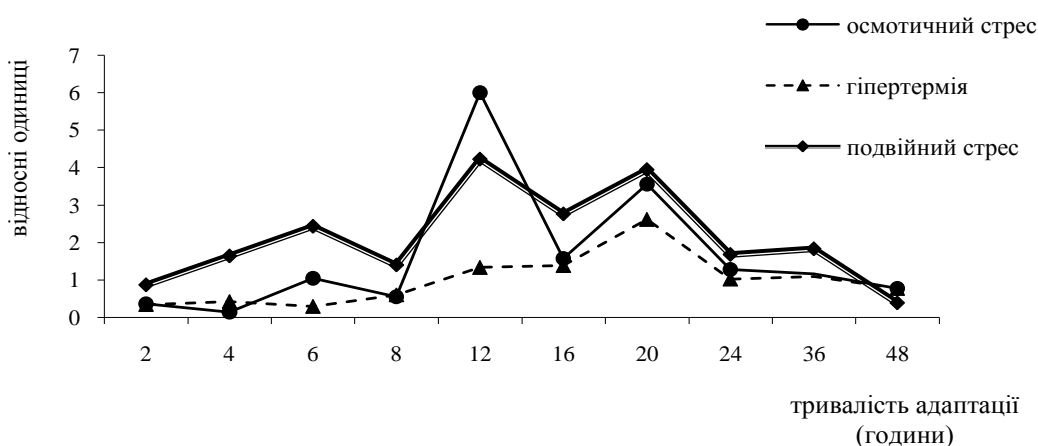


Рис. 1. Динаміка накопичення вільного проліну у процесі адаптації проростків льону олійного сорту Авангард до деяких абіотичних стресів

Однак при дії різних стресів спостерігаються відмінності у часі: при адаптації до посухи через 12 годин концентрація проліну збільшується приблизно у 6 разів, через 20 годин – у 3,5 разів; при адаптації до гіпертермічного стресу – через 20 годин – у 2,6 рази; при адаптації до подвійного стресу – через 6 годин – у 2,5 разів, через 12 годин – у 4,2 рази, через 20 годин – у 4 рази. Достовірність різниці між дослідом та контролем визначали за критерієм Данета [9].

Таким чином, ми бачимо, що у процесі адаптації нестійкого сорту льону олійного накопичення вільного проліну грає істотну роль, причому найбільш вона суттєва у процесі адаптації до посухи (підвищення рівня проліну у 3,5-6 разів).

У стійкого генотипу льону олійного (сорт Айсберг) спостерігається також збільшення рівня вільного проліну у процесі адаптації (табл. 2), однак у порівнянні з нестійким сортом це збільшення є не таким суттєвим.

Динаміка накопичення проліну у стійкого генотипу за дії аналізованих абіотичних стресів також є дещо іншою у порівнянні з нестійким генотипом: пік його максимального накопичення спостерігається на початку адаптації (через 6 годин) та його підвищення складає: у процесі адаптації до посухи приблизно у 1,8 разів, до гіпертермії – у 2,2 рази, до подвійного стресу – в 2,5 рази (рис. 2).

Крім того, спостерігається й інший пік максимального накопичення проліну – через 24 години адаптації, при цьому максимальне накопичення спостерігається за дії окремих стресів – посухи та гіпертермії майже на 50 %.

З літературних джерел [1, 2] відомо, що пролін є найпоширенішою осмопротекторною речовиною рослин за дії стресу, при цьому збільшення його вмісту за умов стресу спостерігається тільки у стійких рослин [1].

На відміну від цього у нашому випадку значно більше підвищення рівню вільного проліну спостерігається у нестійкого сорту, це можна пояснити поступовим розщепленням полімерних сполук, до складу яких входить пролін, при дії стресорних факторів, при цьому вивільняється пролін (з кривих накопичення проліну видно, що максимальне його накопичення приходить на

12-20 годин адаптації, а на другу добу адаптації спадає навіть нижче, ніж було на початку адаптації).

Таблиця 2

Накопичення вільного проліну у процесі адаптації проростків льону олійного сорту Айсберг до деяких абіотичних стресів, мкг/г (дані за 2005-2010 рр.)

Вид стресу	Тривалість адаптації після стресу (години)									
	2	4	6	8	12	16	20	24	36	48
Контроль	1,25 ± 0,42	1,24 ± 0,35	0,73 ± 0,18	1,05 ± 0,28	0,83 ± 0,21	0,88 ± 0,15	0,71 ± 0,11	0,46 ± 0,09	0,37 ± 0,06	0,98 ± 0,17
Осмотичний	1,13 ± 0,26	1,71 ± 0,48	1,30 ± * 0,28	1,64 ± * 0,52	0,91 ± 0,17	0,77 ± 0,16	0,56 ± 0,09	0,63 ± 0,03	0,40 ± 0,07	0,74 ± * 0,35
Гіпертермічний	1,53 ± 0,29	1,34 ± 0,18	1,67 ± * 0,35	1,02 ± 0,22	0,38 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,68 ± 0,08	0,14 ± 0,02	0,21 ± 0,06
Подвійний	1,59 ± 0,22	1,7 ± 0,33	1,88 ± * 0,25	1,51 ± * 0,26	0,34 ± 0,19	0,29 ± 0,06	0,32 ± 0,09	0,44 ± 0,05	0,24 ± 0,04	0,56 ± 0,17

Примітка:

* - достовірність різниці між контролем та дослідом при $P > 0,95$

У стійкого ж сорту максимальне накопичення вільного проліну спостерігається через 6 годин адаптації (рис. 2), однак на відміну від нестійкого сорту Авангард, у сорту Айсберг спостерігається збільшення вмісту вільного проліну також через 24 години адаптації.

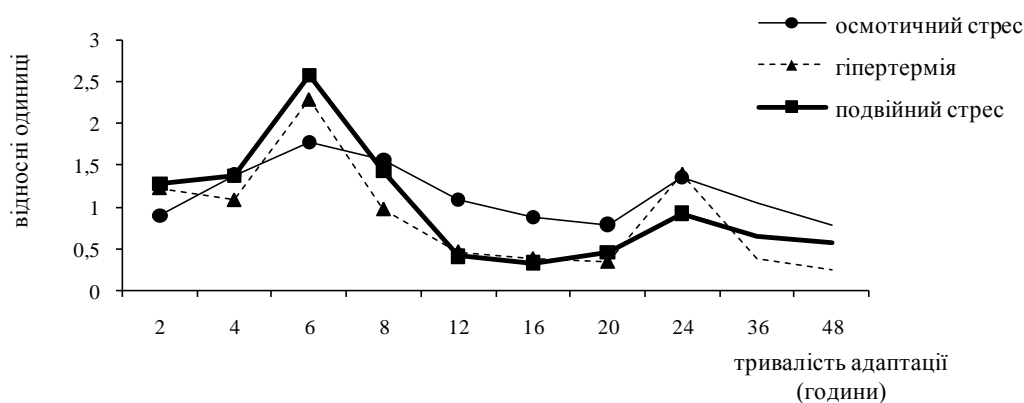


Рис. 2. Динаміка накопичення вільного проліну у процесі адаптації проростків льону олійного сорту Айсберг до деяких абіотичних стресів

Таким чином, можна зробити висновок, що незалежно від стійкості рослини льону олійного за дії осмотичного стресу, гіпертермії та дії цих стресів одночасно на протязі перших двох діб адаптації спостерігається підвищення рівню вільного проліну, однак механізми його утворення різні:

- у стійкого сорту він синтезується і його рівень збільшується і в подальшому (після 24 годин адаптації) сприяючи при цьому перебудову метаболізму клітини, який є більш пристосованим до нових умов існування рослини;
- у нестійкого ж сорту він утворюється в результаті розщеплення полімерних сполук, про що свідчить різке підвищення його концентрації через 12 годин адаптації та повільне зменшення подалі.

Другою маркерною сполукою у процесі адаптації проростків льону олійного за дії абіотичних стресових факторів є моносахариди. У нестійкого сорту (Авангард) достовірної зміни кількості моносахаридів знайдено не було.

У стійкого сорту (Айсберг) максимальний пік збільшення рівню вільних моносахаридів спостерігається у процесі адаптації до гіпертермічного стресу (приблизно в 11 разів), а мінімальний – до подвійного стресу (приблизно у 1,5 рази); у процесі ж адаптації до осмотичного стресу рівень вільних моносахаридів збільшується приблизно у 3 рази. (табл. 3).

Таким чином, можна зробити висновок, що накопичення вільних моносахаридів спостерігається на пізніх стадіях адаптації, а нестійкі генотипи до цього періоду для існування використовують усі свої наявні ресурси, тому і зміни кількості моносахаридів ми не спостерігали.

Таблиця 3

Накопичення вільних моносахаридів у процесі адаптації проростків льону олійного сорту Айсберг до деяких абіотичних стресів, мкг/г (дані за 2005-2010 рр.)

Вид стресу	Тривалість адаптації після стресу (години)									
	2	4	6	8	12	16	20	24	36	48
Контроль	2,91 ± 0,33	2,86 ± 0,25	3,13 ± 0,46	4,15 ± 0,58	2,36 ± 0,31	3,13 ± 0,45	2,71 ± 0,29	2,13 ± 0,18	2,73 ± 0,38	2,69 ± 0,25
Осмотичний	3,87 ±* 0,52	2,87 ± 0,38	3,18 ± 0,26	4,36 ± 0,46	3,08 ±* 0,29	3,07 ± 0,09	3,71 ±* 0,57	3,86 ±* 0,43	3,45 ±* 0,95	3,3 ±* 0,52
Гіпертермічний	2,73 ± 0,46	2,59 ± 0,30	3,85 ±* 0,24	3,2 ± 0,75	3,12 ±* 0,45	3,01 ± 0,38	3,92 ±* 0,12	3,59 ±* 0,75	3,81 ±* 0,88	3,21 ±* 0,31
Подвійний	2,06 ± 0,27	2,47 ± 0,24	2,71 ± 0,38	2,78 ± 0,46	4,22 ±* 0,85	3,02 ± 0,22	3,66 ±* 0,41	3,53 ±* 0,93	3,7 ±* 0,25	2,78 ± 0,36

Примітка:

* - достовірність різниці між контролем та дослідом при $P > 0,95$

Також слід зазначити, що при дії осмотичного та гіпертермічного стресів піки підвищення концентрації вільних моносахаридів спостерігаються в один і той же час адаптації – через 16 та 24 години; при дії ж подвійного стресу – через 4, 12 та 24 годин (рис. 3).

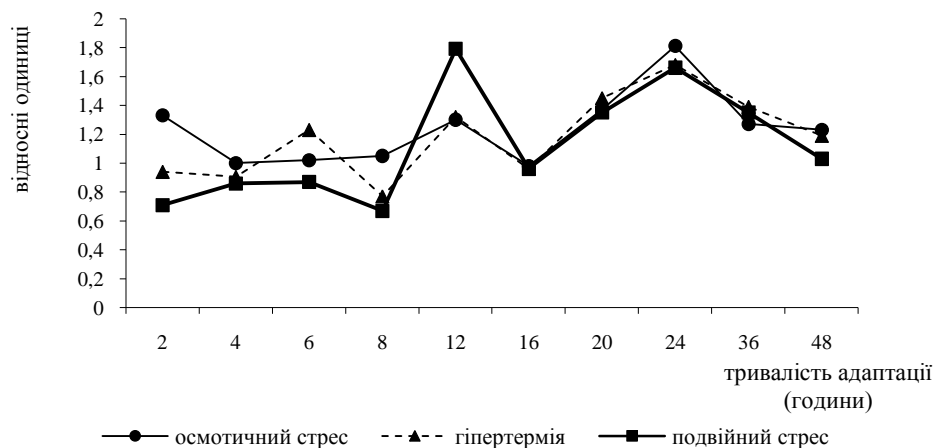


Рис. 3. Динаміка накопичення вільних моносахаридів у процесі адаптації проростків льону олійного сорту Айсберг до деяких абіотичних стресів

Таким чином, через 24 години адаптації спостерігається підвищення рівня вільних моносахаридів до дії усіх досліджених стресів. Достовірність різниці між дослідом та контролем визначали за критерієм Данета [9].

Враховуючи вищевикладене можна з упевненістю сказати, що вільні моносахариди беруть участь у процесі адаптації до досліджених нами стресів у другій половині першої доби адаптації. Причому їх роль більш суттєва в процесі адаптації до гіпертермічного стресу.

Враховуючи отримані нами результати, які узгоджуються з літературними даними [1, 2] можна зробити наступні висновки стосовно ролі вільних моносахаридів у процесі адаптації різних за стійкістю сортів льону олійного до осмотичного, гіпертермічного та подвійного стресів:

- у нестійких сортів льону олійного рівень вільних моносахаридів під дією стресів суттєво не змінюється ;
- у стійких сортів льону олійного рівень вільних моносахаридів значно підвищується у процесі адаптації до усіх досліджених нами стресів, причому найбільше підвищення його рівня спостерігається за дії гіпертермічного стресу;
- у стійких сортів льону олійного механізм адаптації до осмотичного та гіпертермічного стресів дуже схожий (піки підвищення вмісту вільних моносахаридів спостерігаються в один і той же час адаптації - через 16 та 24 години).

З літературних джерел [1, 2, 4] відомо, що основними універсальними протекторними речовинами до дії різноманітних абіотичних стресів є пролін та моносахариди. Деякі автори висловлюють припущення, що пролін бере участь на початковій стадії адаптації, а сахари – у процесі подальшої адаптації рослин до абіотичних стресів.

Висновки. Отримані нами результати співвідносяться з цими теоретичними даними: у стійких сортів льону олійного максимальний пік накопичення вільного проліну у процесі адаптації до осмотичного, гіпертермічного та подвійного стресів спостерігається через 6 годин адаптації, а максимальний пік накопичення вільних моносахаридів – через 12-36 годин адаптації.

У процесі адаптації проростків льону олійного стійких сортів у перші 6 годин після дії стресів (осмотичного, гіпертермічного та подвійного) першочергову роль відіграє вільний пролін, а у наступні 30 годин – вільні моносахариди.

Крім того, у результаті роботи нами було встановлено, що через 24 години у стійких генотипів льону олійного спостерігається одночасне збільшення і вільного проліну, і вільних моносахаридів. Тому ми пропонуємо тестувати проростки льону олійного на рівень стійкості до абіотичних стресових чинників, визначаючи рівень вільного проліну та моносахаридів через 24 години адаптації.

Література

1. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Е.Л. Кордюм. – К.: Наукова думка, 2003. – 227 с.
2. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений: учеб. пособие / Т.В. Чиркова. - СПб.: изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2002. – 244 с.
3. Методы биохимического исследования растения / [Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др.]; под ред. А.И. Ермакова. – [3-е изд.]. - Л.: Агропромиздат, 1987. – 429 с.
4. Практикум по росту и устойчивости растений / [В.В. Полевой, Т.В. Чиркова, Л.А. Лутова и др.]; под ред. В.В. Полевого, Т.В. Чирковой. – СПб.: изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2001. – 212 с.
5. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. / Б.П. Плешков; [3-е изд. доп.пер.]. – Агропромиздат. – 1985. – 255 с.
6. Bates L.S., Maldren R.P., Teare L.D. Rapid determination of free proline for water stress studies / L.S. Bates, R.P. Maldren, L.D. Teare // Plant and soil, - 1973. - Vol. 39, № 1. - P. 205
7. Шевякова Н.Н., Рощупкин Б.В., Парамонова Н.В., Кузнецов В.В. Стрессовый ответ клеток *Nicotiana sylvestris* L. На засоление и высокую температуру. 1. Аккумуляция пролина, полиаминов, бетаинов и сахаров // Физиология растений – 1994. – Т. 41. – С. 558-565.

ВКЛАД БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ В ПРОЦЕСС АДАПТАЦИИ ПРОРОСТКОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ

А.Н. Левчук

На проростках двух генотипов льна масличного была исследована динамика накопления пролина и моносахаридов в процессе их адаптации к абіотическим стрессовым факторам. Установлено, что динамика накопления этих веществ у генотипов с различным уровнем устойчивости неодинакова: у неустойчивого генотипа более активно накапливается пролин и совсем не накапливаются моносахариды, а у устойчивого генотипа накапливаются оба протекторных соединения -

максимум накопления пролина наблюдается через 6 и 24 часа адаптации, а моносахаридов – через 12 и 24 часа. Поэтому нами было предложено использовать свободный пролин и моносахариды в качестве маркеров устойчивости к абиотическим стрессовым факторам проросткам льна масличного через 24 часа адаптации.

THE CONTRIBUTION OF BIOCHEMICAL MARKERS IN RESISTANCE TO ADAPTATION OF FLAX SEEDLINGS TO ABIOTIC STRESS FACTORS

A.N. Levchuk

The dynamics of proline and monosaccharides accumulation was studied of using seedlings of two genotypes on of flax during adaptation to abiotic stress factors. It was found that the dynamics of these substances accumulation for genotypes with different levels of resistance was different: for unstable genotype proline is actively accumulated and monosaccharides do not accumulate, for resistance genotype the both the tread compounds are accumulated. A Maximal accumulation of proline is observed at 6 and 24 hours of adaptation and monosaccharides – after 12 and 24 hours. It was proposed to use the free proline and monosaccharides as markers of resistance to abiotic stress factors at the stage of seedlings after 24 hours of adaptation.

Рецензент: В.А. Лях, доктор биол. наук, профессор, зав. кафедрой садово-паркового хозяйства и генетики растений Запорожского национального университета.