

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА В
УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА»**

Студент



Седякин Вячеслав Алексеевич

Руководитель



Левашова О.А.

Рецензент



Иванов А.И.

Нормоконтролер



Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 08.06.19 № 15)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

отлично

(протокол заседания ГЭК от 10.06.19 № 2)

Секретарь ГЭК



Ключников С.В.

Пенза, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Действие неблагоприятных факторов на организм растения.....	6
1.2 Понятие стресса растений.....	9
1.3 Генерация активных форм кислорода и их повреждающие действие.....	14
1.4 Антиоксидантная система растений.....	17
1.5 Устойчивость растений к низким температурам.....	20
1.6 Закаливание растений.....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1 Объект исследования.....	28
2.2 Определение активности полифенолоксидазы	29
2.3 Определение активности пероксидазы.....	30
2.4 Определения содержания пролина	31
2.5 Методы статистической обработки данных.....	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	34
3.1 Определение энергии прорастания и всхожести семян огурца.....	34
3.2 Определение содержания пролина в семенах и проростках огурца.....	36
3.3 Определение активности полифенолоксидазы в семенах и проростках огурца	45
3.4 Определение активности пероксидазы в семенах и проростках огурца	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В современное время проблема уменьшения урожайности культурных растений проявляется все острее. Это связано загрязнением атмосферы, уменьшением озонового слоя и ухудшением климата в различных регионах нашей страны. Поскольку погодноклиматические условия и общее состояние атмосферы все менее и менее благоприятны для выращивания растений, встает вопрос о поисках решения этой проблемы. Важное влияние оказывает и стремительно развивающееся растениеводство. При попытках достигнуть максимальной продуктивности, многие организации выращивают отдельные монокультуры, а так же стараются собрать популяции растений, которые будут минимально отличаться друг от друга по генотипу, фенотипу и кариотипу. Лишенные действия естественного отбора, эти растения не смогут выработать мощные защитные механизмы, а, следовательно, уменьшится их устойчивость [5]. Однако для необходимых сельскохозяйственных растений, которые преимущественно выращиваются в больших количествах, основополагающей является способность приспосабливаться и преодолевать неблагоприятные условия среды без уменьшения показателей роста и снижения количества урожая. Для этого необходимо появление новых биохимических изменений в протекании метаболизма. Синтез протекторных соединений позволит более продуктивно переносить неблагоприятное воздействие [19].

В России необходимые для нормального протекания жизнедеятельности растения выращивают повсеместно. Причем условия соседних регионов могут существенно отличаться друг от друга. Результатом этих отличий могут быть разные морфогенетические и физиологические отличия у разноживущих организмов одного вида. Следовательно, вопросы повышения резистентности, а так же приобретения биохимических изменений в организме у различных групп культурных растений получают все большую важность.

Под устойчивостью понимают изменение строения и функций растения, обеспечивающих приспособления к неблагоприятным условиям. Эти изменения могут появиться естественным путем, когда в организме растения самопроизвольно происходят изменения, повышающие его выживаемость [16]. Помимо этого устойчивость может быть выведена искусственно. Развитие генетики и селекции в последние годы достигло небывалых высот. Особую важность занимают попытки создания высокоустойчивых сортов сельскохозяйственных растений. Генетическим путем уже получены группы растений, которые устойчивы к вредителям, болезням и гербицидам. Продолжаются вестись работы, которые повысят устойчивость к группе абиотических факторов, таких как засуха, заболоченность, низкие температуры и другие [3].

Растения, как и все живые системы, обладают удивительной особенностью. Они способны совмещать в себе устойчивость и гибкость. То есть оставаться стабильными (не осуществлять серьезных морфогенетических перестроек) в случае изменения условий окружающей среды, но, тем не менее, попытаться приспособиться к этим условиям, и повысить или понизить уровень метаболитов, необходимый для жизни в данных условиях. Однако под действием неблагоприятных условий могут происходить нарушения различных функций на всех этапах организации, от молекулярного до организменного. Это в свою очередь нарушит процессы клеточного метаболизма, что в свою очередь окажет влияние на процессы роста и развития, и наверняка приведет к уменьшению урожайности. Данное состояние принято называть стрессом [34,39].

Огурец – наиболее популярная овощная культура в России. Она относится к группе теплолюбивых растений, что обуславливает ее чувствительность к изменениям температуры. Низкие температуры оказывают значительное влияние на метаболизм растения, поэтому необходим тщательный подбор условий для получения максимальной урожайности. Однако не весь диапазон высоких температур благоприятен

для данной культуры. Отсутствие возможности выработки адаптивного аппарата негативно скажется на растении при даже незначительном изменении условий [24].

Некоторые научные данные показывают, что использование стрессора при выращивании растения может повысить его адаптационную способность и урожайность. Результаты, полученные в данных исследованиях, могут стать теоретической основой использования стрессоров в сельскохозяйственном производстве. Исследования позволят понять, как можно использовать стрессор для получения результатов, заданных особенностями растения. В то же время. Изучение постстрессового периода позволит оценить период восстановления растения и скорректировать сроки агротехнических мероприятий [8].

Цель работы: выявление роли антиоксидантной системы растений огурца в процессе адаптации к условиям низкотемпературного стресса.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить изменение содержания пролина в прорастающих семенах и сформировавшихся растениях огурца при действии низких температур.
2. Изучить изменение активности полифенолоксидазы в прорастающих семенах и сформировавшихся растениях огурца при действии низких температур.
3. Изучить изменение активности пероксидазы в прорастающих семенах и сформировавшихся растениях огурца при действии низких температур.
4. Выявить основные аспекты возникновения адаптации к низкотемпературному стрессу.

Магистерская диссертация изложена на 63 страницах, иллюстрирована 12 рисунками. Список литературы содержит 68 источников на русском и иностранном языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Действие неблагоприятных факторов на организм растения

Можно заметить, что растения, произрастающие в естественной среде обитания, почти никогда не попадают в оптимальные для себя условия. Совокупность различных факторов среды, как положительных, так и отрицательных, оказывают существенное влияние на организм растения. Они вызывают проявление стрессовых факторов, которые могут отличаться своей силой и длительностью [18].

Определенные факторы неблагоприятной среды действуют непродолжительный временной промежуток. К ним относят ветер, кратковременные дожди, град. Другие, такие как затопление, засуха или высокая или низкая температура могут продолжаться в течение многих дней. Некоторые - месяцы, и даже годы (кислотность, радиация, заболоченная или пустынная местность). Важно и то, что описанные выше факторы редко оказывают одиночное воздействие, а обычно действуют в комплексе. И чем больше в этом комплексе факторов, тем более неподходящими для постоянного проживания растений становятся условия.

Все факторы делят на две большие группы. Это абиотические и биотические факторы. Биотические, или факторы живой природы, обуславливаются взаимодействием с другими живыми организмами. Это травоядные животные, другие конкурирующие растения, вредители и паразиты, а так же возбудители различных заболеваний. К абиотическим относят факторы неживой природы. Чаще всего это освещенность, температура, влажность, избыток или недостаток химических веществ и т.д [62]. Полный перечень факторов среды представлен в таблице 1.

В современное время наиболее подходящие условия, необходимые для выращивания растений, можно создать искусственно. Растения можно выращивать в особом грунте с соблюдением различных мер, или

использовать для этого фитотроны, специальные комплексы, в которых можно поддерживать идеальные условия. Можно регулировать различные параметры, на которые невозможно повлиять в природе. Продуктивность и прирост биомассы растений, выращенных в естественных условиях, существенно отличается от растений, выращенных в искусственных природных комплексах [8]. К примеру, урожайность такой злаковой культуры, как пшеница, в естественных условиях достигает 25 центнеров с гектара, а в фитотроне она может достигать 250 центнеров с гектара, что в десять раз больше [26].

Продолжительное действие одного фактора или их комплекса неблагоприятно сказывается на состоянии растения. Фактор, оказывающий повреждающее действие на организм растения, принято называть стрессором. Каскад физиологических изменений, который происходит в клетках растения и проявляющийся под действием фактора-стрессора, называют адаптационный синдром, или стресс [34].

В ответ на действие вышеописанных неблагоприятных факторов запускаются приспособительные механизмы. В основном это изменения структур и функций и выработка защитных механизмов. Эти изменения могут носить модификационный характер, то есть ненаследственный. Они не передадутся следующим поколениям, и возможно исчезнут в случае прекращения действия неблагоприятного фактора. Некоторые уже могут носить генотипический характер [68]. Обычно морфологические изменения можно проследить и увидеть на всех уровнях организации: от клеточного до тканевого, и даже организменного.

В климатических областях, в которых наблюдается динамическое изменение климата, существует еще один путь приспособления. Это выработка периодичной организации жизненных процессов. Данное явление получило название сезонная ритмика. Это чередование фаз активности и покоя, занятие определенных экологических ниш, а так же изменения сроков годовых циклов и их этапов [19,51].

Таблица 1 - Неблагоприятные факторы среды, способные вызывать у растений стрессовые состояния.

<i>Неблагоприятные факторы</i>	<i>Биотические факторы</i>	<i>Фитопатогены</i>	
		<i>Травоядные животные</i>	
		<i>Конкуренция</i>	<i>Межвидовая</i>
	<i>Абиотические факторы</i>	<i>Температура</i>	<i>Внутривидовая</i>
			<i>Высокая</i>
		<i>Вода</i>	<i>Низкая</i>
			<i>Засуха</i>
		<i>Радиация</i>	<i>Переувлажнение</i>
			<i>Ультрафиолетовое излучение</i>
			<i>Ионизирующее излучение</i>
		<i>Химические вещества</i>	<i>Освещенность</i>
			<i>Избыток</i>
		<i>Механические факторы</i>	<i>Недостаток</i>
			<i>Ветер</i>
			<i>Снег</i>
			<i>Движение почвы</i>

Взаимоотношения растений с действующими на них факторами среды, ответными реакциями, а так же приемами стабилизации состояния и ухода характеризуются тремя основными параметрами. Это требовательность, устойчивость и отзывчивость.

Требовательность характеризуется определенным уровнем действия каждого фактора, а в дальнейшем их суммой, без которой не будет нормального прохождения всех периодов вегетации, роста и развития, а так

же возможной урожайности. В основном это вода, питание, освещение и температура. Но достижение требуемого уровня каждого фактора еще не будет означать нормальное функционирование и необходимый уровень урожая. Действие данных факторов должно быть максимально сбалансировано в разные фазы роста.

Устойчивость определяется способность растения переносить крайние значения действия какого либо фактора, либо их суммарного значения. Если в процессе воздействия не нарушились физико-химические процессы, процессы роста, а так же урожайность, то можно судить о высокой устойчивости растения. Устойчивость в основном зависит от предшествующих событий и ухода. Предварительное накопление необходимых веществ, смещение времени вегетации хорошее раннее питание будут способствовать дальнейшему повышению устойчивости.

Отзывчивостью называются различные типы ответных реакций возникающих после улучшения условий обитания, или оптимизации уже действующих условий. Стоит заметить, что разные виды растений, и даже сорта, в пределах одного вида, отзываются на улучшение условий по разному. Влияние может быть как положительным, так и отрицательным, поэтому необходимо четко изучить влияние избыточного действия даже благоприятных факторов [8,51].

Знание биологических особенностей и условий прорастания, а так же основных параметров необходимо для обеспечения нормального протекания роста и развития растений.

1.2 Понятие стресса растений

Термин «стресс», который обозначает напряжение и происходит из английского языка, изначально использовался в медицине. Ганс Селье, ученый, сформулировавший основы теории стресса, стал применять этот термин для описания промежуточного состояния растений [34]. При

употреблении термина «стресс» не стоит забывать и о дополнительном термине «стрессор». Во многих видах литературы зачастую используют различные типы и наименования стрессов, такие как климатический, окислительный, низко- и высокотемпературный и другие. Однако эти наименования должны употребляться с термином «стрессор». Так как стресс, это состояние организма, которое почти всегда сопровождается одними и теми же химическими проявлениями, которые отличаются степенью интенсивности, не имеет значения, от чего он возник [9].

Обычно, химические, физические или физиологические реакции, протекающие в растениях под действием стрессора, лишь в нескольких случаях являются летальными. Такие стрессоры называют экстремальными, и обычно их воздействие существенно превышает защитные возможности организма, Ганс Селье стал определять стресс как совокупность неспецифических реакций, возникающих в организме под действием сильных внешних факторов, и вызывающих активацию и перестройку защитных систем. Обычно они имеют адаптивное значение. В связи с этим, в дальнейших исследованиях Селье стал называть их «общим адаптационным синдромом». В его более поздних работах термины «стресс» и «общий адаптационный синдром» и вовсе были объединены и использовались как синонимы. В 70-х годах прошлого века, термин «стресс» был заимствован в физиологию, чем сподвиг создание нового направления науки как стресс-физиология растений.

По современным представлениям, обычно выделяют три фазы реакции растений в ответ на действие неблагоприятных факторов. Это первичная стрессовая реакция, или фаза тревоги, фаза адаптации и фаза истощения. Протекание и развитие всех трех фаз представлено графически на рисунке 1. Исходным уровнем устойчивости характеризуется стандартное состояние метаболизма растения, направленное на поддержание жизнедеятельности с минимальными энергозатратами. Все биохимические процессы протекают в норме [4,50].

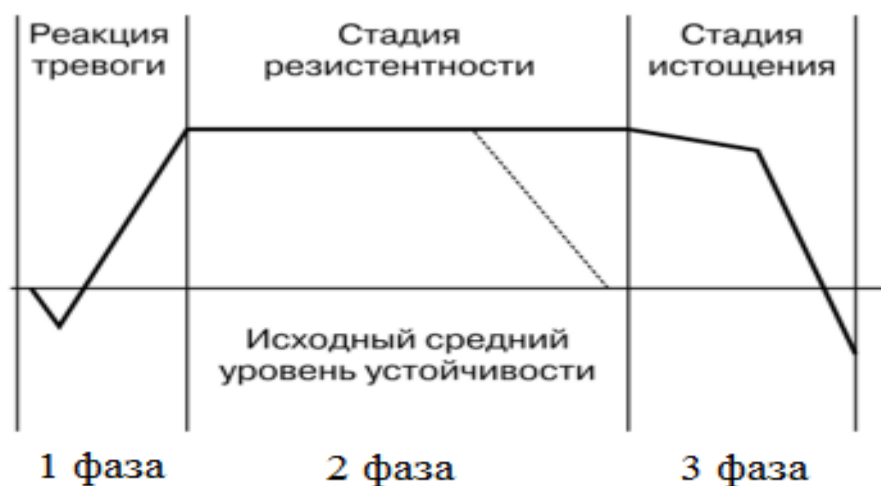


Рисунок 1. Фазы стресса по Селье

В первую фазу наблюдаются изменения физиологических процессов. В организме растения начинают проявляться как симптомы повреждающего действия, так и защитные реакции. В первую очередь происходит повышение проницаемости клеточных мембран, выход ионов калия из клеток, и изменение мембранного потенциала. Это приводит к значительному увеличению концентрации ионов кальция в клеточной цитоплазме за счет выхода из внутриклеточных депо [33]. Воздействие стрессора и смещение трансмембранного потенциала вызывает изменение степени поступления различных электрических сигналов, или импульсов. Они способны непосредственно влиять на функции тканей и органов, по которым распространяются. При прохождении импульса по определенному участку ткани, изменяется концентрации ионов калия и хлора, которые высвобождаются из возбудимых этим импульсом клеток. РН цитоплазмы смещается в кислую сторону и из-за этого происходит активация различных групп гидролитических ферментов [56]. Процессы распада доминируют над процессами синтеза. Преобладающим процессом становится катаболизм. Происходит накопление продуктов распада, активируются свободнорадикальные процессы, и увеличивается содержание свободных

форм кислорода. Затем начинают синтезироваться стрессовые белки. Рост и деление клеток тормозится.

Стоит заметить, что электрические сигналы, упомянутые ранее, носят так же предупреждающий характер. Они способствуют временному повышению устойчивости растения. Это повышение так же носит неспецифический характер и может быть представлено как некая форма адаптации, или предадаптация. Однако если степень внешнего воздействия очень большая, и выходит за рамки появления необратимых изменений в метаболизме организма, то он погибает в течение нескольких часов. Если же этого не произошло, адаптивный синдром переходит во вторую фазу [5,36].

При протекании второй фазы организм растения либо приспосабливается к неблагоприятным условиям, либо еще сильнее страдает от повреждающего воздействия. Данная фаза получила название - фаза адаптации. Обычно под адаптацией понимают формирование новых защитных систем организма, которые будут повышать устойчивость к неблагоприятным условиям и обеспечивать стабильное протекание метаболизма и онтогенеза. Все адаптационные механизмы формируются у растения в основном на основании изменений, произошедших во время первой фазы. Защитные системы направлены на восстановление ранее нарушенных процессов. Как и в случае первой фазы, многие протекающие реакции неспецифичны. В первую очередь снижается активность гидролитических ферментов и степень протекания катаболических реакций. Вновь запускаются процессы синтеза белка и нуклеиновых кислот. Постепенно начинают стабилизироваться мембраны, открываются и закрываются каналы, запускаются протонные помпы [41]. В результате почти полностью восстанавливается ионный транспорт. Постепенно приходит в норму активность митохондрий и хлоропластов, вследствие чего восстанавливается энергообеспечение. Снижается уровень генерации активных форм кислорода и процессов перекисного окисления липидов.

Синтезируемые ранее стресс белки (изоферменты) стимулируют работу ферментных систем [42].

Для всех растений свойственен общий путь адаптации. Это уход от воздействия. Обычно он не затрагивает биохимических изменений, а протекает лишь на физиологическом уровне. Механизмы могут быть самыми разными: от опущенности и редукции листьев до смещения сроков вегетации. Однако в некоторых условиях этого недостаточно, и запускается другой путь – изменение метаболических реакций. Данный механизм очень энергозатратен, так как связан с запуском восстановительных механизмов, которые направлены на устранение повреждений и поддержание жизнеспособного состояния. Запуск этого механизма обычно существенно сказывается на времени протекания фазы адаптации [54,60].

Финальным результатом второй фазы является формирование устойчивости к неблагоприятным условиям. Это явление получило название стресс-толерантность. Оно определяет не только способность растений переносить неблагоприятное воздействие в течение длительного промежутка времени, но и сохранять гомеостаз и давать потомство в таких условиях. После окончания фазы адаптации растения могут нормально вегетировать и поддерживать постоянство внутренней среды. Если адаптационный потенциал недостаточен, и растение не может приспособиться, наступает третья фаза [36].

Финальная фаза получила название «фаза истощения». В процессе протекания начинается разрушение клеточных структур, в первую очередь митохондрий и хлоропластов. Количество крист и гран значительно уменьшается. Гидролитические процессы вновь усиливаются [47]. Вследствие нарушения работы основных энергообразующих компонентов наступает энергетическое истощение клетки. Оно влечет сдвиги физико-химического состояния цитоплазмы, что свидетельствует о необратимых повреждениях. При длительном действии стрессора, превышающего пороговое значение, организм растения не выдерживает и погибает [50].

1.3 Генерация активных форм кислорода и их повреждающие действие

Кислород играет ключевую роль в энергетике живой клетки, а собственно организм не может без него обходиться. В мире есть небольшая группа организмов, способных жить без кислорода. Его основная роль – окисление различных питательных веществ [1]. Сам по себе, молекулярный кислород безвреден, однако продукты его окисления могут представлять большую опасность. К ним относят синглетный кислород, перекисные и супероксидные радикалы. Эти соединения и получили название активные формы кислорода (АФК). Обычно, АФК появляются, когда молекулярный кислород самопроизвольно перехватывает электроны, из какой либо транспортной цепи. Происходит его восстановление и образуется супероксидный радикал. Это заряженная частица кислорода, окруженная молекулами воды [13]. Она является источником других форм АФК, таких, как перекись водорода. Перекись в свою очередь, как промежуточное звено, может восстановиться до гидроксил-радикала. Он очень реакционноспособен и может окислить любое соединение в клетке, вплоть до ДНК, белков и липидов. То есть одна форма восстановленного кислорода может каскадно превращаться в другие, то есть, при разных условиях, из одной молекулы предшественника может получиться множество видов АФК [31,43].

Активные формы кислорода присутствуют в клетках постоянно, однако, в небольших концентрациях, от 8 до 11 моль. Они образуются во многих органеллах клетки, но больше всего – в митохондриях, из-за прохождения дыхательной цепи. У растений процессы окисления протекают и в хлоропластах, поэтому шанс образования АФК у них выше. Их образование происходит непрерывно и является обычным процессом. В клетках АФК выполняют множество функций: они индуцируют перекисное окисление различных метаболитов с образованием новых соединений (спирты, альдегиды, фенолы и т.д.). Например, в случае перекисного окисления липидов (ПОЛ) снижается концентрация жирных кислот, и

образуются их производные [49]. Так же АФК выполняют и защитную функцию: учувствуют в удалении патогенов и проведении сигналов.

Помимо своих основных функций, активные формы кислорода могут наносить вред. АФК можно отнести к группе высокореактивных соединений. Их высокая активность позволяет им взаимодействовать со многими соединениями, а так же промежуточными метаболитами [14]. Это может сказаться на нарушении работы клеточных структур, химических процессов, транспорта и общего состояния клеток. АКФ, связываясь с белками, могут оказывать повреждающее действие. В основном оно выражается в окислении -SH-групп и FeS-центров ферментов. Может происходить фрагментация и разрезание на участки полипептидных цепей, а так же изменение активного центра белка, делая его более чувствительным к действию протеаз [15]. Некоторые производные активных форм кислорода способны напрямую реагировать с нуклеиновыми кислотами. Это самый худший вариант развития событий, так как в результате повреждения азотистых оснований, либо рибозы и дезоксирибозы, может произойти какая либо модификация цепи ДНК. Эффект этой модификации может быть нейтральным, однако может быть и отрицательным. В таком случае происходит обрыв цепей ДНК, их расхождение, или даже полноценное повреждение хромосом [21].

Кроме белков, активные формы кислорода чрезвычайно сильно реагируют с липидами. Как мы все знаем, липиды – это соединения, составляющие клеточные мембраны. При взаимодействии может запуститься перекисное окисление липидов мембран, в результате которого происходит нарушение целостности данной структуры. Каскадно нарушается работа мембранных белков, которые представлены каналами и насосами. Проницаемость мембран резко повышается. Из-за этого смещается трансмембранный потенциал, изменяется концентрация ионов, воды и органических соединений. Для нормализации процессов клетке необходимо затратить дополнительный энергоресурс, что негативно скажется на ее жизнедеятельности [23,61]. Помимо всего вышеперечисленного,

промежуточные метаболиты и финальные продукты перекисного окисления могут обладать мутационной активностью. Они вызывает необратимые физико-химические изменения, негативно сказывающиеся на процессах роста, жизнедеятельности, а так же могут тормозить, и даже блокировать, клеточное деление [29].

Вдобавок к непосредственному воздействию на высокомолекулярные соединения, активные формы кислорода могут оказывать косвенное влияние на биохимические процессы в клетках. В случае растений, АФК влияют на содержание, а так же соотношение пигментов, принимающих участие в фотосинтезе. Могут вызывать нарушение водного баланса и работы водного транспорта[63]. Ранее упоминалось, что активные формы кислорода прямо влияют на нуклеиновые кислоты. Однако это влияние может быть и непрямым, например, через активацию нуклеаз. Она происходит из-за повышения концентрации кальция во внутриклеточном пространстве. А это повышение вызвано нарушением целостности клеточной мембраны и ионных насосов, что в свою очередь вызвано действием активных форм кислорода при инициации ПОЛ. То есть такой каскад реакций может быть вызван непрямым действием АФК [35].

Факторы среды, оказывая косвенное влияние на организм способны изменять уровень образовавшихся АФК. Однако существуют случаи, в которых уровень активных форм кислорода может значительно усиливаться. Это происходит в ответ на действие самых разных факторов. Данное явление, обусловленное сверхпродукцией активных форм кислорода, которые могут оказывать на клетки повреждающее действие, получило название «окислительный стресс» [12,25]. Его изучению посвящено множество исследований. Любопытно, что разные уровни АФК в клетках вызывают разные физико-химические эффекты, а не влияют на интенсивность одного, первостепенного эффекта [35].

Можно заключить, что образование АФК является одной из наиболее распространенных реакций в ответ на действие стрессора. Стоит заметить,

что совершенно разные по природе и степени воздействия неблагоприятные факторы вызывают различное по величине и продолжительности изменение концентрации активных форм кислорода. Из-за этого нарушается работа многих клеточных структур и биологических процессов [46].

1.4 Антиоксидантная система растений

Как уже говорилось ранее, растения испытывают на себе прямое действие неблагоприятных факторов. Их прикрепленный образ жизни способствует усилению данного влияния, и невозможности покинуть неблагоприятный район [10]. Самое сильное влияние оказывает один неблагоприятный фактор – окислительный стресс. Это состояние возникает обычно после возвращения растения в среду, где осуществляется сильная аэрация. Данный тип стресса может возникать и при попадании в неблагоприятные условия и при возвращении из этого состояния. Поэтому изучение этого явления будет способствовать пониманию системы адаптации растений к такому стрессу, а, следовательно, и к факторам, из-за которых этот стресс возникает.

Для различных регионов Российской Федерации характерны различные климатические условия. Существуют регионы с постоянным и временным переувлажнением, регионы с продолжительными и краткосрочными заморозками, регионы с мощной инфраструктурой, что в свою очередь, так же негативно влияет на состояние растений. Данные условия будут оказывать существенное влияние на метаболизм и уровень активных форм кислорода. Из-за этого будет ухудшаться состояние, как дикорастущих растений, так и сельскохозяйственных культур [28,55]. В ходе этой работы изучается влияние низких температур на организм растений, однако дальнейшее развитие окислительного стресса, является одним из следствий снижения температуры. Образованные в этом случае активные формы кислорода, свидетельствуют о связи низкотемпературного и

окислительного стресса. Собственно по этому, изучение способов адаптации растений к кислородному голоданию представляет большой интерес и в ходе работы: по увеличенному количеству АФК можно судить о степени развития окислительных процессов, а, следовательно, и о влиянии низких положительных температур [27].

Известно много работ, направленных на изучение окислительного стресса у животных. В клетках животных, как упоминалось ранее, АФК выполняют множество важных функций (фагоцитоз, патогенез и др.). Так же АФК участвуют в механизмах апоптоза практически у всех живых организмов. Изучению влияния АФК на организм растений уделялось значительно меньше времени, хотя их роль, особенно в мембранных структурах, чрезвычайно высока. Клетки растений обладают мощной антиоксидантной системой. Она многоуровневая и способна защищать от повреждающего воздействия [11]. К антиоксидантной системе относят ферментную систему, а так же низкомолекулярные соединения. К группе соединений-протекторов, входящих в антиоксидантную систему, относят супероксиддисмутазу, каталазу и различные группы пероксидаз (аскорбат-, глутатион- и гваяколпероксидазы) [45].

Супероксидный радикал способен самопроизвольно дисмутировать в синглетный кислород и в перекись водорода. Однако, обладая высокой реакционной способностью, он способен взаимодействовать с различными соединениями, вызывая их окисление и нарушая работу. В данном случае в процесс вмешивается фермент супероксиддисмутазы. Она обладает самой высокой известной каталитической активностью, и направлена на опережение действия супероксидного радикала. Эффективность ее работы ограничивается лишь самопроизвольными столкновениями с потенциально опасными соединениями, которые являются мишенью для супероксида. Первоочередное взаимодействие супероксиддисмутазы с этим соединением защищает клетку от его возможного повреждающего действия [30].

Каталаза – один из ферментов АОС. Ее основная функция – окисление различных низкомолекулярных соединений. Обычно это разложение образующегося в процессе метаболизма пероксида водорода до воды и кислорода. Однако она способна окислять и спирты с нитритами, но только в присутствии перекиси. В основном функция каталазы сводится к расщеплению избытка токсичного пероксида водорода, тем самым снижая его концентрацию и предотвращая повреждающее действие.

Пероксидазы – группа ферментов, которые принимают участие в ликвидации последствий окислительного стресса. Основная функция пероксидаз – восстановление гидроперекисей липидов до безопасных спиртов. Так же, как и каталаза, принимает участие в восстановлении пероксида водорода до воды. Данная группа ферментов оказывает защитное влияние на протекание метаболизма.

Глутатионредуктаза – фермент, который необходим для восстановления дисульфидных связей глутатиона. Этот процесс направлен на не прямое снижение содержания активных форм кислорода и защиту организма от повреждающего действия, возникающего при окислительном стрессе [52].

Антиоксидантная система включается в работу при избытке активных форм кислорода. Главным и первостепенным способом борьбы с АФК является их инактивация. Этот процесс осуществляет ряд специальных ферментов, описанных выше: пероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза. Пероксидазы восстанавливают перекись водорода до воды при помощи специальных субстратов, каталаза расщепляет перекись водорода с дальнейшим образованием молекулярного кислорода и воды, а супероксиддисмутаза катализирует процесс превращения супероксидных радикалов в кислород и перекись, которую перерабатывают два предыдущих фермента [64]. Помимо ферментов в АОС входят некоторые низкомолекулярные вещества. Они так же способны влиять на концентрацию АФК, и получили название антиоксиданты. К ним относят витамины групп

А, Е и С и каратиноиды. Еще один механизм защиты – элементарное уменьшение концентрации молекулярного кислорода, а следственно и уменьшение АФК в клетке.

Степень повреждений, полученных клеткой от АФК, зависит от многих факторов: скорость образования АФК, эффективность работы АОС, наличие резистентности к АФК и стрессоустойчивостью. Однако при чрезмерном накоплении АФК и неспособности их вывода запускается процесс апоптоза и клетка уничтожается [13,59].

1.5 Устойчивость растений к низким температурам

В современное время устойчивость растений к низким температурам можно условно разделить на два вида: холодостойкость и морозоустойчивость. Холодостойкость – способность, которая проявляется в основном у теплолюбивых растений и позволяет им переносить низкие положительные температуры. Морозоустойчивость же определяется способностью переносить уже отрицательные температуры. И хотя в обоих случаях действуют схожие адаптационные механизмы, частично они отличаются [20].

В первую очередь стоит поговорить о холодостойкости. Почти все теплолюбивые растения страдают при снижении температуры, даже если эта температура остается положительной. Это можно заметить по проявлению внешних симптомов: появлению некротических пятен, увяданию побегов и листьев, замедленному времени вегетации. Первостепенный эффект низких положительных температур связан с появлением температурного стресса. В первую очередь происходит повреждение клеточных мембран, вследствие чего увеличивается их проницаемость. Нарушается гомеостаз ионов, большое количество ионов калия и кальция уходят из цитоплазмы в межклеточное пространство. Из-за нарушения целостности мембраны начинает меняться ее архитектура, происходят конформационные изменения

липидов и белков. Нарушение состояния клеточной мембраны влечет за собой и нарушение работы мембран клеточных органелл, в частности хлоропластов и митохондрий. Тормозятся процессы фосфорилирования [27,57]. Как упоминалось ранее, накапливаются активные формы кислорода, а так же промежуточные метаболиты. Если сравнить процессы, протекающие в организме в нормальных условиях, то можно заметить, что все они согласованы и последовательны: промежуточные и ненужные метаболиты тут же перерабатываются или выводятся из организма. В случае температурного сдвига нарушается их последовательность и согласованность. Это связано с тем, что протекание всех биохимических реакций обусловлено действием определенной температуры, а в случае ее снижения, часть из них сильно замедляется, часть замедляется слабо, а часть и вовсе не меняется. Данное каскадное нарушение и приводит к неспособности вывода вредных продуктов и к дальнейшему их накоплению. Примером служит торможение цикла Кребса, а следовательно и накопление продуктов гликолиза. Продолжительное действие низких температур может привести растение к гибели [37].

Как и все другие живые организмы в таком случае, растения, запускают приспособительные механизмы. Это ответная, защитная реакция на низкие положительные температуры. В первую очередь необходимо стабилизировать мембраны и восстановить их целостность. Это позволит предотвратить утечку ионов из клетки, восстановить трансмембранный потенциал и мембранный транспорт. К примеру, устойчивые растения. С уже выработанным адаптационным механизмом, обладают повышенным количеством ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов мембран [44]. Следственно это способствует снизить их разрушаемость и сохранить работу транспорта. Важную роль так же играют различные ферменты. В основном, это ацетилтрансферазы и десатуразы. Десатуразы инициируют превращение насыщенных жирных кислот в ненасыщенные [17].

Результаты недавних исследований показывают, что мутантные растения, у которых отсутствуют эти ферменты, вовсе не способны переносить низкие, хоть и положительные, температуры. Причем введение растениям генов, ответственных за синтез ацетилтрансферазы, позволяет им повысить содержание жирных кислот и выработать устойчивость к холоду. Простыми словами, у таких растений появляется способность поддерживать свой метаболизм при значительных изменениях температуры. Это происходит в основном за счет расширения диапазона температуры работы ферментов, а так же за счет синтеза различных протекторных и стрессовых белков. Естественно возрастает эффективность работы антиоксидантной системы [53].

Последние исследования показывают, что можно заранее развить холодостойкость у некоторых культурных теплолюбивых растений. Для этого необходимо предварительное замачивание семян в условиях чередующихся температур. Так же довольно эффективным методом считается использование различных микроэлементов (Zn, Mn, Cu, B, Mo), которые предварительно добавляются в замачиваемый раствор. Есть сведения, что предпосевное замачивание семян в слабых растворах борной кислоты, а так же сульфатов меди и цинка положительно влияет на развитие холодостойкости [67].

В случае если температура опустится ниже нуля, то в дело вступает другое понятие – морозоустойчивость. По всей территории России многолетние растения нередко подвергаются воздействию низких температур. Причем, разные растения обладают разной степенью устойчивости к низким температурам. Изучение влияния холода на организм растений показало что морозоустойчивость у одного и того же растения в разные периоды времени может значительно отличаться. Это в первую очередь зависит от условий, в которых находилось растение до наступления морозов. Уже доказано, что степень воздействия низких температур зависит от состояния растения, а, конкретно, от оводненности тканей [3]. К примеру,

сухие семена могут пережить снижение температуры до -196°C . Основное действие на организм оказывает уже не нарушение метаболизма вследствие переохлаждения, а льдообразование. Лед, в случае охлаждения, образуется как в клетке, так и вне ее. Если температура снижается быстро, то неизбежно образование льда в цитоплазме и вакуолях клетки. При постепенном снижении, лед образуется в межклетниках. Клеточная мембрана препятствует попаданию кристаллов льда внутрь клетки, однако клетка все равно находится в состоянии сильного переохлаждения. В ответ на образование льда в межклетниках происходит перераспределение воды и смещение водного потенциала. В таком случае организм пытается восстановить равновесие, которое достигается либо за счет оттока воды из клетки в межклеточное пространство, либо за счет образования внутриклеточного льда с целью выравнивания водного градиента. Выбор необходимого пути зависит от настоящего состояния организма. Если же скорость оттока воды будет соответствовать скорости снижения температуры, то внутриклеточный лед не образуется. Тем не менее, даже при уравнивании водного потенциала клетка может погибнуть [11,48]. Это происходит из-за того что образовавшиеся кристаллы льда, оттягивая воду, вызывают обезвоживание клетки, а так же оказывают механическое давление на клеточные структуры и вызывают их повреждение. Все эти действия имеют негативные последствия: уменьшение объема клеток и содержащегося внутри клеточного сока, потерю тургорного давления и сдвиг pH [40].

Первая реакция растения на охлаждение – окислительный стресс. Как упоминалось ранее, в результате повышения содержания активных форм кислорода индуцируется процесс перекисного окисления липидов. А, следовательно, меняется соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Принято читать, что именно это начало процесса повреждения клеток, в частности плазматической мембраны и мембран митохондрий и хлоропластов [57]. Последствия почти такие же, как и при влиянии низких, но положительных температур. Это нарушение работы

мембранных белков, нарушение работы мембранного транспорта, потеря ионов. Так же, как упоминалось ранее, нарушается работа хлоропластов, митохондрий, некоторых ферментов.

Важно заметить, что клетка не всегда может погибнуть в процессе замерзания. Она может пережить этот период, но погибнуть уже в процессе оттаивания. Из-за обезвоживания и остаточного механического воздействия кристаллов льда, которые накопились в межклетниках, наступает преждевременная смерть. Это связано в основном с тем, что клетка не прошла процесс закаливания [22].

Можно заключить, что морозостойкость растений может зависеть от множества факторов, основными из которых являются генетическая обусловленность и предшествующие условия. Именно по этому один и тот же организм в определенные промежутки времени может пережить похолодание до 50°C, а может погибнуть и при -10°C [48].

Стоит сказать пару слов и про зимостойкость растений. Помимо прямого воздействия мороза, растения в этот период подвергаются влиянию других неблагоприятных факторов. Из-за обильного снежного покрова, температура ближе к почве начинает немного повышаться, в результате интенсивность дыхания возрастает. Растение может израсходовать свои запасы углеводов и не пережить этот период [16]. Еще одним фактором является образование ледяной корки. Из-за промерзания верхних слоев почвы происходит оттягивание жидкости, корни растения разрываются и оно погибает. Следовательно, максимально зимостойкими видами, являются растения с повышенным содержанием углеводов и мощной корневой системой [3].

1.6 Закаливание растений

Одним из важных процессов адаптации, как к положительным, так и к отрицательным низким температурам является закаливание. Это обратимое

физиологическое приспособление, происходящее под действием внешних факторов. Его природа была расшифрована благодаря работам И.И. Туманова. В результате закаливания возрастает резистентность к низким температурам, однако такой способностью обладают далеко не все растения. Следовательно, невозможна полноценная защита растений от холода и мороза, поэтому необходима дальнейшая разработка методов решения данной проблемы [32].

Для того чтобы растение приобрело способность к закаливанию, ему необходимо завершить все ростовые процессы. Закаливание предусматривает в первую очередь перестройку гормональной системы, собственно, поэтому и необходимо полноценно завершить рост. Сигналом к прекращению роста могут быть множество факторов, но в первую очередь это наступление холодов, то есть снижение температуры, а так же сокращение фотопериода. Помимо вышеописанных условий существует еще один стимул прекращения роста, но его эффект скорее отрицательный. В случае оттока или недостатка необходимых веществ, ростовые процессы тормозятся на физиологическом уровне. Из-за этого растение физически не может их закончить, в результате чего теряет способность к закаливанию [32,40]. Обычно, такие растения не переживают даже не сильные морозы. Следовательно, приобретение данной способности тесно связано с окончанием ростовых процессов и переходом растения в покоящееся состояние. Последние исследования показывают, что закаливаться могут лишь полноценно сформировавшийся организм. Тем не менее, есть еще одно важное условие – обязательное наличие хорошо развитой корневой системы [16].

Процесс закаливания протекает в две фазы. Первая, световая, фаза всегда протекает при положительной температуре. Она является подготовительной. В данный период продолжают снижаться темпы ростовых процессов. В некоторых случаях возможна их полная остановка. Поскольку фаза является подготовительной, то происходит накопление веществ, которые помогают противостоять холоду. Плюс, замедление метаболизма

уменьшает скорость расхода уже запасённых веществ. Основные запасенные таким образом вещества – это сахара. Когда их концентрация в клетках повышается, то снижается водный потенциал, а, следовательно, увеличивается концентрация клеточного сока. Как известно, чем выше концентрация раствора, а в нашем случае клеточного сока, тем ниже точка замерзания данного раствора. Поэтому можно с уверенностью сказать, что увеличение количества сахаров будет благотворно влиять на скорость образования льда внутри клеток и в межклетниках. Так же существует информация, что моносахариды проявляют защитное действие на поверхностные мембранные белки [24].

Еще одними важными соединениями являются ненасыщенные жирные кислоты. Как мы все знаем, ненасыщенные жирные кислоты входят в состав липидов клеточных мембран. Повышение их концентрации благотворно скажется на прочности и проницаемости мембран. Повышенная прочность позволит более долго сдерживать давление и повреждающее действие образующихся кристаллов льда [22]. Синтез некоторых стрессовых белков так же можно считать механизмом адаптации. В первую очередь это дегидрины (LEA-белки) и белки холодового шока. Их основная задача – оказывать купировать льдообразование. То есть они замедляют скорость образования новых кристаллов льда, а так же снижают скорость роста уже образовавшихся [44].

В данную фазу, помимо накопления полезных веществ, идет избавление от потенциально нежелательных. Основным из них является свободная вода. Можно легко проследить закономерность: чем меньше в клетках воды, тем меньше из нее образуется льда, а, следовательно, будет возникать меньше повреждений. Особых перестроек метаболизма в данную фазу не происходит. Как только накопится достаточное количество необходимых веществ, клетка переходит в состояние покоя, минимизируя процессы дыхания (альтернативный путь) и максимально уменьшая свое энергопотребление [66].

Вторая фаза начинается при дальнейшем снижении температуры. Она не требует света. Как описывалось ранее, в данный период происходит выход воды из клеток. Происходят более значительные изменения. В первую очередь это перестройка цитоплазмы. Она становится более проницаемой для воды, поэтому быстрее отдает ее в межклеточное пространство и препятствует льдообразованию в клетке. Продолжают синтезироваться специфические белки. Они устойчивы к холоду и обезвоживанию, и направлены на поддержание клеточного гомеостаза. Как отмечалось ранее, накопленные сахара начинают использоваться для защиты от охлаждения. Накопленные ранее ненасыщенные жирные кислоты расходуются на увеличение жесткости мембран и сопротивление механическому воздействию [65].

Ряд данных физиологических изменений в клетках показывает адаптационные механизмы. Чем сильнее выражены указанные признаки, тем сильнее развивается холодостойкость и морозоустойчивость. Повышение морозоустойчивости имеет большое значение. Помимо этого особое внимание уделяется выведению морозоустойчивых сортов. Развивающаяся генетика и гибридная технология поможет создать трансгенные сорта, имеющие неспецифические гены, отвечающие за синтез криопротекторов [38].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Исследования проводились на семенах и растениях огурца (лат. *Cucumis sativus*), сорта «Парижский корнишон». Это пчелоопыляемый сорт, который характеризуется раннеспелостью. В плодоношение вступает на 45-50 день. Растение сильнорослое, среднеплетистое, преимущественно женского типа цветения. Плод удлиненной формы, веретеновидный, крупнобугорчатый, темно-зеленого цвета. Длина зеленца от 6 до 11 сантиметров, масса от 40 до 95 грамм. Средняя урожайность составляет 2,5-4 килограмма с квадратного метра.

Данный сорт является районированным по Пензенской области. Его принято считать легкодоступным и универсальным.

Исследование проводилось на базе Пензенского педагогического института.

Перед проведением эксперимента определялась энергия прорастания и всхожесть исследуемых семян. В три чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой закладывалась проба по сто семян. Чашки помещались в благоприятные для роста условия, и после прорастания происходила обработка и подсчет необходимых показателей. Полученные значения энергии прорастания и всхожести сравнивались с таковыми в ГОСТе 12038-84, что позволило судить о качестве семян их необходимом количестве.

Перед непосредственным исследованием семена и пророщенные растения подвергались охлаждению в криотермостате при 0 °С и при +4 °С. Действие низких температур продолжалось в течение 1,3,6,12 и 24 часов.

В качестве критериев оценки исследуемых биохимических показателей брались значения изменений активности ряда ферментов, которые свидетельствуют о присутствии в клетках активных форм кислорода, что в

свою очередь является следствием проявления низкотемпературного стресса. Поэтому не составило трудности выделить зависимость изменения концентрации запасных и активных веществ от температуры и времени нахождения в заданных условиях.

2.2 Определение активности полифенолоксидазы

Активность полифенолоксидазы определялась по методу Бояркина, спектрофотометрически.

Навеску растительных тканей массой 0,3 г растирали в ступке с небольшим добавлением (15-20 мл) 1/15М фосфатного буфера, с pH=7,0-7,4. Полученную массу количественно переносили в мерную колбу, объемом 25 мл. После чего тем же буфером доводили до метки, тщательно перемешивали и оставляли настояться в течение 15 минут. По истечении времени раствор фильтровали через двойной бумажный фильтр. Полученный фильтрат уже использовали для определения активности фермента [2].

Измерения проводились на спектрофотометре. В кювету толщиной 1 см последовательно вносились 2 мл фильтрата, 2 мл 1/15 М фосфатного буфера, 2 мл свежеприготовленного 0,02% водного раствора диметил-п-фенилендиамина и 2 мл свежеприготовленного 1% раствора пирокатехина. Проба тщательно перемешивалась, помещалась в спектрофотометр и засекалось время достижения оптической плотности равной 0,05.

Активность фермента рассчитывалась по формуле:

$$A = D * (\alpha * \beta * \gamma) / (t * d),$$

Где:

D – оптическая плотность;

d – толщина слоя жидкости (толщина кюветы), см;

t – время, с;

α – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навески, г;

β – степень дополнительного разведения вытяжки (если это потребуется);

γ – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси (при данных условиях равна 4).

2.3 Определение активности пероксидазы

Активность пероксидазы определяли опять по методу Бояркина. Данный метод так же основывается на постепенном изменении оптической плотности раствора. Об активности фермента можно судить по времени, за которое изучаемый раствор достигает необходимой оптической плотности. Субстратом в данном опыте выступает бензидин. При окислении образуется соединение синего цвета.

Для эксперимента бралась навеска растительного материала весом 0,1 г. После чего она тщательно растиралась с добавлением небольшого количества ацетатного буфера ($\text{pH} = 5,4$). Полученная биомасса переносилась в мерную колбу на 25 мл, доводилась до метки, перемешивалась и оставлялась настояться при комнатной температуре. Настоянный раствор подвергали центрифугированию в течение 10 минут при 3000 об/мин. Затем отбирали надосадочную жидкость и в ней определяется активность фермента. К надосадочной жидкости прибавляли бензидиновый реактив. Это 130 мл дистиллированной воды, в которую добавлено 2,3 мл ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина. Полученный раствор перемешивался и ставился на водяную баню при температуре 60-70°C. После полного растворения бензидина давали смеси остыть и добавляли в нее 5,5 г ацетата, для уменьшения кислотности [6,39].

Появление синей окраски окисленного бензидина является индикатором работы пероксидазы. Время, в течение которого образуется эта

окраска, является показателем активности. Измерение проводилось на спектрофотометре при длине волны 590 нм.

Расчет активности производился с использованием следующей формулы, и выражался в единицах активности на 1 г сырого веса за 1 секунду:

$$A = D * (\alpha * \beta * \gamma) / (t * d),$$

Где:

D – оптическая плотность;

d – толщина слоя жидкости (толщина кюветы), см;

t – время, с;

α – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навески, г;

β – степень дополнительного разведения вытяжки (если это потребуется);

γ – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси (при данных условиях равна 4).

2.4 Определения содержания пролина

По количеству свободного пролина можно судить о степени повреждения клеток и активности работы антиоксидантной системы. Содержание пролина определялось фотоколориметрическим методом по Бэйтсу. В качестве исследуемого материала брались семена или листья растений. Растительную навеску массой 0,5 г перетирали в ступке до однородной массы, постепенно приливая 10 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Для ее приготовления необходимо взять 17 г сухой кислоты и довести дистиллированной водой до 500 мл. Полученный гомогенат пропускался через бумажный фильтр. Из фильтрата отбирали 2 мл, переносили в стеклянную пробирку с пробкой. После этого в пробирку прибавляли 2 мл кислого нингидрина (1,25 г нингидрина, 30 мл ледяной

уксусной кислоты и 20 мл 6 М раствора фосфорной кислоты необходимо смешать, нагреть при 80°C на водяной бане до полного растворения нингидрина и охладить) и 2 мл ледяной уксусной кислоты. В контрольную пробирку вместо фильтрата вносилось 2 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Все пробирки переносились в кипящую водяную баню на 40 минут, потом остужались в кристаллизаторе в течение 20 минут. После остывания в каждую пробирку добавлялось 4 мл толуола и они интенсивно взбалтывались 10-20 секунд. После отстаивания смеси и разделения жидкостей, стало заметно, что краситель перешел в слой толуола. Его цвет может варьироваться от слабо-розового до пурпурного, что и будет определять концентрацию пролина [7].

Окрашенный слой отбирался пипеткой, переносился в кювету и, измерялась его оптическая плотность при длине волны 490 нм. Концентрацию пролина определяли по калибровочной кривой, представленной на рисунке 2.

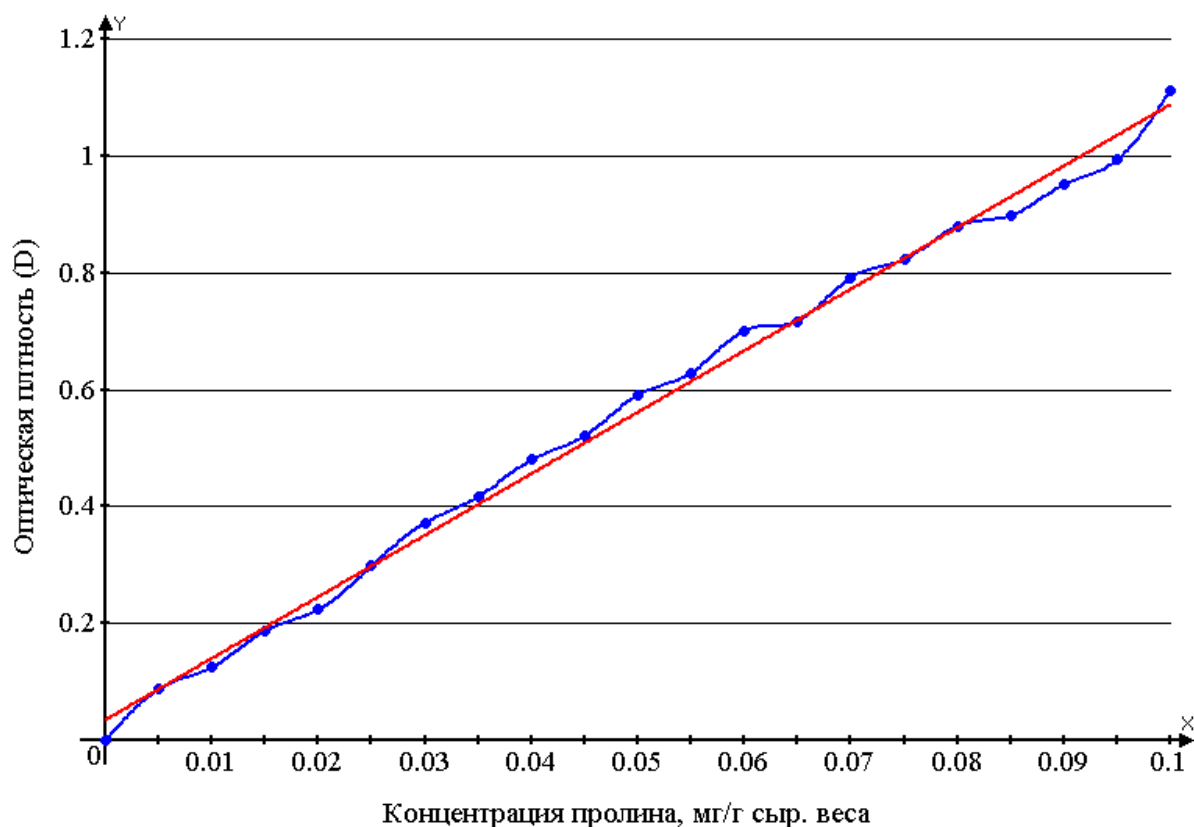


Рисунок 2. Калибровочная прямая по пролину

2.5 Методы статистической обработки данных

Опыты выполнялись в трех повторностях. В качестве статистической обработки данных использовались анализ ошибки средней и расчёт критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение энергии прорастания и всхожести

В ходе эксперимента по определению коэффициента прорастания были проведены следующие действия. Три чашки Петри, с заранее заложенными в каждую семенами (100 штук), были помещены в темное место с оптимальной для прорастания температурой (18-25 °С) на 24 часа. Данные о количестве проросших семян представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Определение коэффициента всхожести

Проба	Количество заложенных семян	Количество взошедших семян
Чашка Петри №1	100	79
Чашка Петри №2	100	77
Чашка Петри №3	100	73
Среднее значение	100	77

Данные в таблице свидетельствуют, что коэффициент всхожести семян огурца, сорта «Парижский корнишон» составляет 77%. Следовательно, при дальнейших приготовлениях к эксперименту следует учитывать это значение, и оптимально подбирать количество исходного материала.

Эксперимент по определению энергии прорастания выполнялся одновременно с экспериментом по определению всхожести. Основным отличием было время инкубации семян. Оно составляло трое суток. Это необходимо для более интенсивного прорастания семян и определения выровненности и выживаемости. После истечения времени измерялась и оценивалась длина проростков. Недостаточные по длине проростки считались неразвитыми и отсеивались. Данные о всходах с похожей длиной проростков представлены в таблице 3.

Таблица 3- Определение энергии прорастания

Проба	Количество взошедших семян	Количество семян с развитыми проростками
Чашка Петри №1	79	55
Чашка Петри №2	77	59
Чашка Петри №3	73	44
Среднее значение	77	53

Значение энергии прорастания составляет 68% от количества взошедших семян. Это свидетельствует о неполной выровненности популяции растений огурца.

Данные полученные в результате этого эксперимента могут охарактеризовать наши семена с точки зрения показателя зрелости. Он определяется разницей между коэффициентом всхожести и энергией прорастания. Разница более 10% - семена, физиологически недозревшие, менее 10% - созревшие. В нашем случае это значение равно 9%, что свидетельствует о достаточной зрелости исходных семян.

Если обратиться к ГОСТу о прорастании семян, за номером 12038-84, то можно узнать, что средние значения всхожести и прорастания равны 7 и 4. Что в переводе на наши условия, равны 70% и 40% соответственно. Значения, полученные в нашем эксперименте равны 77% и 53%, что означает, что выбранные нами семена удовлетворяют ГОСТу и обладают допустимым показателем зрелости, а значит, их можно использовать для дальнейшего проведения эксперимента.

Однако не стоит забывать, что данные полученные в результате дальнейших исследований не будут полноценно отражать свойства, допустимые для других видов и сортов растений огурца. Полученные результаты будут частным случаем, 100% возможным лишь для данного сорта и данных условиях.

3.2 Определение содержания пролина в семенах и проростках огурца

Как известно, одним из защитных механизмов при возникновении температурного стресса является синтез или иммобилизация соединений, которые будут поддерживать постоянство клеточных структур в условиях повреждающего фактора. Существует гипотеза, что при стрессовом воздействии уровень свободного пролина повышается. Данная аминокислота обладает протекторными и осморегуляторными функциями. Проведенные исследования показали, что низкие положительные температуры оказали влияние не только на концентрацию пролина, но и на динамику его накопления при различных условиях охлаждения.

Чтобы понять, как и насколько изменяется концентрация пролина, необходимы контрольные данные, которые будут свидетельствовать о содержании пролина при благоприятных условиях. Клетки используют аминокислоты для различных функций, поэтому маркером можно считать лишь значительное изменение концентрации.

Наименьшая концентрация пролина в сухих семенах и составляет 0,0016 мг/г сырого веса. После замачивания семян концентрация пролина увеличивается примерно в 5-6 раз и составляет от 0,0088 до 0,0099 мг/г сырого веса в зависимости от времени. Это свидетельствует об условно постоянном уровне пролина в прорастающих семенах. Низкий уровень в сухих семенах вероятнее всего связан с тем, что в эндосперме данная аминокислота находится в связанном состоянии, а при замачивании и получении достаточного уровня оводненности, начинается гидролиз запасных веществ эндосперма и мобилизация свободного пролина, направленная на осуществление пластических функций клеток. В зависимости от возраста семян, этот показатель может варьироваться, но всегда остается в определенных пределах, что свидетельствует о нормальных условиях прорастания.

Совершенно обратная ситуация наблюдается в семенах, которые после 12 часов исходных условий были помещены в зону низких положительных температур (4 °C). Если в случае сухих семян, и семян прорастающих в течение 12 часов, концентрация пролина отличалась не более чем в 1,3 раза, то после охлаждения, это значение резко повысилось. На рисунке 3 можно увидеть, что возрастание концентрации пролина происходит линейно и достигает своего пика в возрасте 20-24 часов, 12 из которых семена находились под воздействием низких температур. Концентрация пролина составила 0,0245 мг/г сырого веса, что в 2,5 раза выше, чем концентрация в тот же промежуток времени в контрольной группе.

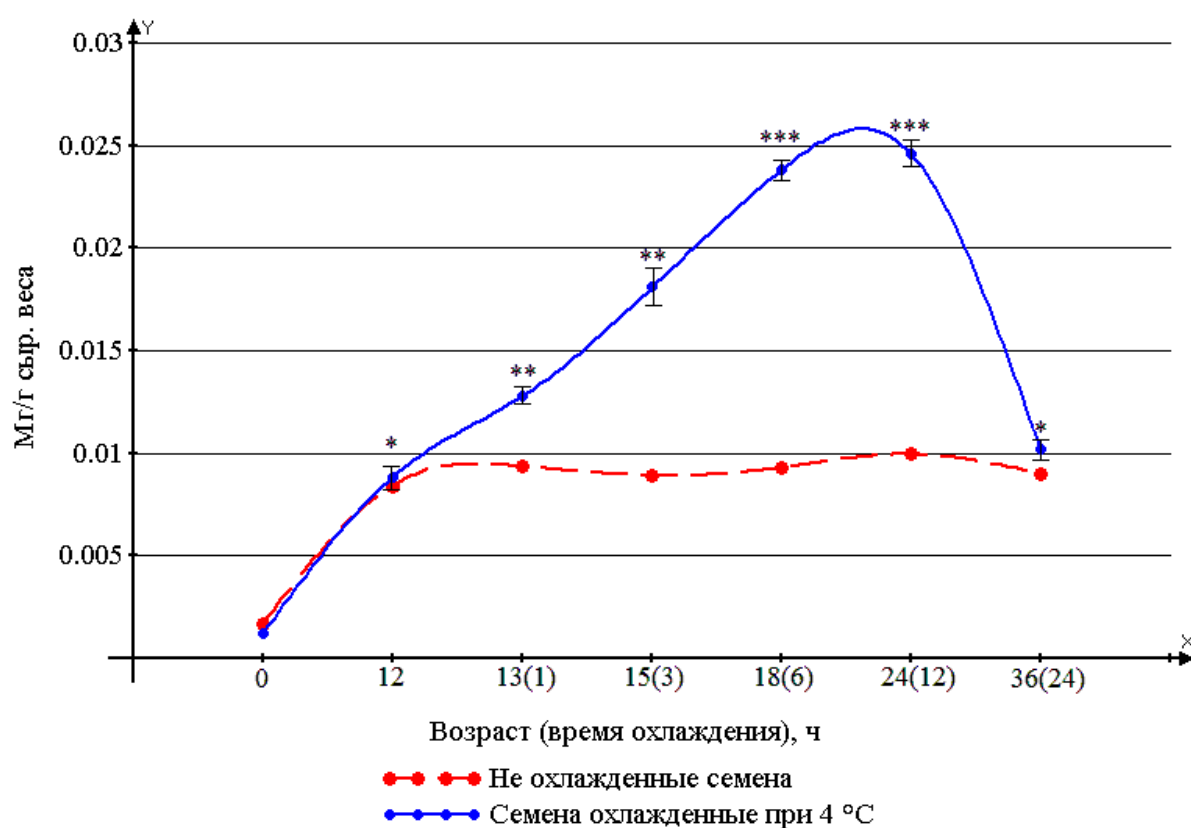


Рисунок 3. Содержание пролина в прорастающих семенах огурца при воздействии температуры в 4 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля; *** - $p \leq 0,001$ относительно контроля).

Это может свидетельствовать о повреждающем действии низких температур, а, следовательно, повышенном уровне синтеза и мобилизации данной иминокислоты. Как отмечалось ранее, пролин обладает протекторным действием, значит, повышение его концентрации будет способствовать адаптации к такому воздействию. Однако следует заметить, что концентрация пролина резко снижается к следующей временной отметке (возраст 36 часов, из них 24 – охлаждение) и достигает практически минимального значения. Так происходит вследствие того, что концентрация связанного пролина в эндосперме снижается до критической отметки и помимо этого клетки сами уже не могут синтезировать пролин. Это показывает, что семена, не пройдя фазу адаптации, переходят в фазу истощения. Дальнее помещение их в стандартные условия может вернуть их нормальную жизнедеятельность, а может и не вернуть, если дисфункция и разрушение клеточных структур в период охлаждения достигли критического значения. При помещении опытной группы растений в условия пониженных температур, однако, со значением, равным 0 °С, картина схожа с группой, охлаждаемой при 4 °С. Тем не менее, есть пара отличий. Если проанализировать рисунок 4, то в первую очередь можно заметить отличия не в концентрации пролина, а в динамике его накопления. Изменение концентрации так же происходит линейно, но своего пика, равного 0,0279 мг/г сырого веса, уровень пролина достигает у растений в возрасте 18-20 часов, 6 из которых семена были подвержены охлаждению. Это показывает, что при действии более сильного стрессора скорость мобилизации соединений, способных поддерживать гомеостаз клеток вырастает пропорционально силе воздействия.

Значение максимальной концентрации пролина, в данном случае немного выше, чем при 4 °С. Оно отличается всего лишь в 1,1 раза относительно группы, охлаждаемой при 4 °С. Тем не менее, можно заметить, что снижение концентрации после прохождения пика начинается намного

раньше (рисунок 5), а это свидетельствует об ограниченности ресурсов организма и более раннем переходе в фазу истощения.

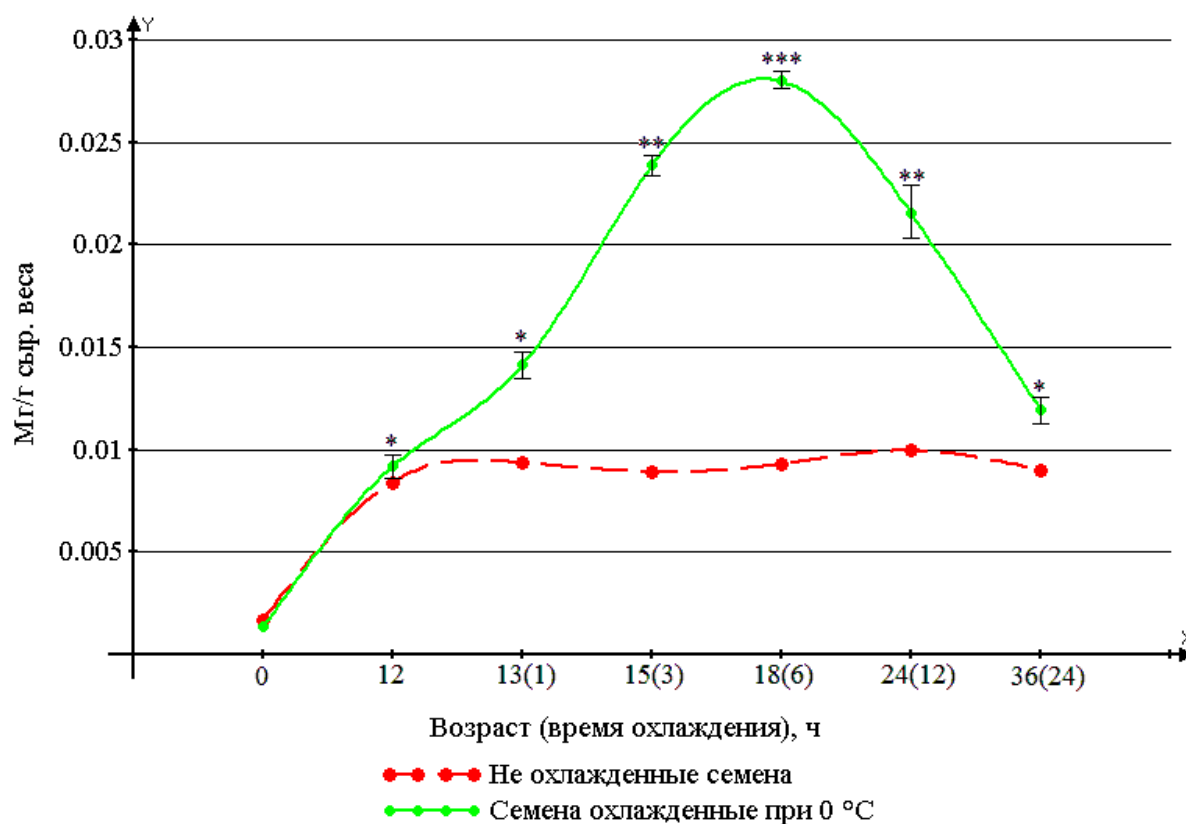


Рисунок 4. Содержание пролина в прорастающих семенах огурца при воздействии температуры в 0 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля; *** - $p \leq 0,001$ относительно контроля).

Четко проявляется зависимость, которая показывает, что если воздействие стрессора сильнее, то ресурсов на его преодоление необходимо больше и тратиться они будут быстрее, а значит и закончатся раньше. На рисунке 5 приведено сравнение концентрации пролина в семенах в исходных условиях и при воздействии низких положительных температур. Данный график доказывает сказанное ранее и показывает, что при увеличении силы стрессора, усиливается и ответная реакция организма. Однако сила воздействия, или длительное время нахождения в зоне этого воздействия

неблагоприятно сказываются на жизнеспособности растения. Для более успешной адаптации необходимо подобрать более умеренные условия для проведения эксперимента.

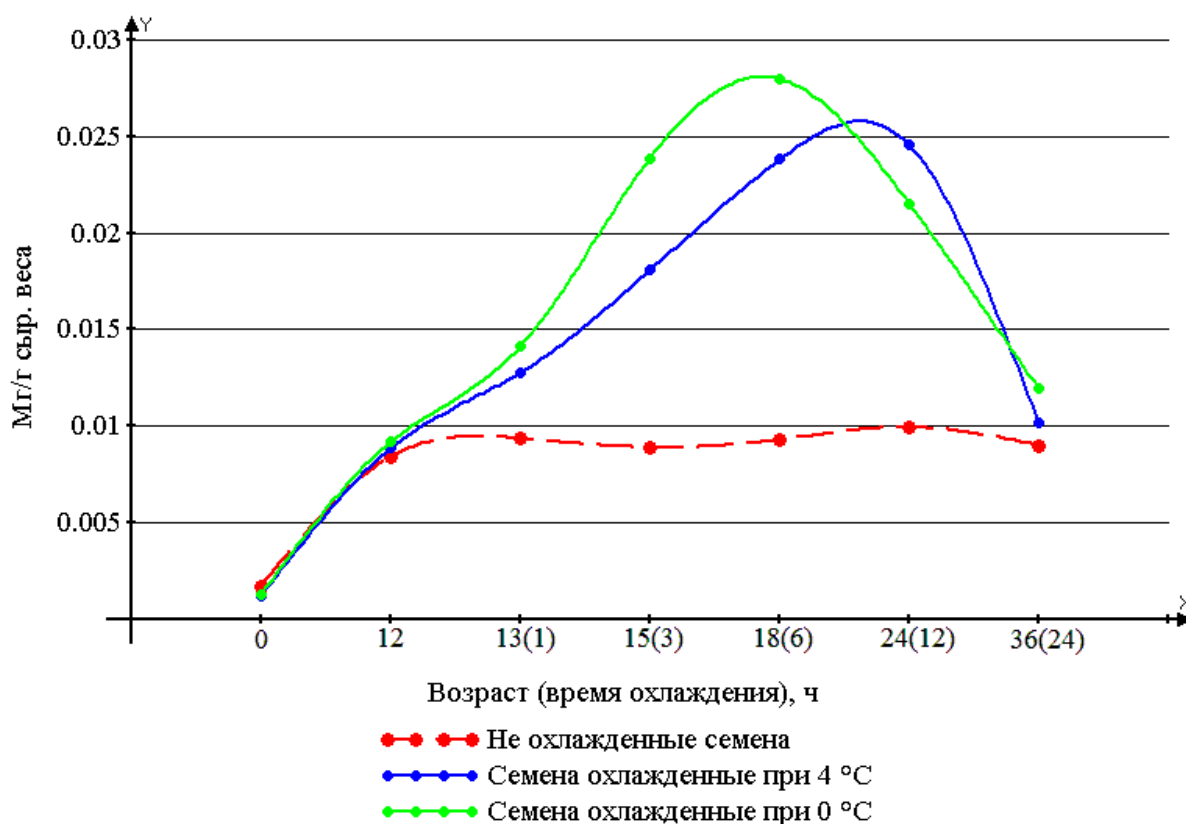


Рисунок 5. Содержание пролина в прорастающих семенах огурца при воздействии температуры в 4°С и 0°С.

Данные, полученные в этом эксперименте, свидетельствуют о том, что охлаждение прорастающих семян при температуре 4°С способствует повышению концентрации пролина в 2,5 раза, а при 0°С в 2,7 раза относительно контроля. Скорость накопления пролина так же отличается. Все это происходит в качестве ответной реакции на появление низкотемпературного и окислительного стресса. Допустимое время и степень действия неблагоприятного фактора смогут вызвать адаптацию растения к этому фактору.

Помимо определения концентрации пролина в прорастающих семенах были проведены исследования по изучению его содержания в листьях

растений. Для этого растения выращивали в течение 14 суток в лабораторных условиях. Поддерживалась оптимальная температура $-22-25^{\circ}\text{C}$, оптимальная влажность воздуха в 70-80%. Световой день составлял 12 часов и был точно установлен при помощи программируемого таймера. Интенсивность освещения составляла 5 клк. По достижении срока, растения разделялись на несколько групп, которые подвергались охлаждению разной длительности. В качестве контроля была исследована группа растений в те же временные промежутки, но без охлаждения, то есть, растения не переносились из исходных условий. Содержание пролина в листьях этой группы оказалось достаточно мало, и составило от 0,0003 до 0,0007 мг/г сырого веса. Такой низкий уровень данной аминокислоты опосредован постоянным ее использованием для различных функций клеток.

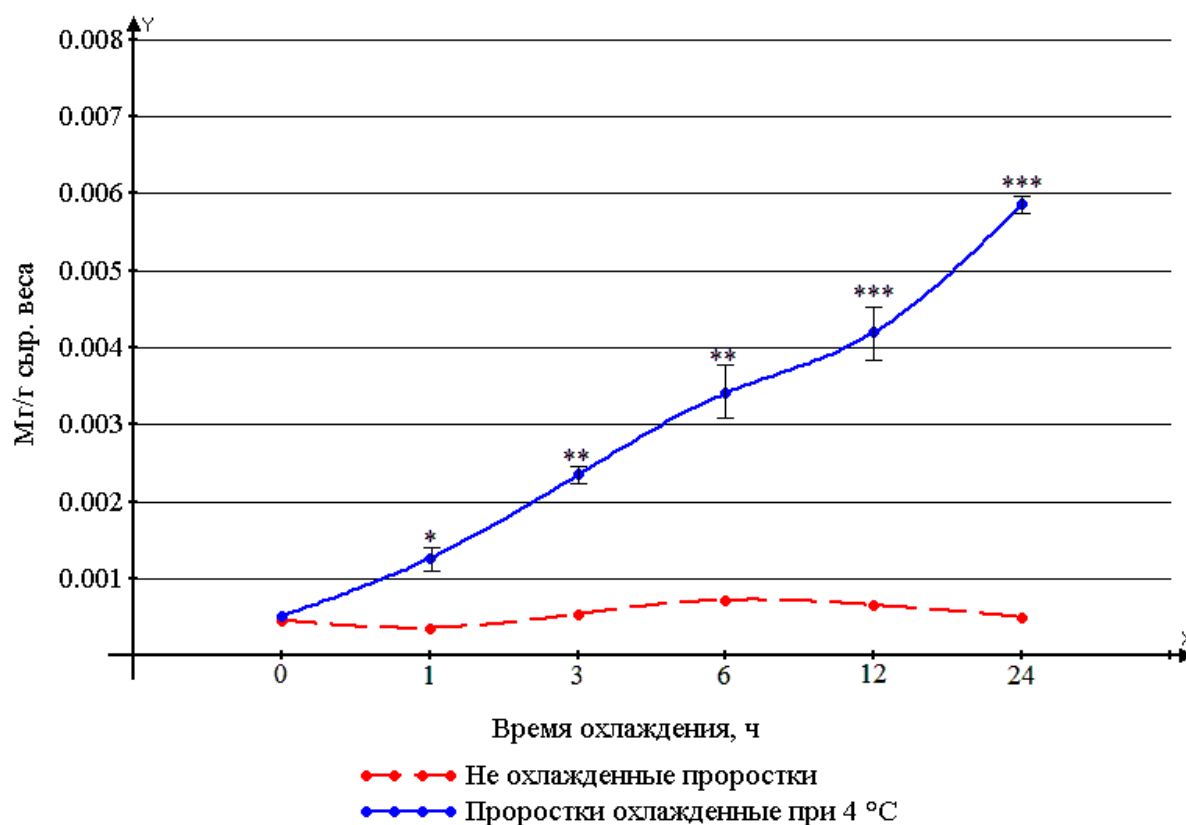


*Рисунок 6. Содержание пролина в листьях 14-ти дневных растений огурца при воздействии температуры в 4°C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля; *** - $p \leq 0,001$ относительно контроля).*

Колебания концентрации обусловлены потребностями клетки на разных уровнях жизнедеятельности. При переносе растений в низкотемпературные условия концентрация пролина начинает повышаться (рисунок 6). Уже через 1 час охлаждения концентрация пролина увеличивается практически в 3 раза относительно контроля и составляет 0,0012 мг/г сырого веса. Это показывает первую ответную реакцию на проявление низкотемпературного стресса. В ответ на обезвоживание и клеточную деформацию начинается обильный синтез пролина и его активация, путем вывода из связанного состояния. Его протекторные и осморегуляторные функции играют важную роль в первичном клеточном ответе. Из рисунка 6 видно, что увеличение происходит линейно, пропорционально времени нахождения в условиях охлаждения. Своего пика концентрация пролина достигает после 24 часов охлаждения. Она равна 0,0058 мг/г сырого веса.

Дальнейшая судьба растения, если бы оно осталось в таких условиях, неизвестна. Может произойти адаптация к низким температурам, а может наступить фаза истощения и вероятная гибель. Отсутствие снижения концентрации пролина при долгом охлаждении, как это было в сухих семенах (рисунок 3 и рисунок 4) вероятно обусловлено способностью полноценного растения к более быстрому синтезу необходимых соединений и поддержанию гомеостаза на уровне организма. Почва, в которой возможно содержание как неорганических, так и органических веществ, является источником промежуточных метаболитов, которые так же необходимы при протекании продолжительного стрессового синдрома. Изучение состояния растения в условиях дальнейшего охлаждения и возврата в исходные условия позволит более точно отобразить динамику содержания пролина, а так же сделать необходимые выводы.

Второй этап данного эксперимента предусматривал помещение другой опытной группы растений в условия более низкой температуры, равной 0°C. Динамика изменения концентрации пролина (рисунок 7) так же была

представлена условно линейно. Резких скачков не происходило, и концентрация была выше относительно контроля в 4, 7, 9, 12 и 15 раз после 1, 3, 6, 12 и 24 часов охлаждения соответственно. Своего пика, как и в предыдущем эксперименте, концентрация пролина достигает при охлаждении в течение 24 часов, и составляет 0,0066 мг/г сырого веса.

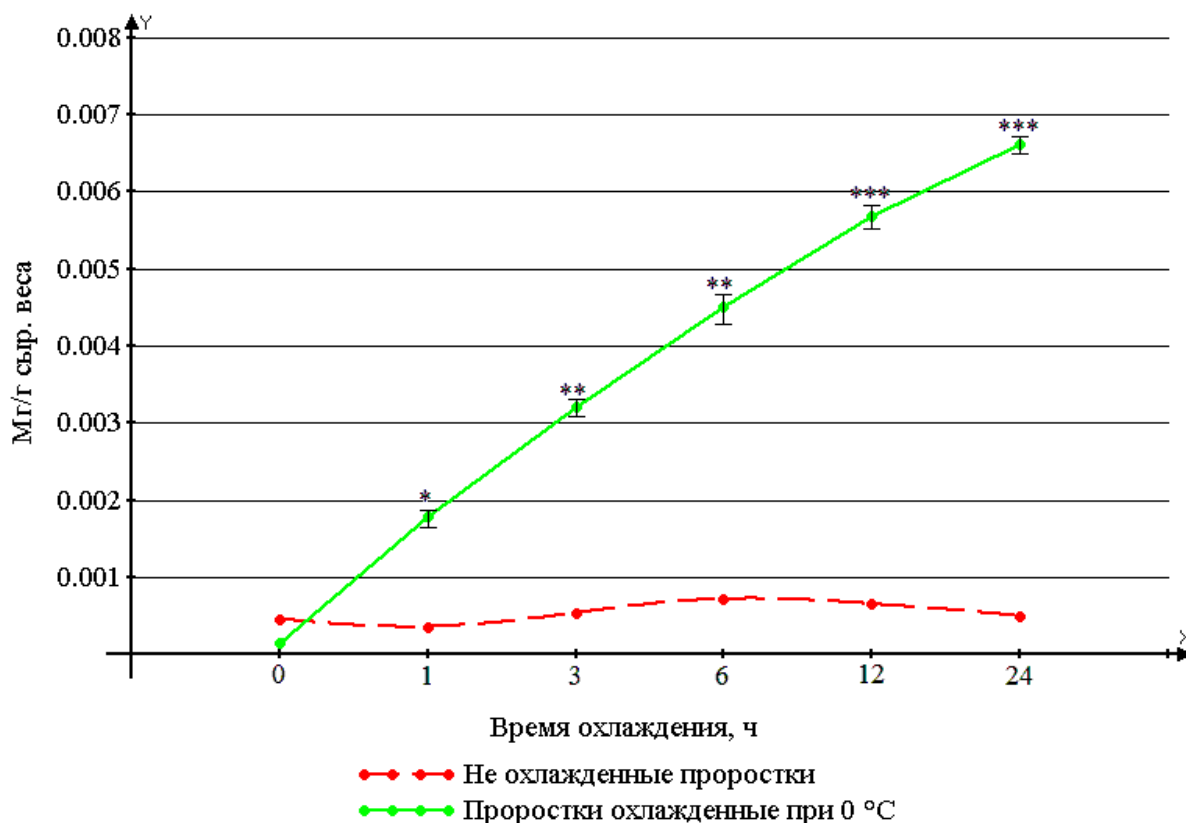


Рисунок 7. Содержание пролина в листьях 14-ти дневных растений огурца при воздействии температуры в 0 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля; *** - $p \leq 0,001$ относительно контроля).

Стоит заметить, что визуальное увеличение концентрации представлено линейно, хотя изменение контрольных временных точек происходит экспоненциально. За первый час охлаждения, в отметку между первыми двумя временными точками, концентрация повысилась с 0,0001 до 0,0017 мг/г сырого веса. Разница составила 0,0016 мг/г сырого веса. Между двумя последними временными точками концентрация изменилась с 0,0056 до

0,0066, то есть изменилась на 0,0010 мг/г сырого веса. Однако разница между первыми временными точками составляет 1 час, а между последними 12. Это свидетельствует о снижении скорости синтеза и мобилизации пролина с течением времени. Причем, это снижение прямо пропорционально времени охлаждения.

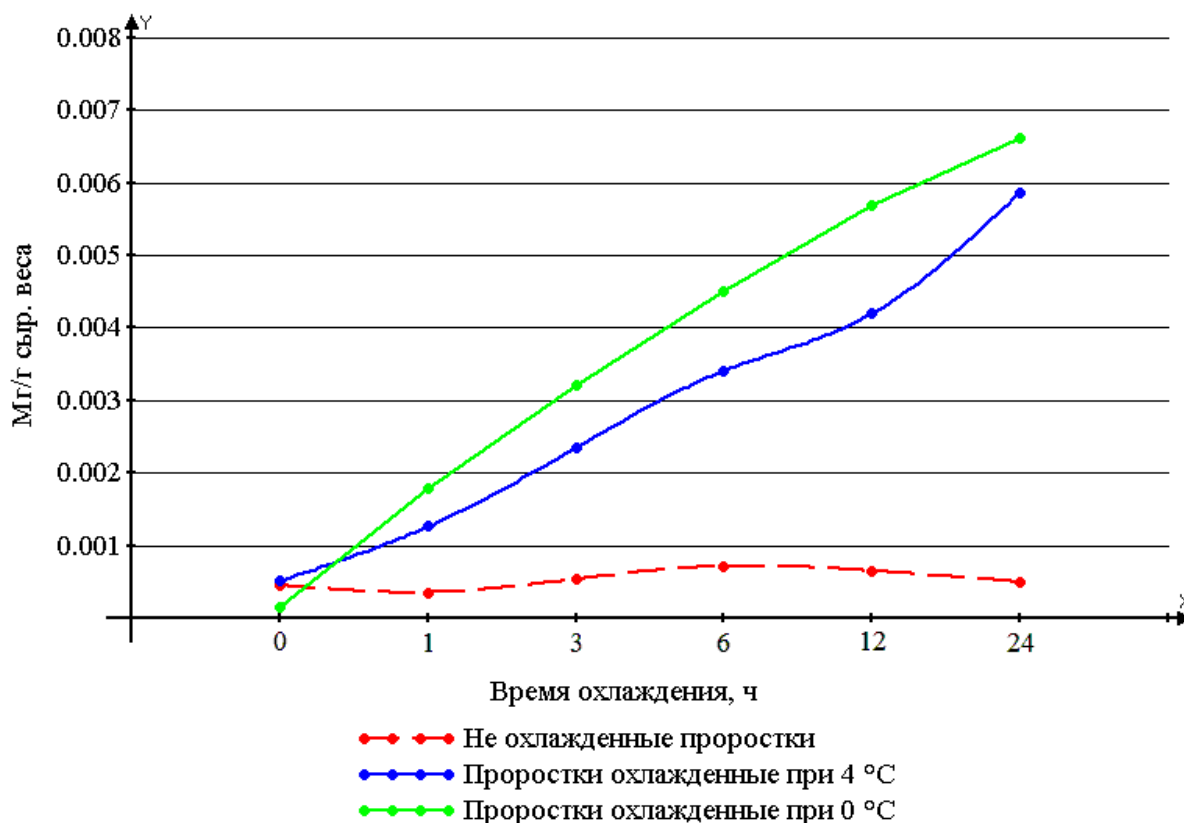


Рисунок 8. Содержание пролина в листьях 14-ти дневных растений огурца при воздействии температуры в 4°C и 0 °C

Если сравнить значения концентраций пролина в условиях охлаждения растений при 0 °C и при 4°C (рисунок 8), то ясно видно, что концентрация пролина достигает своего максимума при более низкой температуре, однако скорость его накопления различна. В случае 0°C, как говорилось ранее, скорость накопления пролина заметно снижается с течением времени. Более высокие значения концентрации в ранние временные промежутки свидетельствуют о том, что при температуре 0 °C иммобилизация и синтез пролина начинаются раньше, чем в случае охлаждения при температуре 4 °C

Следовательно, при менее агрессивной среде образование свободного пролина происходит рациональнее (отметки в 1, 3 и 6 часов), а скорость его синтеза в дальнейшем (12 и 24 часа) снижается меньше.

Это позволяет заключить о более слабом уровне воздействия стрессора и более равномерном распределении имеющихся в клетках растений. В таких условиях вероятность пройти фазу адаптации увеличивается.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что и прорастающие семена и формирующиеся растения, в ответ на низкотемпературный стресс увеличивают концентрацию свободного пролина, так как он обладает полезными защитными свойствами. Сравнительная характеристика показала, что более агрессивные условия среды требуют более сильного ответа. Шанс преодолеть действие вызванного таким образом стресса резко уменьшается. Менее агрессивные условия, в свою очередь, могут оказать на прорастающее растение полезное влияние, и способствовать активации приспособительных механизмов и появлению адаптации.

3.3 Определение активности полифенолоксидазы в семенах и проростках огурца

Как известно в ответ на развитие стресса, а, следовательно, и повышение уровня активных форм кислорода, запускается работа антиоксидантной системы. Как упоминалось ранее, она выполняет защитную функцию и старается минимизировать повреждения, вызываемые низкотемпературным воздействием. В результате действия АОС, повышается активность некоторых низко- и высокомолекулярных соединений. К ним относят и фермент полифенолоксидазу (ПФО). По изменению активности данного фермента, как и по концентрации пролина, можно судить о степени стрессового воздействия и адаптации к нему.

Опыты по исследованию активности ПФО показали следующие результаты. В первую очередь эксперимент проводился на семенах огурца,

предварительно замоченных в течение 12 часов. Как и предполагалось, самая низкая активность полифенолоксидазы была выявлена в контрольной пробе (рисунок 9), и составила от 37 до 42 Е/г сыр. веса*с. Данная проба не подвергалась охлаждению.

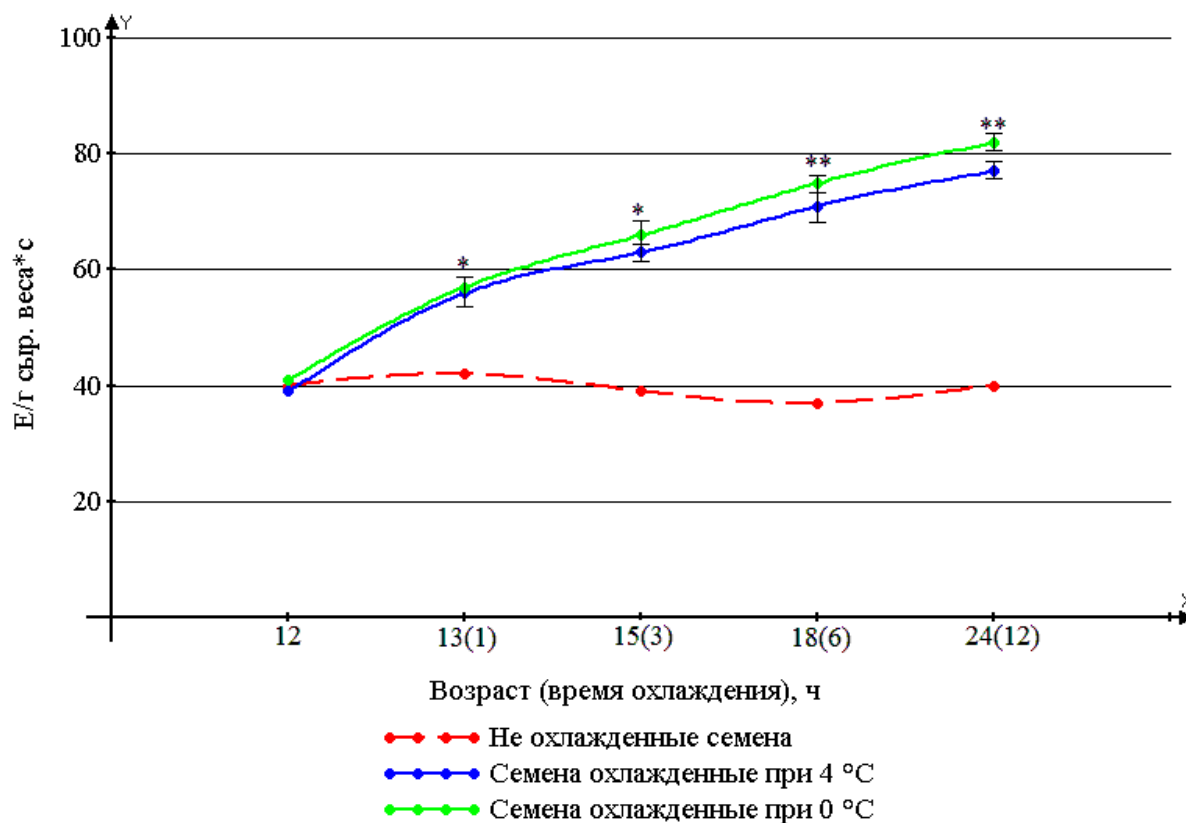


Рисунок 9. Активность полифенолоксидазы в прорастающих семенах огурца при воздействии температуры в 4°C и 0 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля).

За период проведения эксперимента, составляющий 12 часов, отклонение активности полифенолоксидазы не превысило 5 Е/г сыр. веса*с. Данное колебание обусловлено физиологическим изменением концентрации фермента. В процессе жизнедеятельности, даже в нормальных условиях может происходить увеличение или уменьшение содержания активных форм кислорода, следовательно, незначительное изменение концентрации в полной мере направлено на их нейтрализацию с целью поддержания клеточного

гомеостаза. Для более удобного подсчета можно использовать среднее значение, равное 39,5 Е/г сыр. веса*с.

Подавляющее количество данного фермента находится в инактивированном, связанном состоянии, если уровень активных форм кислорода не превышает норму. В случае возникновения окислительного стресса, повышается концентрация свободного фермента, а, следовательно, и его активность. В условиях охлаждения при 4 °С можно заметить значительное повышение активности данного фермента. После 1, 3, 6 и 12 часов охлаждения активность полифенолоксидазы увеличилась относительно контроля на 37%, 55%, 75% и 95% соответственно. Максимального значения активность ПФО достигает после 12 часов охлаждения. Ее уровень почти в 2 раза выше, чем в контрольной пробе. В случае охлаждения при температуре, равной 0 °С, полученные данные имеют схожий характер. Здесь увеличение активности относительно контроля составляет 38%, 62%, 83% и 105% после 1, 3, 6 и 12 часов охлаждения. Можно заметить, что отличие активности ПФО при 4°С и при 0 °С не превышает 10% на всем протяжении. Это может свидетельствовать о том, что незначительное отличие температуры оказывает малое влияние на скорость развития стрессового ответа. Возможно, в данном случае низкая температура является лишь инициатором работы антиоксидантной системы, и формально, почти не влияет на скорость накопления фермента и его активность. Стоит заметить, что увеличение активности происходит не скачкообразно, а линейно, пропорционально времени охлаждения, что может свидетельствовать о рациональном использовании ресурсов клетками, и, следовательно, хорошим приспособительном потенциале.

После проведения эксперимента на прорастающих семенах были проведены исследования на уже сформировавшихся, 14-ти дневных растениях огурца. После помещения двух опытных групп в условия охлаждения, активность полифенолоксидазы определялась в их листьях. Как и в предыдущем случае, самая низкая активность была в контрольной, не

охлажденной группе. Она варьировалась от 79 до 84 Е/г сыр. веса*с (рисунок 10). Тем менее, исходный уровень активности ПФО выше, чем в прорастающих семенах. Здесь нет ничего удивительного, так как для поддержания метаболизма в целом растении необходим больший уровень фермента.

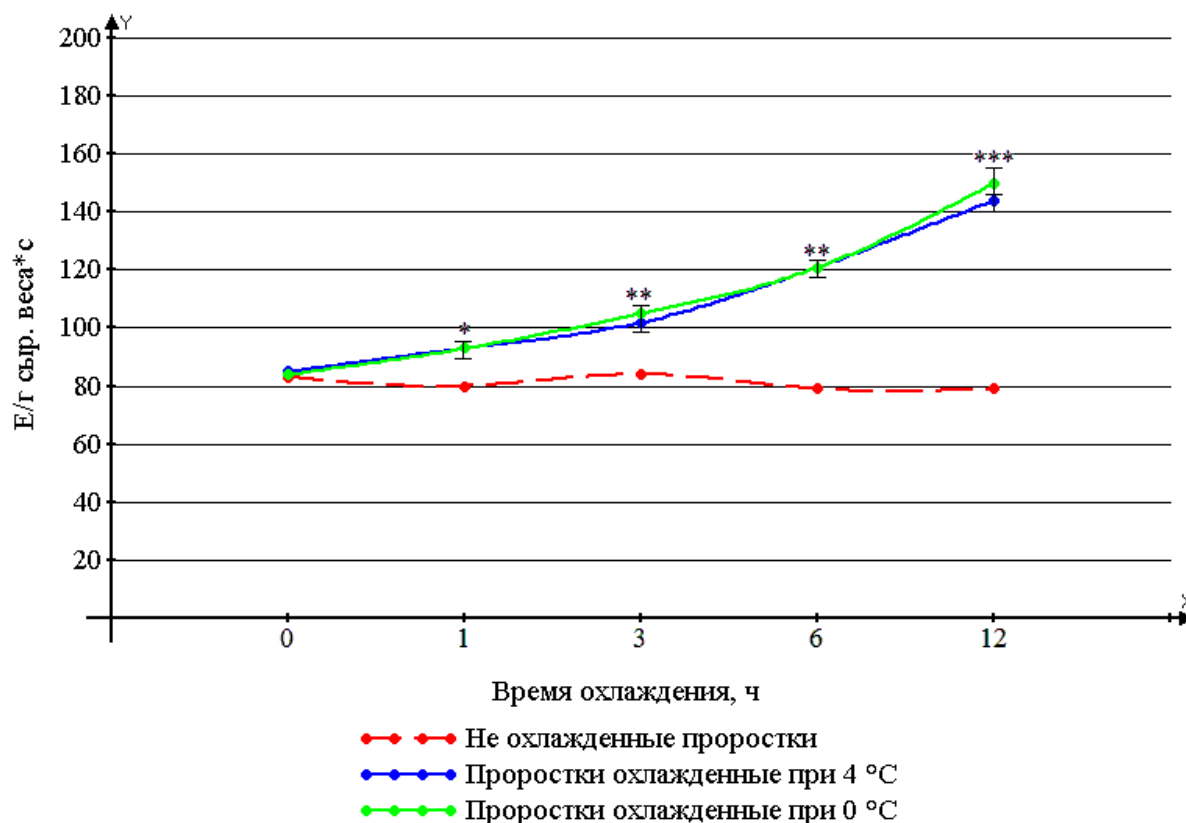


Рисунок 10. Активность полифенолоксидазы в листьях 14-ти дневных растений огурца при воздействии температуры в 4°C и 0 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля; *** - $p \leq 0,001$ относительно контроля).

Увеличение активности фермента в те же временные промежутки (1, 3, 6, 12 часов охлаждения при 4°C) происходило линейно, и составило 15%, 26%, 49% и 77% относительно контроля. Однако, в данном случае, разница активности двух групп растений (охлаждение при 4°C и при 0°C) не превышает 6%. Что может подтвердить нашу теорию, что стрессор лишь инициирует работу ферментов АОС, независимо от своей силы. Ключевым

фактором будет являться время воздействия этого стрессора. Стоит добавить, что данная теория справедлива только для конкретного эксперимента.

Однако существует предположение, что период охлаждения при 0°C недостаточен для интенсивного льдообразования. Следовательно, повреждающее действие может проявиться при более длительном охлаждении. Работа же антиоксидантной системы доказана полностью. Повышение концентрации ферментов-антиоксидантов благоприятно сказывается на преодолении стрессового состояния растения, появившегося на фоне естественного охлаждения.

Проведенные исследования подтвердили предположения о том, что антиоксидантная система напрямую связана с низкотемпературным стрессом. Ее активация при попадании растения в неблагоприятные условия свидетельствует о запуске защитных и адаптационных механизмов. Повышение уровня фермента полифенолоксидазы – следствие низкотемпературного воздействия, накопления активных форм кислорода и клеточных повреждений. Постоянный повышенный уровень полифенолоксидазы можно рассматривать как один из адаптационных механизмов.

3.4 Определение активности пероксидазы в семенах и проростках огурца

Пероксидаза является ферментом антиоксидантной системы и участвует в нейтрализации активных форм кислорода. В случае появления окислительного стресса активность этого фермента увеличивается. Проведенные эксперименты показывают что, как и в предыдущем опыте, при исследовании прорастающих семян, самая низкая активность фермента в контрольной группе. Активность незначительно меняется в районе от 26 до 32 Е/г сыр. веса*с (рисунок 11). Активность пероксидазы представлена линейно, и практически не меняется при достижении определенного

временного промежутка. Это показывает, что в стандартных условиях активность достигает определенной отметки, необходимой для поддержания клеточного гомеостаза и более не увеличивается. Следует так же заметить, что исходный уровень активности пероксидазы ниже, чем у ПФО. Это может свидетельствовать о приоритетности ферментов антиоксидантной системы. Полифенолоксидаза выполняет более обширный набор функций, а, следовательно, должна обладать большей активностью.

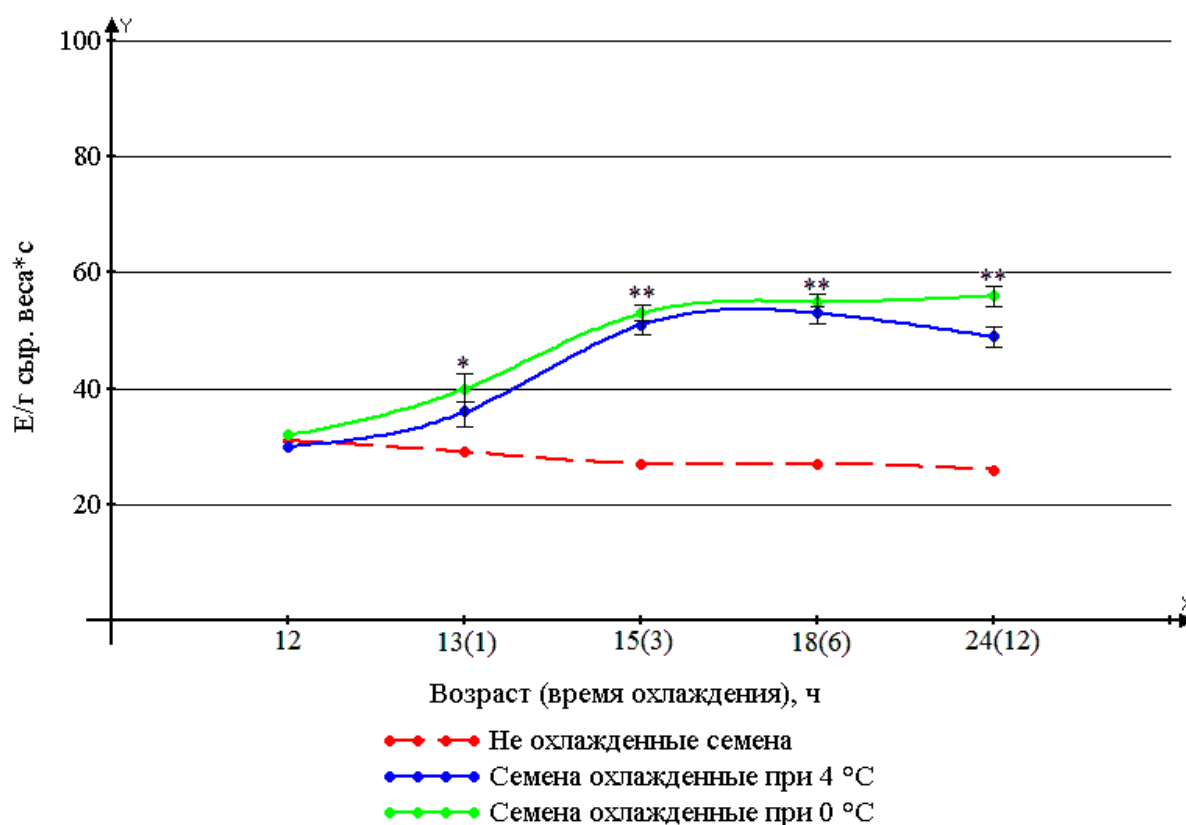


Рисунок 11. Активность пероксидазы в прорастающих семенах огурца при воздействии температуры в 4 °C и 0 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля; ** - $p \leq 0,01$ относительно контроля).

Динамика активности пероксидазы в семенах в условиях охлаждения при 4 °C представлена на рисунке 11. График отображает незначительное увеличение активности после 1 часа охлаждения. Она увеличилась на 24% относительно контроля, или в 1,24 раза и составила 36 Е/г сыр. веса*с. Более значительное увеличение активности произошло после 3 часов охлаждения.

Активность увеличилась почти в 2 раза относительно контроля и составила 51 Е/г сыр. веса*с. В дальнейшие временные промежутки увеличения активности пероксидазы не происходило. Вероятно, ее уровень достиг отметки, необходимой для эффективной нейтрализации активных форм кислорода, но при этом не создающей конкуренции другим ферментам и не оказывающей вредного воздействия на клетки. Активность пероксидазы при 0°C в прорастающих семенах почти совпадает с таковой при 4°C. Различие составляет максимум 5-6 Е/г сыр. веса*с, что так же доказывает, что незначительное увеличение силы раздражителя оказывает незначительное влияние на интенсивность работы антиоксидантной системы. Более значительное снижение температуры наверняка вызовет более сильный клеточный ответ, однако тогда речь уже будет идти не о холодостойкости, а морозоустойчивости, что не уместно в рамках данной работы.

В опыте, который проводился на второй опытной группе (14-ти дневные растения), были получены следующие результаты. На рисунке 12 представлены данные, отображающие изменение активности пероксидазы в контрольной группе и в условиях охлаждения при 4 °С и при 0°C. Активность фермента в контрольной группе колеблется в допустимых рамках от 50 до 55 Е/г сыр. веса*с. Как уже говорилось ранее, это необходимый для жизнедеятельности уровень. Если сравнить данные значения со значениями, полученными в опытных группах, то можно увидеть, что активность повысилась на 18%, 14%, 18% и 24% относительно контроля после 1, 3, 6 и 12 часов охлаждения соответственно. Данные полученные при 4°C и при 0°C практически не отличаются по значениям, поэтому этими данными можно пренебречь. Изменение активности представлено условно линейно и не увеличивается со временем. Колебания активности происходит в диапазоне от 61 до 66 Е/г сыр. веса*с. Такие данные, как и в случае с сухими семенами, позволяет узнать максимально возможный необходимый уровень активности пероксидазы в конкретных условиях. Такое значение обусловлено эффективной работой

антиоксидантной системы и отсутствием самоповреждающего действия фермента.

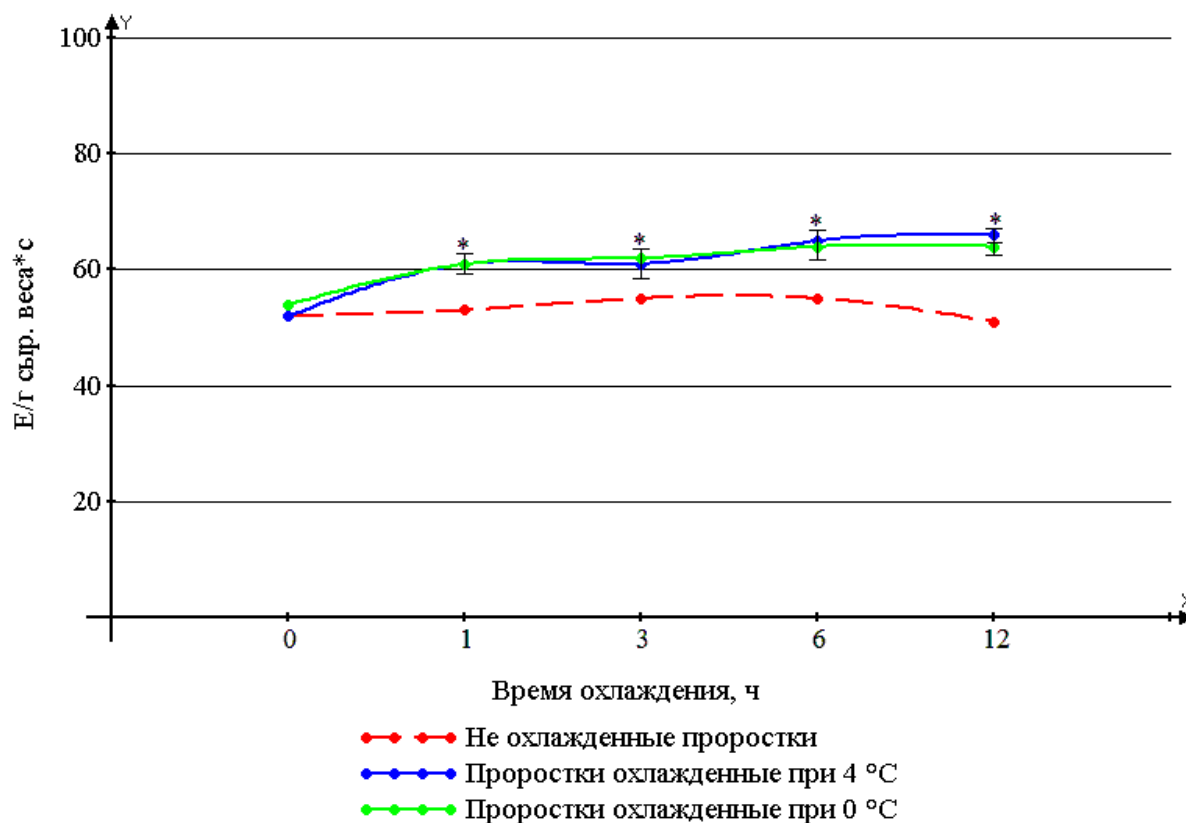


Рисунок 12. Активность пероксидазы в листьях 14-ти дневных растений огурца при воздействии температуры в 4°C и 0 °C ($M \pm m$, $n=3$; * - $p \leq 0,05$ относительно контроля).

Если суммарно рассматривать результаты, полученные в данном эксперименте, то можно заключить что в случае попадания растения в неблагоприятные условия, а в нашем случае в низкие положительные температуры, активность пероксидазы увеличивается. Это связано с усилением работы антиоксидантной системы для нейтрализации активных форм кислорода. Увеличение активности происходит до определенного уровня и останавливается, тем самым предотвращая вредный переизбыток фермента. Значения, полученные при 4 °C и при 0°C, имеют незначительные различия, не превышающие 5-10%. Это может быть признаком универсальности и многофункциональности антиоксидантной системы.

Следовательно, проявление ответа при возникновении стресса в данных условиях незначительно зависит от силы стрессора и времени его воздействия. Важно указать, что полученные данные справедливы к конкретному сорту огурца и времени охлаждения. Возможно, относительно небольшой 12-ти часовой период охлаждения, в совокупности с уже имеющейся у растений резистентностью, будет препятствовать льдообразованию в клетках и межклетниках. И хоть исходный уровень резистентности холоду очень мал, но все равно достаточен для поддержания необходимой концентрации клеточного сока и оттока воды. Дальнейшее незначительное увеличение температуры уже может иметь критические необратимые, если не летальные, последствия. При разработке мер закаливания и развития низкотемпературной толерантности следует учитывать все эти параметры. Тем не менее, могут встречаться частные случаи, дальнейшее исследование которых поможет изучить все аспекты работы АОС и соединений-криопротекторов в условиях низкотемпературного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что не существует идеальных условий прорастания, поэтому на растения постоянно оказывается неблагоприятное воздействие. И хоть оно может оказываться в незначительной мере, биохимические изменения, вызываемые этим воздействием, могут существенно повлиять на процессы роста и развития. Чаще всего конформационным перестройкам подвергается содержащийся в клетках молекулярный кислород.

Активные формы кислорода появляются в организме растений огурца постоянно и выполняют ряд регуляторных функций. В основном это окисление некоторых соединений, передача сигналов и инициация апоптоза. Однако их высокая реакционная способность может оказать и вредное воздействие, выражающееся в окислении случайных веществ и вызывающее окислительный стресс. Избыток активных форм кислорода способен оказать необратимые повреждения.

Окислительный стресс часто развивается на фоне низкотемпературного, то есть при попадании растения в неблагоприятные условия, концентрация АФК значительно повышается. В ответ на повышение иницируется работа антиоксидантной системы, направленной на уменьшение концентрации активных форм кислорода и их эффективную нейтрализацию. В организме значительно повышается содержание иминокислоты пролина, который обладает осморегуляторными функциями и препятствует оттоку воды из клеток. Так же повышается активность некоторых ферментов, таких как полифеноксидаза, каталаза и пероксидаза. Их действие направлено на нейтрализацию и восстановление супероксидного радикала, перекиси и других АФК.

Повышение содержания низко- и высокомолекулярных компонентов антиоксидантной системы способствует сохранению гомеостаза в условиях низкотемпературного влияния. Предпосевное низкотемпературное воздействие может способствовать предварительной выработке

адаптационных механизмов к подобным условиям. Следствием этого будет повышенная резистентность к низким положительным температурам и теоретическое сохранение имеющейся урожайности.

В ходе работы были получены следующие выводы:

1. В ответ на низкие температуры начинается накопление такой аминокислоты как пролин. Это связано с его защитными и осморегуляторными функциями. При низкотемпературном воздействии его уровень может повыситься в 2,5-3 раза относительно контроля в семенах и в 10-15 раз относительно контроля в формирующихся растениях. Накопление пролина направлено на поддержание гомеостаза клеток и устранение повреждений. Однако при длительном охлаждении (24 часа и более) организм уже не способен поддерживать достаточный уровень аминокислоты, что может повлечь за собой необратимые повреждения, а возможно и гибель

2. Изучение изменения активности полифенолоксидазы показало, что при длительном низкотемпературном воздействии, активность фермента увеличивается. При максимальном длительном охлаждении это увеличение может составить до 100%, то есть в 2 раза относительно контрольной группы. В среднем оно достигает от 15% до 70% относительно контроля. Эти данные могут свидетельствовать о том, что повышение активности ПФО – один из вариантов адаптации к более высокому уровню активных форм кислорода, как следствию воздействия низких температур.

3. Изучение активности пероксидазы показало, что в условиях охлаждения ее уровень может повышаться, по сравнению с неохлажденными растениями, на 20-25% в семенах и до 90% в листьях. Однако при достижении определенного значения активность фермента перестает нарастать. Увеличенный, относительно контроля, уровень активности пероксидазы можно рассматривать, как способность противодействовать проявлению окислительного стресса на фоне низкотемпературного.

4. Возникновение окислительного стресса, вызывающее резкое повышение содержания активных форм кислорода, проявляется после переноса организма в неблагоприятные условия, в нашем случае, в условия пониженных температур. Можно заключить, что инициация возникновения окислительного стресса происходит под влиянием низкотемпературного стресса, то есть они связаны. Повышение содержания АФК – прямое следствие охлаждения.

5. На фоне возникновения низкотемпературного стресса в организме растений запускается комплекс приспособительных мер, который выражается в увеличении активности ферментов антиоксидантной системы, а так же в иммобилизации и синтезе различных низкомолекулярных соединений. Возможность организма приспособиться и пережить данное воздействие может способствовать появлению резистентности и увеличенному синтезу соединений-криопротекторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов А. А. Активные формы кислорода и иммунитет растений // Успехи современной биологии. 1991. Т.111. №5. С.722-737.
2. Асамов Д. К., Рахимова С. Т. К методике определения активности аскорбатоксидазы, полифенолоксидазы и пероксидазы // Актуальные вопросы физиологии, биохимии и биотехнологии. Ташкент: Изд-во ТГУ. 1991. С.122-126.
3. Байрамбеков А. А. Влияние обработки регулятора роста циркон на урожайность различных культур // Естественные науки. 2009. Т.29. №4. С.137-142.
4. Барабой В. А., Брехман И. И., Голотин В. Г. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
5. Болдырев М. И. Действие стрессовых факторов на растения // Журнал Защита и карантин растений. 2008. №4. С.14-15.
6. Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. 1951. Т.16 С.352-355.
7. Бояркин А. Н. Быстрый метод определения активности полифенолоксидазы // Тр. Ин-та физиологии растений. 1954. Т.8. №2. С.398-403.
8. Вахитов В. А. Способ повышения урожайности сельскохозяйственных растений // Агрономия и лесное хозяйство 1997. Т.45. №2. С.30-32.
9. Веселова Т. В. Стресс у растений (Биофизический подход). Биохимия, 1993. С.144.
10. Воскресенская О. Л., Половникова М. Г. Изменение активности окислительно-восстановительных ферментов в процессе онтогенеза травянистых растений // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2008. №1. С.96-102.

11. Газарян И. Г. Особенности структуры и механизм действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. 2006. Т.46. С.303-322.
12. Гарифзянов А. Р. Образование и физиологические роли АФК в клетках растений // Тульский государственный педагогический университет имени Толстого. 2008. №6. С.115-125.
13. Грибова Н. Ю. Антиоксидантная активность фенольных фракций экстрактов лекарственных растений // Вестник Донецкого университета. 2008. Т.10. №1. С.137-140.
14. Гуськов, Е.Н. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при оксидативном стрессе // Успехи современной биологии. 1993. Т.113. В.4. С.456-470.
15. Демидчик В. В. Оксидативный стресс и ионные каналы растений // Труды БГУ. 2013. Т.3. №2.
16. Дроздов С. Н., Будыкина З.Ф., Курец В.К. Экологофизиологические аспекты устойчивости растений к заморозкам // Л.: Наука. 1977. 228 с.
17. Егоров Ц. А. Защитные пептиды иммунитета растений // Биоорганическая химия. 2012. Т.38. №1. С.7-17.
18. Жученко А. А. Адаптивная система селекции растений (экологогенетические основы). М.: Изд-во РУДН, 2001. 780 с.
19. Карасев В. Н. Физиология растений. Йошкар-Ола, 2001. 272 с.
20. Климов, С.В. Пути адаптации растений к низким температурам / С.В. Климов Успехи соврем. Биологии, 2001. Т.121.– №1. С.3-22.
21. Колупаев Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестник Харьковского Национального Аграрного Университета. 2007. Т.3. №12. С.6-26.
22. Кузнецов В. В. Общие системы устойчивости и трансдукции стрессорного сигнала при адаптации растений к абиотическим факторам // Вестник Нижегородского университета имени Лобачевского. 2001. С.64-68.

23. Лукаткин А. С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Повреждение клеточных мембран при охлаждении теплолюбивых растений // Физиология растений. 2003. Т.50. С.271-274.
24. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во СПб. Ун-та, 2003. 227 с.
25. Масленников П. В. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в лекарственных растениях Калининградской области // Химия растительного сырья. 2010. №3. С.127-133.
26. Минеев В. Г., Ниловская Н. Т. Агрохимические и физиологические аспекты потенциальной продуктивности растений // С.-х. биология. 1981. Т.16. № 5. С.712-718.
27. Минибаева Ф. В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т.50. С. 459-464.
28. Павловская Н. Е. Активные формы кислорода и апоптоз у пшеницы и гороха // Сельскохозяйственная биология. 2010. №1. С.51-55.
29. Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007. 140 с.
30. Полесская О. Г., Каширина Е. И., Алехина Н. Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т.51. С.686-691.
31. Половникова М. Г. Воскресенская О. Л. Изменение активности компонентов системы антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений на разных этапах онтогенеза в условиях городской среды // Физиология растений. 2008. Т.55. №5. С.777-785.
32. Попов В. Н. Перекисное окисление липидов при низкотемпературной адаптации листьев и корней теплолюбивых растений табака // Физиология растений. 2010. Т.57. С.153-157.

33. Пятыгин С. С. Стресс у растений: физиологический подход // Журнал общей биологии. 2008. №4. С.294-298.
34. Селье Г. На уровне целого организма. М.: Наука, 1972. 121 с.
35. Скулачев В. П. Возможная роль активных форм кислорода в защите от вирусных инфекций // Биохимия. 1998. Т.63. С.1691-1694.
36. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
37. Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.
38. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 350 с.
39. Физиология растений: учебник для студ. вузов. Под ред. И.П. Ермакова. М.: Издательский центр "Академия", 2005 или 2007.
40. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб:Изд-во СПб ун-та, 2002. 244с.
41. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Издательство «Гилем» УФА, 2001. С.60-75.
42. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Rev. Plant Biol. 2004. V.55. P.373-399.
43. Aroca R., Irigoyen J. J., Sanchez-Diaz M. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling sensitivity // Plant Science. 2001. V.161. P.719-726.
44. Ashworth E. N., Pearce R. S. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species // Planta. 2002. V.214. P.798-805.
45. Brand M. D. Mitochondrial superoxide production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // Free Radical Biology & Medicine. 2004. V.37. №6. P.755-767.

46. Dat J. F., Vandenabeele S. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Life Sci.* 2000. V.57. P.779-795.
47. Foyer C. H. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context // *Plant, Cell and Environment.* 2005. V.28. P.1056-1071.
48. Gerrit van Meer, Dennis R., Voelker W. Membrane lipids: where they are and how they behave // *Nat Rev Mo I Cell Biol.* 2008. V.9. №2. P.112-124.
49. Hernandez J. Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria // *Plant Physiol.* 1993. V.89. P.103-110.
50. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance // *Plant Biol.* 2002. V.53. P.225-24.
51. Kawano T. Role of reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // *Plant cell Rep.* 2003. V.21. P.829-837.
52. Lee S. H., Singh A. P., Chung G. C. Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport // *J.Exp. Bot.* 2004. V.55. P.1733-1741.
53. Ma Y., Zhang Y., Sliao H. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress // *African Journal of Biotechnology.* 2009. V.8. №10. P.2004-2010.
54. Meloni D. A., Oliva M. A. Photosynthesis and Activity of Superoxide Dismutase, Peroxidase and Glutathione Reductase in Cotton under Salt Stress // *Environ. Exp. Bot.* 2003. V.49. P.69-76.
55. Mittler R. Oxidative Stress, Antioxidants, and Stress Tolerance // *Trends Sci.* 2002. V.7. P.405-409.
56. Nobuhiro S., Ron M. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plantarum.* 2006. V.126. P.45-51.

57. Richard G. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members // *Plant Mol. Biol.* 2001. V.47. P.607-620.
58. Scandalios J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* 2005. V.38. №7. P.995-1014.
59. Slooten L. Overproduction of *Arabidopsis thaliana* Fe-SOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize // *Plant Cell Physiol.* 1999. V.40. P.515-523.
60. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plantarum.* 2006. V.126. P.45-51.
61. Triantaphylides C., Krischke M., Hoeberichts F. A. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants // *Plant Physiol.* 2008. V.148. P.960-968.
62. Upchurch R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress // *Biotechnol Lett.* 2008. V.30. P.967-977.
63. Van Breusegem F., Vranova E., Inze D. The Role of Active Oxigenspecies in Plant Signal Transduction // *Plant Sci.* 2001. V.161. P.405-414.
64. Van den Ende W., Valium R. Sucrose, sucrosyloligosaccharides and oxidative stress: scavenging and salvaging? // *Journal of Experimental Botany.* 2009. V.60. P.918.
65. Vega S. E., Bamberg J. B., Palta J. P. Evidence for the upregulation of stearoyl-ACP (A9) desaturase gene expression during cold acclimation // *J Potato Res.* 2004. V.81. P.125-135.
66. Wang S. Y., Lin H. S. Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) // *Scientia horticulturae.* 2006. V.108. №1. P.35-42.

67. Zhou R., Zhao H. Seasonal pattern of antioxidant enzyme system in the roots of perennial forage grasses grown in alpine habitat, related to freezing tolerance // *Physiol. Plant.* 2004. V.121. №3. P.399-408.

68. Zubini P., Baraldi E. Oxidative stress in chilling injury during cold storage of aubergine // *J. Plant Pathol.* 2003. V.4. P.300-307.