

УДК 581.1:632.122.1

Л. А. Чудинова, Р. В. Кайгородов, В. В. Пархоменко, А. В. Ощепкова

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕПЛООВОГО И ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ

Исследовалось влияние холодового (10°C, 1 сут.) и теплового (30°C, 1 сут.) закаливания на адаптацию проростков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта «Астра» к последующей гипертермии (40°C, 7 сут.). В растениях через 12 ч. (стадия стресс-реакции адаптации) и 72 ч. (стадия специализированной адаптации) после окончания указанных обработок определяли ростовые параметры и содержание алифатических карбоновых кислот (шавелевой, лимонной и fumarовой) методом обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиентном режиме элюирования. Полученные результаты подтверждают участие органических кислот в механизме закаливания растений к действию последующей гипертермии. При этом вклад каждой кислоты в процесс закаливания и защитный ответ на действие повреждающей температуры неравнозначен и, возможно, приурочен к различным стадиям адаптационного процесса.

**Ключевые слова:** органические кислоты; холодовое и тепловое закаливание; гипертермия; перекрестная адаптация; горох.

L. A. Chudinova, R. V. Kaygorodov, V. V. Parkhomenko, A. V. Oshchepkova

Perm State University, Perm, Russian Federation

## DYNAMIC OF ORGANIC ACIDS IN PEA SEEDLINGS UNDER HUPERThERThIA DEPENDING ON HEAT AND COLD HARDENING

The investigations of organic acids metabolism in plants are important for understanding of interrelation between carbohydrate and nitrogen metabolisms. The role of aliphatic acids for resistance to temperature influence and hardening of plants is insufficiently investigated. In this study were cold-acclimatisation (10°C, 1 day) and heat-acclimatisation (30°C, 1 day) of pea seedlings added by hyperthermia (40°C, 1 week) defined. In plant at different stages of acclimatisation were growth and concentration of aliphatic carbon acids determined. Aliphatic carbon acids (oxalate, citrate and fumarate) were using high performance liquid chromatography with UV-detections and gradient elution determined. Our results show that aliphatic acids participate in heat-acclimatisation and especially cold-acclimatisation to hyperthermia. The value of aliphatic acids in process of acclimatisation and protection from heating depends from stages of adaptation and plant species.

**Key words:** organic acids; cold and heat hardening; hyperthermia; cross-adaptation; pea seedlings.

### Введение

Явление закаливания растений известно давно, однако до сих пор его молекулярно-биохимические механизмы остаются до конца не выясненными. Установлено, что в процессе теплового закаливания изменяется гормональный баланс растения, происходит торможение ростовых процессов, возрастает количество ненасыщенных жирных кислот, идет синтез стрессовых белков и низкомолекулярных протекторов (пролина, полиаминов, веществ фенольной природы, органических кислот,

каротиноидов и др), включаются защитные механизмы [Шакирова, 2001; Чиркова, 2002; Титов, Таланова, 2009].

Имеются данные о том, что холодовое закаливание наряду с повышением холодоустойчивости повышает и теплоустойчивость ряда видов растений [Балагурова и др., 2001; Трунова, 2007]. Авторы предполагают, что гипотермия также индуцирует запуск защитных систем, обеспечивающий повышение жароустойчивости растений.

Сложилось мнение, что тепловое и холодовое закаливание представляет собой сложный много-

компонентный кооперативный процесс, в который вовлечены как специфические, так и неспецифические изменения. Причем, если специфические реакции, вероятно, представлены относительно узкой группой физиолого-биохимических изменений, детерминированных генетически (синтез изоферментов), то спектр неспецифических изменений гораздо более широк, и значительная часть их происходит на посттранскрипционном уровне [Шакирова, 2001; Титов, Таланова, 2009].

Неспецифические реакции, очевидно, включаются на самых ранних этапах адаптации. Затем их дополняют, а в дальнейшем в значительной степени замещают более специфические реакции.

Соотносительная же роль указанных реакций в процессе адаптации не является постоянной и зависит от многих факторов и обстоятельств (видовых особенностей, вида стрессора, интенсивности воздействий и др.) Именно сочетание общих (неспецифических) и специфических реакций обеспечивает возможность достаточно эффективного теплового или холодового закаливания растений к последующему действию неблагоприятных факторов внешней среды [Титов, Таланова, 2009].

В литературе имеются указания на участие органических кислот в механизмах адаптации. Так, некоторые авторы отметили изменение содержания некоторых органических кислот у галофитов и ряда гликофитов при засолении [Строгонов и др., 1970]. Изучение обмена органических кислот у растений в условиях стресса представляет интерес с точки зрения связующего звена между углеводным и азотным обменом. Однако оценка значимости обмена органических кислот для формирования устойчивости к температурным воздействиям фактически не проводилась.

В связи с вышеизложенным, цель нашей работы – изучение влияния теплового и холодового закаливания на содержание некоторых органических кислот в проростках гороха в процессе их адаптации к последующей гипертермии.

### Объекты и методы исследования

Проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта «Альфа» выращивали в течение 15 сут. в климатической камере ШН-М на вермикулите при температуре 22°C, влажности 80–85% и освещенности люминесцентными лампами 18 ч в сутки (1 вариант – контроль). Затем часть проростков (опытные варианты) подвергали температурному воздействию по следующей схеме: 2-й вариант – гипертермия (40°C, 7 сут.); 3-й вариант – тепловое закаливание (30°C, 1 сут.), затем гипертермия (40°C, 6 сут.); 4-й вариант – холодовое закаливание (10°C, 1 сут.), затем гипертермия (40°C, 7 сут.).

Режимы тепловой и холодовой обработки были выбраны на основании данных литературы [Титов, Таланова, 2009; Чудинова, Суворов, 2011].

Для анализа брали растения через 12 ч. (стадия стресс-реакции адаптации) и 72 ч. (стадия адаптации) после окончания всех обработок.

Анализировали прирост проростков за 7 сут. В побегах, фиксированных паром (5 мин.) и досушенных до воздушно-сухого состояния, определяли содержание щавелевой, лимонной, фумаровой кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Ultimate 3000 (Dionex, Германия) при 210 нм. Тип хроматографической колонки – Acclaim® C18; 3 мкм; 120 Å 2.1×210 мм. В качестве подвижной фазы использовались элюэнты: ацетонитрил (ОСЧ для ВЭЖХ) и фосфатный буфер (25 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> с рН 3.6). Градуировка прибора проводилась по государственным стандартным образцам (ГСО) карбоновых кислот с чистотой не менее 98% [Руководство по методам..., 2004]. Повторность биохимических анализов – 3-кратная.

Результаты обрабатывали статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Рассчитывали среднюю арифметическую величину, ошибку средней арифметической, достоверность различий между вариантами по критерию Стьюдента ( $p \leq 0.05$ ).

### Результаты и их обсуждение

Важным показателем устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов является изменение их роста.

Нами была проанализирована величина прироста проростков гороха за 7 сут. эксперимента (рис. 1). Было установлено, что предварительное тепловое и особенно холодовое закаливание снижает рост ингибирующий эффект гипертермии.

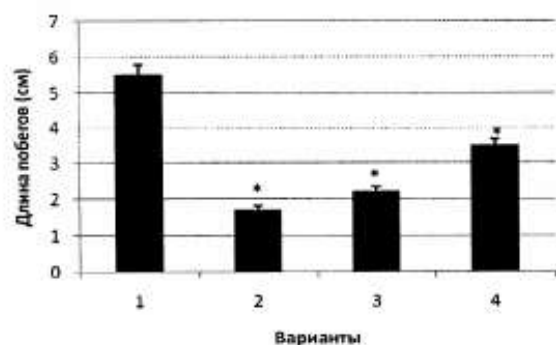


Рис. 1. Динамика прироста проростков гороха за 7 сут.:

1 – вариант – контроль (23°C, 7 сут.); 2 – вариант – гипертермия (40°C, 7 сут.); 3 – вариант – тепловое закаливание и последующая гипертермия (последовательно 30°C, 1 сут. и 40°C, 6 сут.); 4 – вариант – холодовое закаливание и последующая гипертермия (последовательно 10°C, 1 сут. и 40°C, 6 сут.); \* различия между вариантами достоверны по критерию Стьюдента ( $p \leq 0.05$ )

Известно, что при закаливании реализуются разные физиологические программы [Титов, Таланова, 2009]. При физиологически нормальных температурах осуществляется ростовая и онтогенетическая программа. Низкие и высокие закалывающие температуры вызывают своеобразное «генетическое перепрограммирование», при этом реализация ростовой и онтогенетической программ тормозится или полностью блокируется, а жизнеспособность растения в этих условиях, прежде всего, связана с запуском адаптивной программы, направленной на повышение их устойчивости. Повреждающие высокие температуры приводят к структурным и функциональным повреждениям, в результате которых происходит гибель клеток [Титов, Таланова, 2009].

Возможно, что закалывание как краткосрочное повреждающее воздействие вызывает появление в клетках соединений, которые являются результатом определенных (обратимых) нарушений и одновременно выполняют функции сигнала, запускающего механизмы формирования повышенной резистентности.

Отсутствие данных по влиянию гипертермии на обмен органических кислот побудило нас провести исследование такого плана.

Из большого разнообразия органических кислот для анализа мы выбрали следующие карбоновые кислоты: щавелевую, лимонную и fumarовую.

В литературе имеются сведения о том, что щавелевая кислота вовлечена в поддержание катион-анионного баланса и pH-гомеостаза растений [Осмоловская, 2007]. Известно также, что из-за увеличения проницаемости мембран при гипертермии катион-анионный гомеостаз нарушается. У растений за эту регуляцию отвечают два механизма: биофизический – электрогенная АТФ-зависимая протонная помпа, с помощью которой ионы водорода выводятся через мембраны наружу против электрохимического градиента, и биохимический: pH-чувствительные процессы карбоксилирования и декарбоксилирования органических кислот, в ходе которых продуцируется или потребляется протон. Установлена способность многих растений накапливать значительные количества оксалата. Однако исследования, направленные на оценку степени его вовлечения в формирование ионного гомеостаза растений, крайне малочисленны, и процессы синтеза щавелевой кислоты в них, как правило, трактуются как вторичные по отношению к минеральному обмену растительного организма [Осмоловская и др., 2002].

Полученные нами результаты показали у контрольных проростков гороха достаточно высокий уровень свободного оксалата по сравнению с содержанием цитрата или fumarата (рис. 2). В опытных вариантах количество оксалата увеличилось

почти в 2 раза по сравнению с контролем и оставалось стабильно высоким на протяжении всего эксперимента (7 сут.). Особенно существенно уровень оксалата вырос на 3-и сут. в варианте с предварительным холодным закалыванием.

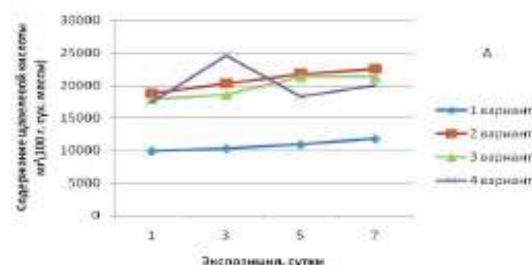


Рис. 2. Динамика содержания щавелевой кислоты у проростков гороха при действии закалывающих и повреждающих температур

Можно предположить, что полученные нами результаты свидетельствуют о вовлечении оксалата в формирование ионного гомеостаза растений в процессе адаптации к гипертермии. Некоторые авторы также приходят к выводу, что контролируемая аккумуляция калиевых солей щавелевой кислоты является доминирующим фактором, определяющим формирование катион-анионного баланса и задающим осмотический потенциал клеток листа [Ruiz, Mansfield, 1994; Franceschi, 2001; Осмоловская и др., 2007].

Результаты определения цитрата показали (рис. 3), что в норме его уровень оставался достаточно стабильным в течение всего эксперимента.

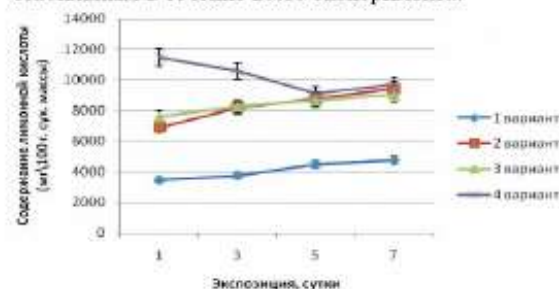


Рис. 3. Динамика содержания лимонной кислоты у проростков гороха при действии закалывающих и повреждающих температур

В условиях гипертермии содержание цитрата значительно увеличилось (в 2 раза) уже через сутки и оставалось высоким до конца эксперимента. Предварительное теплое закалывание не изменило данную динамику цитрата. В варианте с предварительным холодным закалыванием и последующей гипертермией в 1-е и 3-и сут. после воздействия (стадия стресс-реакции) количество цитрата сильно возросло (в 3 раза по сравнению с контролем), а затем (5–7-е сут. – стадия адаптации) понизилось до его количества в варианте с гипертермией. Причиной резкого снижения доми-



нирующих органических кислот у растений может быть повышенной активностью энергии дыхания.

Содержание фумарата в норме у исследуемых растений было значительно ниже, чем оксалата и цитрата, что соответствует данным литературы [Землянухин, Землянухин, 1995] (рис. 4).

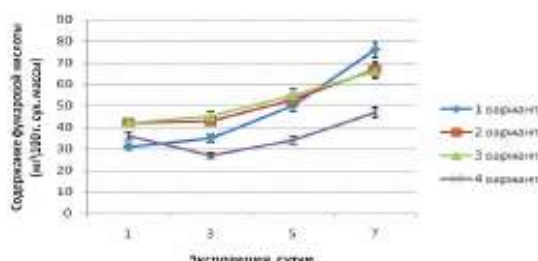


Рис. 4. Динамика содержания фумаровой кислоты у проростков гороха при действии закалывающих и повреждающих температур

В опытных вариантах (гипертермия без закалывания и гипертермия после теплового закалывания) динамика фумарата была близкой к динамике его содержания у контрольных растений. В условиях действия гипертермии после холодого закалывания количество фумарата имело явную тенденцию к снижению по сравнению с контролем и остальными вариантами.

В литературе высказывается мнение, что синтез и компартиментализация органических кислот в клетке четко регулируется, однако точная оценка величины и состава пулов этих соединений у растений практически отсутствует [Осмоловская и др., 2003].

Полагают, что в цитозоле этот пул метаболически активен, относительно стабилен и вследствие нейтральных значений pH представлен не свободными кислотами, а преимущественно их диссоциированными анионами или водорастворимыми калиевыми солями. Вакуолярный пул является временным, динамичным, быстро утилизируемым в темноте для метаболизма в цитозоле и представляет комплекс органических кислот с катионами кальция и магния [Осмоловская, 2007].

Различия в содержании в растениях отдельных органических кислот следует рассматривать как следствие изменения скоростей ферментативных реакций, лежащих в основе их образования и превращения. В этом смысле первостепенную роль играют ферментативные реакции цикла трикарбонных кислот (ЦТК).

Накопление цитрата и фумарата свидетельствует о превращениях, идущих по ЦТК, причем гипертермия оказывает непосредственное влияние на ход таких превращений. Известно, что лимитирующей реакцией всего ЦТК является синтез цитрата (фермент цитратсинтетаза). В наших исследованиях содержание цитрата при гипертермии зна-

чительно повышалось, а фумарата оставалось на уровне контроля. Последнее может являться показателем стабильной скорости ЦТК, которая в норме должна соответствовать скорости гликолиза.

На основании этого можно предположить, что при гипертермии усиливается другая важная функция ЦТК – анаболическая, т.е. промежуточные соединения ЦТК включаются в процессы биосинтеза и, в первую очередь, аминокислот. Последнее, с одной стороны, обеспечивает усиленный белковый синтез (БПС), а с другой – нейтрализует избыток аммиака.

Искупаются данные о том, что некоторые ферменты ЦТК (в том числе цитратсинтетаза) имеют разную компартиментализацию в растительной клетке и являются множественными молекулярными формами (изоферментами, т.е. кодируются различными генами). Установлено также, что долговременное влияние теплового закалывания может сопровождаться изменениями изоферментных спектров [Martins et al., 1999]. Ферменты трикарбонных кислот, участвующие в анаболических реакциях, пространственно разобщены от ферментов ЦТК, находясь в цитоплазме и участвуют в синтезе аминокислот. Ферменты же ЦТК, выполняющие энергетические функции, локализованы в митохондриях. Именно участие изоферментов в различных процессах и обуславливает разницу их свойств [Землянухин, Землянухин, 1995].

Оксикислоты могут образовываться не только в ЦТК, но и в результате протеолиза и дезаминирования аминокислот. Например, глутамат может последовательно превращаться в  $\alpha$ -кетоглутарат, изоцитрат, цитрат и малат. Повышение содержания большинства кетокислот может вызываться также как снижением активности процессов их прямого аминирования, так и задержкой гликолитического распада сахаров.

Полученные нами результаты подтверждают предположение об участии органических кислот в механизме теплового и холодого закалывания растений к действию последующей гипертермии. Вклад каждой из изученных нами органических кислот в процесс закалывания и защитный ответ на действие повреждающей температуры неравнозначен и, возможно, приурочен к различным стадиям адаптационного процесса или является видоспецифичным.

### Библиографический список

- Балагурова Н.И., Акимова Т.В., Титов А.Ф. Влияние локального охлаждения проростков овсяницы и пшеницы на различные виды устойчивости листа и корня // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 1. С. 113–118.
- Землянухин А.Л., Землянухин Л.А. Метаболизм органических кислот растений: учеб. пособие. Во-

- ронж, 1995. 150 с.
- Осмоловская Н.Г. Влияние условий минерального питания на формирование пулов оксалата в листьях *Amaranthus cruentus* L. // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2007. Вып. 2, № 11. С. 41.
- Осмоловская Н.Г., Попова Н.Ф., Кучаева Л.Н. Регуляция пулов оксалата в листьях амаранта условиями минерального питания // V съезд общества физиологов растений России: тез. докл. Пенза, 2003. С. 151.
- Осмоловская Н.Г. и др. Регуляция обмена оксалата в листьях *Amaranthus cruentus* при разной обеспеченности азотом и катионами // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2002. Вып. 2, № 11. С. 41–47.
- Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М., 2004. 240 с.
- Строгонов Б.П. и др. Структура и функции клеток растений при засолении. М.: Наука, 1970. 318 с.
- Титов А.Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2009. 206 с.
- Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 55 с.
- Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб: Изд-во СПб ун-та, 2002. 244 с.
- Чудинова Л.А., Суворов В.И. Роль некоторых низкомолекулярных соединений в механизме перекрестной адаптации растений // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2011. Вып. 1. С. 17–20.
- Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
- Franceschi V.R. Calcium oxalate in plants // *Plant Science*. 2001. Vol. 6, № 7, P. 331.
- Martins L.L. et al. Electrophoretic changes by heat of isoperoxidase from green bean // *Agron. Lusit.* 1999. Vol. 47, P. 317–325.
- Ruiz L.P., Mansfield T.A. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells // *New Phytol.* 1994. Vol. 127, P. 473–481.
- of *Amaranthus cruentus* L.]. *Vestnik SpbGU. Ser. 3*. 2007, iss. 2, N 11, p. 41. (In Russ.).
- Osmolovskaya N.G., Popova N.F., Kuchaeva L.N. [Regulation of the pools of oxalate in leaves of amaranth conditions of mineral nutrition]. *V s'ezd obščestva fiziologov rastenij Rossii: Tezisy dokladov* [V Congress of the society of physiologists of plants of Russia]. Penza, 2003, p. 151. (In Russ.).
- Osmolovskaya N.G., Kuchaeva L.N., Popova N.F. et al. [The metabolism of oxalate in leaves of *Amaranthus cruentus* under different availability of nitrogen and cations]. *Vestnik SpbGU. Ser. 3*. 2002, iss. 2, N 11, pp. 41–47. (In Russ.)
- Rukovodstvo po metodam kontrolja kačestva i bezopasnosti biologičeski aktivnykh dobavok k pišče* [Manual methods of quality control and safety of biologically active additives to food]. Moscow, 2004. 240 p. (In Russ.).
- Strogonov B.P., Kabanov V.V., Shevyakova N.I., Lapina L.P. *Struktura i funkcii kletok rastenij pri zasolenii* [Structure and function of plant cells under salinity]. Moscow, Nauka Publ., 1970. 318 p. (In Russ.).
- Titov A.F., Talanova V.V. *Ustojčivost' rastenij i fitogormony* [Plant resistance and plant hormones]. Petrozavodsk, 2009. 206 p. (In Russ.).
- Trunova T.I. *Rastenie i nizkotemperaturnyj stress* [Plant and low-temperature stress]. Moscow, Nauka Publ., 2007. 55 p. (In Russ.).
- Chircova T.V. *Fiziologičeskie osnovy ustojčivosti rastenij* [Physiological basis of plant resistance]. St. Petersburg, 2002. 244 p. (In Russ.).
- Chudinova L.A., Suvorov V.I. [Role of some low-molecular compounds in the mechanism of cross adaptation of plants]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. 2011, Iss. 1, pp. 17–20. (In Russ.).
- Shakirova F.M. *Nespecifičeskaja ustojčivost' rastenij k stressovym faktorom i ee regulacija* [Non-specific stability of plants to stress factors and its regulation]. Ufa, Gilem Publ., 2001. 160 p. (In Russ.).
- Franceschi V.R. Calcium oxalate in plants. *Plant Science*. 2001, V. 6(7), p. 331.
- Martins L.L., Azinheira H., Mourato M.P. et al. Electrophoretic changes by heat of isoperoxidase from green bean. *Agron. Lusit.* 1999, V. 47, pp. 317–325.
- Ruiz L.P., Mansfield T.A. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.* 1994, V. 127, pp. 473–481

Поступила в редакцию 06.06.2016

**Об авторах**

Чудинова Лариса Алексеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений и микроорганизмов ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15; Chudinova.Lar@psu.ru; (342)2396203

Кайгородов Роман Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений и микроорганизмов ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15; r-kaygorodov@yandex.ru; (342)2396317

Пархоменко Вера Владимировна, студентка биологического факультета ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Ощепкова Анастасия Владимировна, студентка биологического факультета ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

**About the authors**

Chudinova Larisa Alekseevna, candidate of biology, associate professor of the Department of plant physiology and microorganisms Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; Chudinova.Lar@psu.ru; (342)2396203

Kaigorodov Roman Vladimirovich. PhD, associate professor of the Department of plant physiology and microorganisms Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; r-kaygorodov@yandex.ru; (342)2396317

Parhomenko Vera Vladimirovna, Student of Biological faculty Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Oshchepkova Anastasiya Vladimirovna, Student of Biological faculty Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990