

ПАРАМЕТРЫ ВОДНОГО РЕЖИМА И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У ОБРАЗЦОВ СОИ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ И ЗАСОЛЕНИЯ

З.Ш. ИБРАГИМОВА кандидат биологических наук
E-mail: ziyade.ibrahimova@gmail.com

НАНА ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ, Азербайджан

Целью исследовательской работы была оценка влияния дефицита воды на физиологические и биохимические показатели в листьях образцов сои при стрессе. Определяли водоудерживающую способность листьев растений сои, дефицит воды, содержание свободного пролина, активность гваякол-пероксидазы. Во время водного стресса наряду со снижением водоудерживающей способности наблюдались значительные изменения в содержании свободного пролина и активности фермента. Посредством осмотических растворов (сахароза) создавали условия умеренной (3,5 атм) и сильной (7 атм) засухи, а посредством раствора NaCl (9 атм) создавали условия засоления. В ходе воздействия умеренного водного стресса у растений 4-х сортов отмечался рост содержания свободного пролина в 1,47-3,3 раза. Тогда как, для сорта Синара характерно повышение в 12 раз относительно контроля. В условиях сильной засухи содержание этой аминокислоты у растений всех сортов возрастало в 1,83-16,3 раза. Низкий рост содержания пролина наблюдался у сорта Краснодар-68, а самый значительный – у сорта Синара. Предполагается, что причиной значительного роста содержания свободного пролина в листьях сорта Синара является разрушение белков в результате стресса. В условиях засоления активность системы антиоксидантной ферментной защиты возрастала в 1,37-2,94 раза, содержание свободного пролина – в 2,1-6,9 раза относительно контроля.

Комплексное изучение показателей водного дефицита выявило большую чувствительность образцов сорта Синара к воздействию засухи и засоления. Образцы сорта Киота отличились большей устойчивостью, что может объясняться более гибким к воздействиям окружающей среды водным балансом, то есть более быстрой работой адаптивных механизмов в условиях стресса.

Ключевые слова: соя, водный дефицит, пролин, гваякол-пероксидаза.

Для цитирования: Ибрагимова З.Ш. Параметры водного режима и активность антиоксидантной системы у образцов сои в условиях засухи и засоления *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2022; 2(42):16-23. DOI: 10.24412/2309-348X-2022-2-16-23

PARAMETERS OF THE WATER REGIME AND ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN SOYBEAN SAMPLES UNDER CONDITIONS OF DROUGHT AND SALINIZATION

Z.Sh. Ibrahimova

ANAS INSTITUTE OF GENETIC RESOURCES, AZERBAIJAN

Abstract: *The aim of the research work was to assess the effect of water deficiency on physiological and biochemical parameters in the soybean leaves samples under stress. The water-retaining capacity of soybean plant leaves, water deficiency, free proline content, guaiacol peroxidase activity were determined. During water stress, along with a decrease in water retention*

capacity, significant changes in the content of free proline and enzyme activity were observed. By means of osmotic solutions (sucrose), conditions of moderate (3.5 atm) and severe (7 atm) drought were created, and by means of NaCl solution (9 atm), salinization conditions were created. During the exposure to moderate water stress, plants of 4 varieties showed an increase in the content of free proline by 1.47-3.3 times. Whereas, the Sinara variety is characterized by a 12-fold increase relative to the control. In conditions of severe drought, the content of this amino acid in plants of all varieties increased by 1.83-16.3 times. A low increase in the proline content was observed in the Krasnodar-68 variety, and the most significant was in the Sinara variety. It is assumed that the reason for the significant increase in the content of free proline in the leaves of the Sinara variety is the destruction of proteins as a result of stress. Under salinization conditions, the activity of the antioxidant enzyme protection system increased by 1.37-2.94 times, the content of free proline - by 2.1-6.9 times relative to the control.

A comprehensive study of water scarcity indicators revealed a greater sensitivity of samples of the Sinara variety to the effects of drought and salinization. The samples of the Kiota variety were distinguished by greater stability, which can be explained by a more flexible water balance to environmental influences, that is, faster operation of adaptive mechanisms under stress.

Keywords: soy, water deficiency, proline, guaiacol peroxidase.

Введение

Из всех сельскохозяйственных растений во всем мире соя – одна из самых важных зернобобовых культур, которая является богатым источником белков, жиров, макро- и микроэлементов. Несмотря на неуклонный рост потребности в сое, как богатом источнике белка, значительная часть урожая теряется. По сравнению с получаемой максимальной урожайностью большая часть этих потерь происходит из-за влияния факторов абиотического стресса. По сравнению с другими бобовыми соя более чувствительна к стрессовым воздействиям, в частности, к дефициту воды [8] и низкой температуре [9].

Общий физиолого-биохимический ответ растений на воздействие факторов абиотического стресса может быть определен с помощью таких параметров, как показатели водного режима, содержание свободного пролина, активность антиоксидантных ферментов. Изучение показателей водного режима дает возможность получить более точную информацию о засухоустойчивости каждого сорта [4].

Вред, наносимый клеткам и в целом растениям активными формами кислорода (АФК), объем которых во время стресса многократно возрастает, велик, и оказывая воздействие на все биомолекулы, может нарушить целостность клетки. Однако АФК в то же время играет роль маркера стрессовых ситуаций и способствует запуску сигнальных систем, передающих информацию о стрессе. У растений существуют механизмы защиты от вреда, наносимого свободными радикалами. К ним относятся изменения, происходящие на морфологическом, метаболическом, генетическом уровнях для приспособления к неблагоприятным условиям среды. Во время стресса в организме растения сохранение гомеостаза происходит за счет двух компонентов антиоксидантной системы: ферментативного (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза) и неферментативного – низкомолекулярных соединений (пролин, аскорбиновая кислота, фенол, глутатион, каротиноиды и т.д.). Каждое звено антиоксидантного механизма, действуя совместно, смягчает разрушительное действие АФК и способствует созданию устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды [7].

В создании реакций растений на стресс фундаментальная роль принадлежит аминокислоте пролину. Так, различные организмы используют эту аминокислоту для устранения дисбаланса клетки, возникающего из-за неблагоприятных условий окружающей среды. Было обнаружено, что во время стресса содержание свободного пролина в растениях может возрастать в 100 раз. Многочисленные исследования показали, что пролин влияет на широкий спектр внутриклеточных процессов, в том числе биоэнергетику, дифференциацию, рост, развитие и апоптоз. Также, предполагается участие пролина в стабилизации протеинов и антиоксидантных ферментов, в устранении АФК из электрон-транспортной цепи и в

гашении синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), в стимулировании внутриклеточных сигнальных систем [6].

Цель исследований – оценка влияния дефицита воды на физиологические и биохимические показатели в листьях образцов различных сортов сои в условиях засухи и засоления.

Материал и методы исследований

Используемые в исследовании образцы сортов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) были взяты с участка опытно-полевой базы Сараи Института Генетических Ресурсов. Использовались образцы 5 сортов сои: Киота, Краснодар-68, Канада-3, Опус, Синара. Определяли параметры водного режима в листьях двух верхних ярусов растений [1]. Параметры водного режима вычислялись по следующим формулам:

$$Sd = \frac{V_n \times 100}{V},$$

где Sd - водный дефицит (%), V_n – количество поглощаемой воды, равной разнице между весом листа в состоянии полного насыщения и предыдущим весом до насыщения (г), V – количество общей воды, равной разнице между весом листа в состоянии полного насыщения и сухим весом (г). Для определения сухого веса листа высушивали в термостате при температуре 105°C в течение 4-5 часов.

$$Ss = \frac{b \times 100}{a},$$

где Ss – водоудерживающая способность – потеря воды за определенный отрезок времени в сравнении с начальным содержанием воды в листе (сырой вес) (%), a – количество воды в листьях в начале эксперимента (сырой вес, г), b – количество воды, потерянной за определенный отрезок времени, в ходе увядания листа (г).

Для выявления образцов, устойчивых к стрессу, в лабораторных условиях интактным растениям в течение суток создавали стрессовые условия: засуху – посредством раствора сахарозы в 3,5 и 7,0 атм, а засоление – посредством раствора NaCl в 9,0 атм. В листьях двух верхних ярусов определяли содержание свободного пролина и активность гваякол-пероксидазы. Содержание пролина измеряли с помощью спектрофотометра (UV-3100 PC) при длине волны 520 нм, а активность гваякол-пероксидазы – при 470 нм. Содержание свободного пролина вычисляли по калибровочной кривой по методу Бейтса [5]. Активность гваякол пероксидазы [2] вычисляли по следующей формуле: $A = (D_2 - D_1) V \cdot V_2 \cdot 60 / (t_2 - t_1) V_1 m$, где D_1 – оптическая плотность раствора в начале опыта, D_2 – оптическая плотность раствора в конце опыта, V – общий объем экстракта (мл), V_2 – объем раствора в кювете (мл), V_1 – объем экстракта, взятого для проведения реакции (мл), t_2 и t_1 – время начала и конца опыта (сек), m – вес растительного материала, взятого для опыта (г), 60 – секунды.

Результаты и их обсуждение

Исследование водоудерживающей способности образцов сои, содержащихся в оптимальных условиях и в условиях засухи, выявило значительное различие между сортами (рис. 1). Если в контрольных вариантах опыта показатель водоудерживающей способности варьировал между 34,4 % (Киота) и 48,2% (Синара), то в условиях умеренной засухи этот параметр менялся в пределах от 38,5% (Киота) до 70,5% (Синара), а в условиях сильной засухи – варьировал в диапазоне 43,6% (Киота) и 74,3% (Канада-3). Полученные результаты показали, что опытные варианты Синара и Канада-3 в ходе эксперимента теряли воду больше других образцов и отличались сравнительно слабой водоудерживающей способностью.

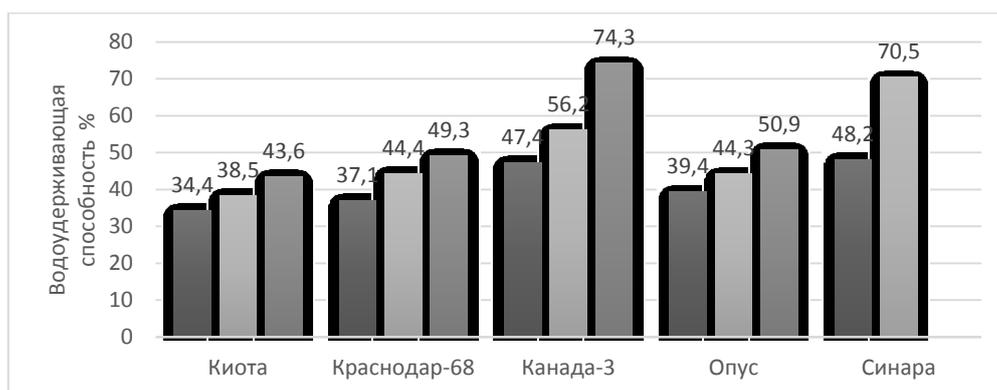


Рис. 1. Водоудерживающая способность образцов сои (%): 1-контроль, 2-засуха 3,5 атм, 3-засуха 7 атм

Из всех показателей водного режима (относительное содержание воды, водный дефицит, водоудерживающая и водопоглощающая способности) водоудерживающая способность больше всего отражает устойчивость растений к засухе и к высоким температурам [4]. Анализ процентного соотношения водоудерживающей способности растений, подвергнутых засухе, по сравнению с контрольными образцами показал, что в условиях умеренной засухи этот параметр снижался в диапазоне 11,9-46,2%. Минимальное снижение наблюдалось в листьях растений сорта Киота, максимальное – у образцов сорта Синара. При сильной засухе минимальное снижение водоудерживающей способности было характерно растениям сорта Киота (26,7%), и максимальное – растениям сорта Канада-3 (56,7%).

В контрольном варианте высокий показатель водного дефицита демонстрировали сорта Канада-3 (23,8%) и Синара (20,9%) (рисунок 2). Низкий показатель водного дефицита был характерен образцам сортов Киота (12,8%) и Опус (13,6%). При умеренной засухе высокий процентный рост показателей водного дефицита наблюдался у образцов сортов Синара (21,5%) и Канада-3 (13,8%). В условиях же сильной засухи наибольшая потеря воды наблюдалась у сортов Краснодар-68 и Канада-3, водный дефицит у которых составил 20,5% и 25,6%, соответственно. В условиях умеренной засухи наиболее низкий процентный рост водного дефицита определен у растений сортов Киота (8,5%) и Опус (8,8%), в условиях сильной засухи – у растений сорта Киота (15%).

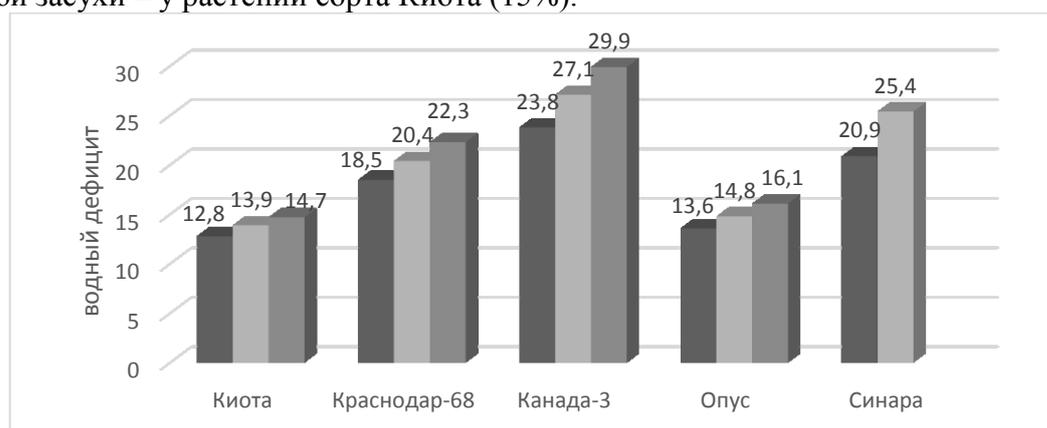


Рис. 2. Водный дефицит (%) у растений различных сортов сои: 1-контроль, 2-засуха 3,5 атм, 3-засуха 7 атм

Таким образом, по параметрам водного режима растения сорта Киота демонстрировали относительно высокие результаты и по сравнению с другими изученными сортами может считаться наиболее засухоустойчивым. Образцы сортов Канада-3 и, в особенности, Синара проявили себя как наиболее чувствительные к засухе.

В проводимом нами исследовании также определялась способность накопления пролина в листьях растений, подвергнутых влиянию факторов стресса (рис. 3). В контроле содержание пролина варьировало в интервале 2,3-5,21 $\mu\text{M}/\text{г}$.

При засухе наблюдался рост содержания свободного пролина (рис. 3) в листьях растений всех сортов. В ходе воздействия умеренной засухи содержание пролина менялось в интервале 3,65 $\mu\text{M}/\text{г}$ (сорт Канада-3) – 62,6 $\mu\text{M}/\text{г}$ (сорт Синара). При умеренном водном стрессе у 4-х сортов отмечался рост содержания свободного пролина в 1,47-3,3 раза. Тогда как, для сорта Синара характерно повышение в 12 раз относительно контроля.

При влиянии сильной засухи содержание пролина увеличивалось в еще большей степени (в 1,83-16,3 раза). По сравнению с контролем незначительный рост содержания пролина наблюдался у образца сорта Краснодар-68, значительный – у сорта Синара. В общем, содержание пролина изменилось в диапазоне 6,93 $\mu\text{M}/\text{г}$ (сорт Краснодар-68) – 85,1 $\mu\text{M}/\text{г}$ (сорт Синара). Анализ полученных данных показал, что увеличение дозы стрессового фактора засухи привело к еще большему накоплению свободного пролина в тканях растений. Принимая во внимание функции пролина как осмопротектора и антиоксиданта, повышение его содержания в клетках нацелено на защиту растения от резкого воздействия стрессора. Однако, сопоставление параметров водного режима и визуальных наблюдений за состоянием растений сорта Синара при стрессе дает основание связать значительное повышение содержания свободного пролина в этом образце не с биосинтезом пролина, а в большей степени с наличием продуктов деградации протеинов. На наш взгляд, увеличение содержания пролина в листьях растений сорта Синара в условиях умеренной (в 12 раз) и сильной (16,3 раза) засухи, связанное наряду с синтезом пролина, также с накоплением пролина, выделяющегося в результате деградации белков, говорит о большей чувствительности этого сорта.

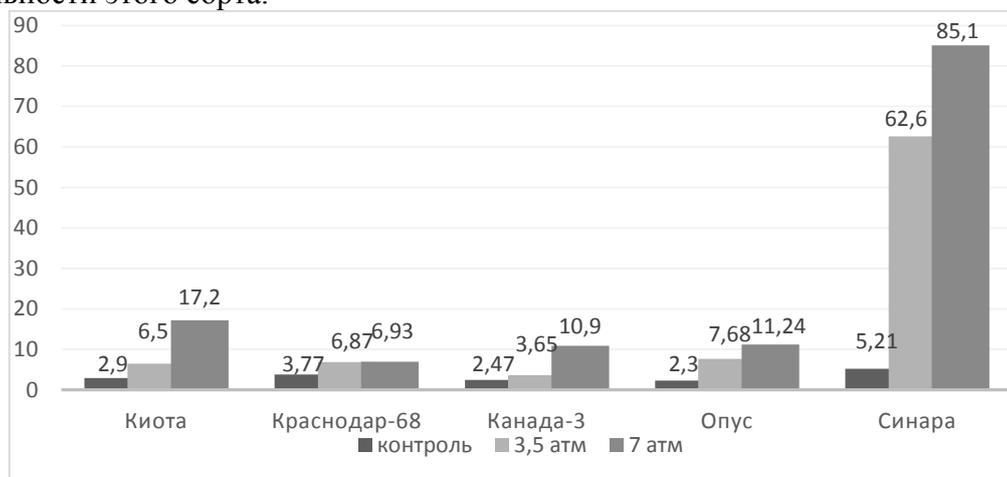


Рис. 3. Содержание свободного пролина ($\mu\text{M}/\text{г}$) в листьях образцов различных сортов сои в условиях засухи

Таким образом, для защиты метаболизма и обеспечения жизнеспособности более чувствительных форм от факторов стресса требуется более активное включение адаптационных механизмов, т.е. для устранения наносимых организму повреждений возникает необходимость в скорейшей мобилизации антиоксидантной системы в неблагоприятных условиях окружающей среды и ее функционировании в полную силу.

При засолении содержание пролина варьировало в пределах 8,1 $\mu\text{M}/\text{г}$ (сорт Краснодар-68) – 33,8 $\mu\text{M}/\text{г}$ (сорт Синара) (рис. 4). При этом, для сорта Краснодар-68 было характерно наименьшее увеличение содержания пролина (в 2,1 раза) относительно контроля, а для растений сортов Синара и Опус – наибольшее (в 6,5 и 6,9 раза, соответственно).

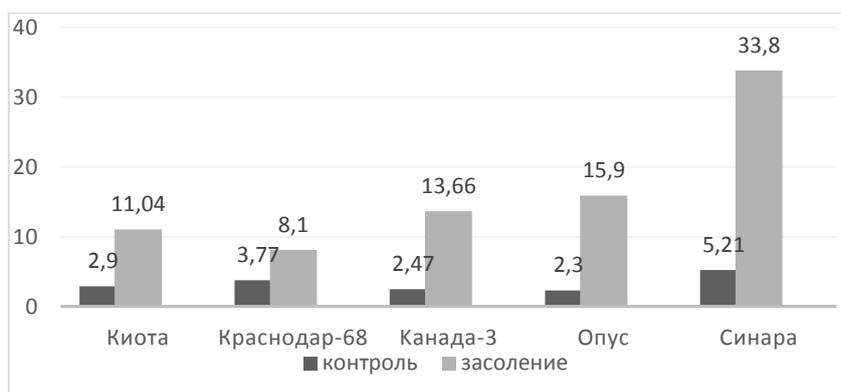


Рис. 4. Содержание свободного пролина ($\mu\text{M}/\text{г}$) в образцах сортов сои в условиях засоления: 1-контроль, 2-засоление

Исследование антиоксидантного фермента гваякол-пероксидазы показало, что в контроле ее активность варьировала в интервале 0,091-0,204. Максимальное значение было характерно для сорта Опус, а минимальное – для сорта Канада-3.

В условиях умеренной засухи активность фермента варьировала в интервале 0,167-0,303, а в условиях сильной засухи – в интервале 0,150-0,396. Минимум активности фермента в условиях умеренного стресса наблюдался в образцах сорта Опус (0,167), а в условиях сильного стресса – в образцах сорта Киота (0,150), максимальное же значение как в условиях умеренной, так и сильной засухи наблюдалось в растениях сорта Синара (0,303 и 0,396, соответственно) (рис. 5).



Рис. 5. Активность гваякол-пероксидазы в листьях растений сортов сои в условиях засухи

Анализ полученных данных по содержанию пролина и активности гваякол-пероксидазы позволяет говорить о взаимодействии ферментативных и низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы. Так, при сильной засухе повышение содержания пролина в образцах сорта сои Киота в 2,6 раза по сравнению с условиями умеренной засухи сопровождалось снижением активности гваякол-пероксидазы в 1,3 раза. Ослабление активности гваякол-пероксидазы под влиянием сильной засухи можно объяснить возрастанием его потребления по сравнению с синтезом фермента, повышением защитной деятельности низкомолекулярных компонентов, осуществляющих антиоксидантную функцию защитной системы клетки и участием в гашении свободных радикалов [3]. У растений сорта Опус была отмечена высокая конститутивная активность фермента гваякол-пероксидазы (0,204). Снижение активности фермента в условиях умеренной засухи свидетельствует не о его биосинтезе при этой дозе стресса, а о потреблении. В условиях сильной засухи в результате биосинтеза гваякол-пероксидазы, ее активность немного возрастая, составила 0,231. В других образцах с увеличением дозы воздействия стресса биосинтез и активность фермента возрастали.

В условиях засоления активность системы антиоксидантной ферментативной защиты повысилась относительно контроля в 1,37-2,94 раза. Исключение составили растения сорта Краснодар-68, где активность гваякол пероксидазы снизилась и составила 86,0%. Показатель активности фермента, изменяясь в диапазоне от 0,122 до 0,60, имел свой минимум в растениях сорта Краснодар-68, и достигал своего максимума в растениях сорта Опус (рисунок 6).

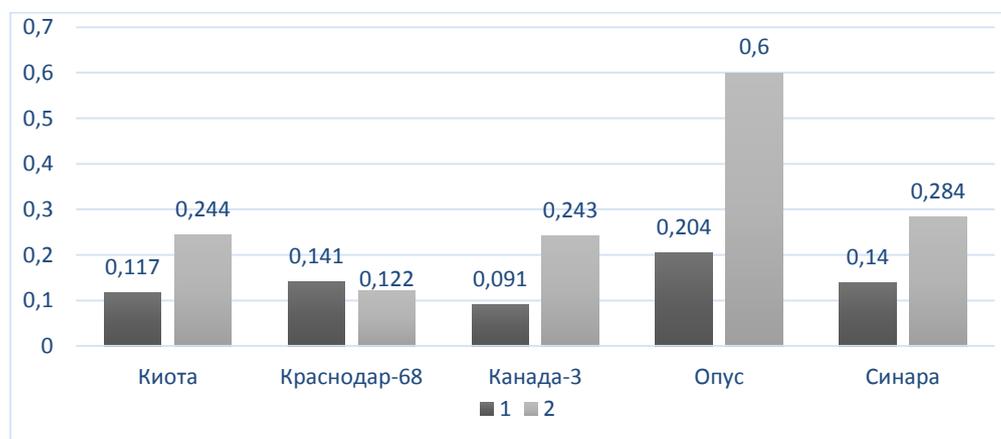


Рис. 6. Активность гваякол-пероксидазы в условиях засоления в листьях растений сортов сои: 1-контроль, 2-засоление

Заключение

В условиях стресса в листьях растений сои создавался водный дефицит. Значения водного дефицита различались в зависимости от сорта сои. Комплексное изучение показателей водного дефицита выявило большую чувствительность образцов сорта Синара к воздействию засухи и засоления. Образцы сорта Киота отличились большей устойчивостью, что может объясняться более гибким к воздействиям окружающей среды водным балансом, то есть более быстрой работой адаптивных механизмов в условиях стресса.

Сопоставление параметров водного режима и визуальных наблюдений за состоянием растений сорта Синара при стрессе дает основание связать значительное повышение содержания свободного пролина в этом образце не с биосинтезом пролина, а в большей степени с наличием продуктов деградации протеинов. На наш взгляд, увеличение содержания пролина в листьях растений сорта Синара в условиях умеренной (в 12 раз), сильной (в 16,3 раза) засухи и при засолении (в 6,5 раза) связанное наряду с синтезом пролина, также с накоплением этой аминокислоты, выделяющейся в результате деградации белков, говорит о большей чувствительности этого сорта.

Определение активности гваякол-пероксидазы, являющейся ферментативным компонентом антиоксидантной системы, выявило значительное повышение активности в условиях стресса. Анализ полученных данных по содержанию пролина и активности гваякол-пероксидазы позволяет говорить о взаимодействии компонентов антиоксидантной системы у сортов Киота и Опус.

Литература

1. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям / под ред. Г.В. Удовенко. Ленинград. - 1976. - 262 с.
2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. – Ленинград - Агропромиздат – 1987 – С. 41-43.
3. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В., Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений. Эл. Науч. журнал. Современные проблемы науки и образования (science-education/ru) - 2011. – № 2.
4. Ионова Е.В., Некрасов Е.И. Изменение водного режима растений озимой мягкой пшеницы в условиях провокационного фона («засушник») // «Зернобобовые и крупяные культуры» - 2014 - №4 (12), – С.42-45.
5. Bates L.S., Walden R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. C.Plant Soil. - 1973 - V.39 - p. 205-207.

6. Kumar TK, Samuel D, Jayaraman G, Srimathi T, and Yu C. The role of proline in the prevention of aggregation during protein folding in vitro. *Biochem Mol Biol Int* – 1998 – V.46 – p. 509–517
7. Kaushik Das and Aryadeep Roychoudhury. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Science* – 2014 - p.1-13
8. Lobato A. K. S., Costa R. K. L., Oliveira Neto K. F., Santos Filho B. G., Cruz F. J. R., Freitas J. M. N. and Cordeiro F. K. Morphological changes in soybeans under progressive water stress. *International Journal of Botany*. - 2008 – V.49 – no:2 - p. 231-235.
9. Van Heerden, P.D.R., G.H.J. Kruger Photosynthetic limitation in soybean during cold stress. *S. Afr. J. Sci.* – 2000 – no:96 - p. 201-206.
10. Xinwen Liang, Lu Zhang, Sathish Kumar Natarajan, and Donald F. Becker. Проллиновые механизмы выживания при стрессе. *Antioxidants & redox signaling* – 2013 – V.19 – no: 9 – p. 998-1011.

References

1. Diagnostika ustoichivosti rastenii k stressovym vozdeistviyam [Diagnostics of plant resistance to stress] edited by G.V. Udovenko. Leningrad, 1976, 262 p. (In Russian)
2. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii [Methods of biochemical research of plants]. Leningrad, Agropromizdat Publ., 1987, pp. 41-43. (In Russian)
3. Garifzyanov A.R., Zhukov N.N., Ivanishchev V.V. Obrazovanie i fiziologicheskie reaktsii aktivnykh form kisloroda v kletkakh rastenii [Formation and physiological reactions of reactive oxygen species in plant cells]. *Electronic Scientific journal. Modern problems of science and education (science-education/ru)*, 2011, no. 2 (In Russian)
4. Ionova E.V., Nekrasov E.I. Izmenenie vodnogo rezhima rastenii ozimoi myagkoi pshenitsy v usloviyakh provokatsionnogo fona («zasushnik») [Changes in the water regime of winter soft wheat plants in the conditions of a provocative background ("drought")], *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2014, no. 4 (12), pp.42-45 (In Russian)
5. Bates L.S., Walden R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. *C.Plant Soil*. 1973, V.39, pp.205-207.
6. Kumar TK, Samuel D, Jayaraman G, Srimathi T, and Yu C. The role of proline in the prevention of aggregation during protein folding in vitro. *Biochem Mol Biol Int*. 1998, V.46, pp. 509–517.
7. Kaushik Das and Aryadeep Roychoudhury. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Science* – 2014, pp.1-13
8. Lobato A. K. S., Costa R. K. L., Oliveira Neto K. F., Santos Filho B. G., Cruz F. J. R., Freitas J. M. N. and Cordeiro F. K. Morphological changes in soybeans under progressive water stress. *International Journal of Botany*. 2008, V.49, no.2, pp. 231-235.
9. Van Heerden, P.D.R., G.H.J. Kruger Photosynthetic limitation in soybean during cold stress. *S. Afr. J. Sci.* 2000, no.96, pp. 201-206.
10. Xinwen Liang, Lu Zhang, Sathish Kumar Natarajan, and Donald F. Becker. Prolinovyie mekhanizmy vyzhivaniya pri stresse. *Antioxidants & redox signaling*, 2013, v.19, no. 9, pp. 998-1011.