

УДК 58.036:547.757:582.542.11

ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОЙ И КОНЬЮГИРОВАННОЙ ФОРМ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В ПРОРОСТКАХ *Triticum Aestivum* L.

**© 2014 г. И. В. Косаковская, Л. В. Войтенко,
Р. В. Лихневский, А. Ю. Устинова**

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной Академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследовали влияние кратковременной (2 ч) гипо- (+2°C) и гипертермии (+40°C) на содержание свободной и конъюгированной форм индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в корнях и надземной части у 7- и 14-дневных проростков *Triticum aestivum* L. жароустойчивого сорта Ятрань 60. В процессе роста в контрольных условиях содержание свободной формы ИУК в корнях уменьшалось. В надземной части возрастало количество конъюгированной ИУК. Тепловой стресс вызывал увеличение пула эндогенной ИУК в надземной части и корнях, при этом накопление конъюгированной ИУК активнее происходило у 14-дневных проростков. Холодовой стресс вызывал значительное увеличение количества конъюгированной ИУК в надземной части 7-дневных проростков. После холодового стресса содержание конъюгированной ИУК в корнях 14-дневных проростков уменьшалось. Показано, что в надземных органах 7-дневных и корнях 14-дневных проростков озимой пшеницы сорта Ятрань 60 в поддержании ауксинового гомеостаза при гипотермии в первом случае и гипертермии во втором задействованы реакции конъюгирования. Выявленные изменения в содержании форм ИУК носят специфический характер, который зависит от вида стресса, органа и возраста проростков.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., свободная и конъюгированная индолил-3-уксусная кислота, гипотермия, гипертермия

Фитогормонам принадлежит ключевая роль в регуляции процессов роста, развития и устойчивости растений. По современным представлениям факторами, определяющими характер действия фитогормонов, являются соотношение между их отдельными классами, содержание и локализация в органах и тканях растений (Davies, 2004; Блюм и др., 2012). Индолил-3-уксусная кислота (ИУК) – природный ауксин, одной из основных функций которой является регуляция ростовых процессов. Ауксины непосредственно влияют на митотический цикл, а также на процессы перехода клеток из состояния покоя к активной пролиферации. Ауксины активируют процесс дыхания, положительно влияют на биосинтетические процессы (Гамбург и др., 1992; Del Pozo et al., 2005). ИУК

синтезируется в хлоропластах молодых листьев, способна образовывать конъюгаты с глюкозой, аспарагиновой кислотой, олигосахаридами, белками и нуклеиновыми кислотами (Davis, 2004; Веселов и др., 2007). В связанном состоянии ИУК теряет свою активность. Считают, что конъюгаты ИУК выполняют функцию депо фитогормона, а также могут использоваться в качестве транспортной формы (Терек, 2007). Показано, что увеличение количества ИУК сопровождается разрыхлением клеточных стенок и активацией процесса роста клеток растяжением (Hager, 2003).

Экстремальные температуры являются одним из главных стрессовых факторов, негативно влияющих на водный режим, рост и продуктивность растений. Участие ИУК в формировании ответных реакций на действие неблагоприятного температурного режима исследовано недостаточно. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных

Адрес для корреспонденции: Косаковская Ирина Васильевна, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина; e-mail: science@botany.kiev.ua

температур и роль фитогормонов, в частности эндогенной ИУК, рассмотрены в работах А.Ф. Титова с соавт. (2003; 2006). Установлено, что низкая положительная температура вызывала уменьшение количества ИУК в корневищах *Phalaroides arundinaceae* L. (Маслова и др., 2007). Ранее нами были проанализированы изменения в содержании свободной и конъюгированной форм ИУК у растений разных экологических стратегий в ответ на действие температурных стрессов и выявлена корреляция между такими изменениями и отдельными стратегическими признаками исследованных видов (Косаківська та ін., 2013). Влияние же температурных стрессов на спектр свободной и конъюгированной форм ИУК в разных органах пшеницы остается исследованным недостаточно.

Цель нашей работы состояла в исследовании влияния теплового и холодного стрессов на характер распределения свободной и конъюгированной форм ИУК между корнями и надземной частью в проростках жароустойчивого сорта озимой пшеницы Ятрань 60.

МЕТОДИКА

Сорт *Triticum aestivum* L. Ятрань 60 относится к короткостебельным, среднеранним сортам интенсивного типа. Стандарт для зоны Лесостепи и Полесья. Рекомендуются также для выращивания в Степной зоне Украины. Сорт устойчив к полеганию, характеризуется высокой жаро- и засухоустойчивостью. Морозоустойчивость выше средней и высокая (Моргун та ін., 2008).

Перед посевом откалиброванные семена стерилизовали в три этапа: в течение 3 мин в растворе перманганата калия (насыщенного цвета), в течение 2 мин в этаноле (96%) и в течение 1 мин в растворе нитрата серебра (0,1%). После каждого этапа семена промывали в стерильной дистиллированной воде. Стерилизованные семена переносили в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и оставляли на сутки при температуре +24°C, плотности фотосинтетического протонного потока 110 мкмоль/(м² · с), фотопериоде 16 ч свет / 8 ч темнота. При отсутствии визуальных признаков заражения плесневыми грибами через 24 ч проростки пересаживали в горшки на минеральный субстрат фирмы «Grodan», температурный режим и условия освещения при этом не изменялись.

Для создания условий теплового и холодного стресса проростки подвергали кратко-

временному (в течение 2 ч) воздействию температур +40°C и +2°C.

Для дальнейшего определения содержания ИУК надземную часть и корни 7- и 14-дневных контрольных и подвергнутых стрессовым воздействиям проростков взвешивали и замораживали в дипфризере Jouan VX100 (Чехия) при температуре -82 С для дальнейших исследований.

Фракции ИУК выделяли при помощи охлажденного 80% этанола с добавлением 1-2 мкл антиоксиданта (0,02 % диэтилдитиокарбоната натрия). Спиртовые экстракты выпаривали до водного остатка и промораживали. Аликвоту размороженного водного остатка доводили раствором 2 н HCl до pH 3,0 и центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин на центрифуге К-24 фирмы Janetski (ФРГ). Свободную форму ИУК экстрагировали диэтиловым эфиром из супернатанта. Фракции фитогормона дополнительно очищали при помощи кислотно-щелочной переэкстракции и методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системе растворителей хлороформ:этилацетат:ледяная уксусная кислота (70:30:5). Зоны хроматограмм, которые соответствовали R_f стандарту ИУК, элюировали этанолом, после чего выпаривали до сухого состояния на вакуумном ротационном испарителе (тип 350 р, Польша) при температуре не выше +40°C.

Конъюгированную форму ИУК определяли после гидролиза водного остатка (после экстракции свободной формы) раствором 1 н NaOH в 30%-ном этиловом спирте на водяной бане. Дальнейшую экстракцию связанной формы ИУК проводили аналогично определению свободной (Методические рекомендации ..., 1988).

Качественный и количественный анализ ИУК проводили, используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Agilent 1200 LC с диодно-матричным детектором G 1315 В (США), на колонке Eclipse XDB-C 18 с параметрами 4,6 × 150 мм, размер частиц – 5 мкм. Элюирование фитогормона осуществляли в системе растворителей метанол:вода:уксусная кислота (59:40:1) в режиме *online*. Хроматограммы оцифровывали при помощи программного обеспечения Chem Station (версия В. 03.01) в режиме *offline*.

Опыты проводили в трех биологических и пяти аналитических повторностях. Цифровой материал обрабатывали статистически при по-

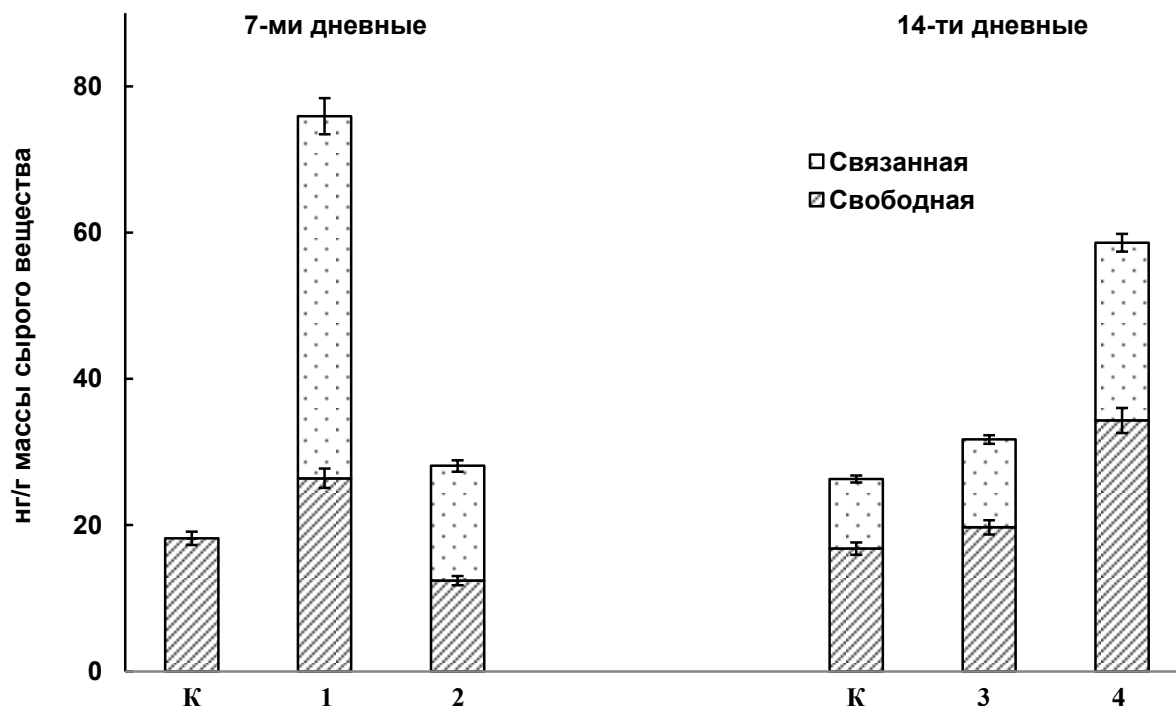


Рис. 1. Влияние кратковременных температурных стрессов на содержание ИУК в надземной части проростков *Triticum aestivum* L. сорта Ятрань 60 (нг/г массы сырого вещества). К – контроль; 1, 3 – холодовой стресс (+2°C, 2 ч); 2, 4 – теплового стресс (+40°C, 2 ч).

мощи программ MS Excel 2002 и Origin 6.0. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента, используя 5% уровень значимости ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных условиях пул эндогенной ИУК в надземной части у 14-дневных проростков был выше, чем у 7-дневных (рис. 1). У 7-дневных проростков присутствовала преимущественно свободная (активная) форма ИУК, конъюгированная была найдена в незначительном количестве. В процессе роста пул эндогенной ИУК увеличивался за счет аккумуляции конъюгированной формы.

После теплового стресса в надземной части проростков (особенно 14-дневных) пул эндогенной ИУК существенно возрастал. При этом у 7-дневных проростков преобладала конъюгированная форма, а у 14-дневных – свободная (рис. 1). Увеличение количества конъюгированной ИУК в листьях хрустальной травки было показано другими авторами после солевого стресса (Веденичева и др., 2010). Установлено также, что в корнях и листьях фасоли содержание свободной ИУК практически не изменялось, а конъюгированной – существенно возрастало пропорционально увеличению

концентрации NaCl (Шевякова и др., 2010). Таким образом, в надземной части проростков жаростойкого сорта озимой пшеницы Ятрань 60 при гипертермии на раннем этапе роста происходила аккумуляция связанной (неактивной) формы ИУК, тогда как на более позднем – свободной (активной) формы фитогормона. Поскольку одной из главных функций ИУК является регуляция ростовых процессов, можно предположить, что накопление свободной формы ИУК в надземной части 14-дневных проростков связано с жароустойчивостью сорта Ятрань 60, его способностью к активному росту в условиях гипертермии (Моргун та ін., 2008).

После холодого стресса произошла стремительная аккумуляция конъюгированной формы ИУК в надземной части 7-дневных проростков. Количество свободной формы ИУК при этом возросло в 1,4 раза. У 14-дневных проростков содержание ИУК увеличилось по сравнению с контролем, однако в меньшей степени, чем после теплового стресса (рис. 1). Следовательно, изменения в аккумуляции ИУК после холодого стресса в надземной части проростков на ранней фазе роста носили такую же направленность, которая наблюдалась после теплового стресса, однако были значительно более выраженными. В то же время уровень

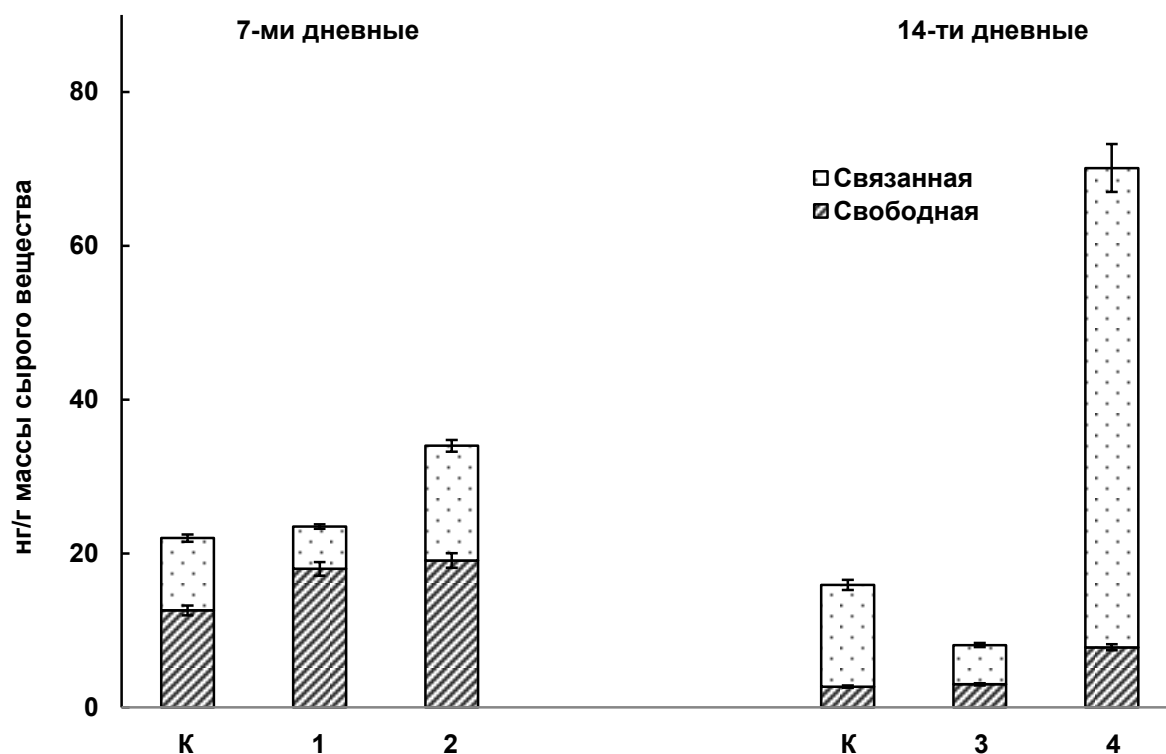


Рис. 2. Влияние кратковременных температурных стрессов на содержание ИУК в корнях проростков *Triticum aestivum* L. сорта Ятрань 60 (нг/г массы сырого вещества). К – контроль; 1, 3 – холодовой стресс (+2°C, 2 ч), 2, 4 – теплового стресс (+40°C, 2 ч).

фитогормона в проростках на более поздней фазе роста после холодового стресса мало изменялся по сравнению с контролем, что может быть связано с высокой устойчивостью сорта Ятрань 60 к низким температурам (Моргун та ін., 2008) и косвенно указывает на определенную стабилизацию ответной реакции.

В корнях 7-дневных проростков в физиологически нормальных условиях пул эндогенной ИУК был выше, чем у 14-дневных, для которых преобладающей была конъюгированная форма, а содержание свободной формы снижалось более чем в три раза (рис. 2). В процессе роста произошло перемещение градиента свободной формы ИУК из корней в надземную часть.

После теплового стресса пул эндогенной ИУК в корнях значительно увеличивался, особенно у 14-дневных проростков за счет конъюгированной формы. Имело место также накопление свободной формы фитогормона (более чем в два раза). У 7-дневных проростков содержание обеих форм было достаточно близким и несколько превышало показатели в контрольных условиях (рис. 2). Принимая во внимание, что ИУК активизирует рост корневой системы, можно предположить, что аккумуляция активной формы гормона в корнях проростков

после теплового стресса способствует росту корней, что увеличивает доступность влаги и питательных веществ и косвенно способствует возрастанию устойчивости к гипертермии. Из литературных источников известно, что накопление ИУК положительно влияло на образование корней у проростков пшеницы (Высоцкая и др., 2007).

Пул эндогенной ИУК в корнях 7-дневных проростков после холодового стресса изменялся незначительно, при этом наблюдалось преобладание свободной формы. После холодового стресса в два раза уменьшился пул эндогенной ИУК в корнях 14-дневных проростков, что происходило преимущественно за счет конъюгированной формы. В целом гипотермия отрицательно влияла на аккумуляцию ИУК в корнях 14-дневных проростков озимой пшеницы (рис. 2).

Таким образом, полученные нами данные указывают на вовлечение индолил-3-уксусной кислоты в ответные реакции растений пшеницы на изменения в температурном режиме. Тепловой и холодовой стрессы вызывали специфические изменения в аккумуляции и спектре свободной и конъюгированной форм ИУК, которые зависели как от органа проростка и его возраста, так и от вида стресса. После холодо-

ВЛИЯНИЕ ГИПО- И ГИПЕРТЕРМИИ

вого стресса градиент аккумуляции ИУК, а именно конъюгированной формы, перемещался в надземные органы проростков, причем этот процесс более активно проходил на ранних этапах развития. Тепловой стресс вызывал перемещение градиента аккумуляции ИУК, напротив, в корень проростков. Характер накопления конъюгированной формы ИУК после температурных стрессов позволяет предположить, что в надземных органах 7-дневных проростков жаростойкого сорта Ятрань 60 при гипотермии и в корнях 14-дневных при гипертермии в поддержании ауксинового гомеостаза были задействованы реакции конъюгирования.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику НАН Украины В.В. Моргуну за научное обсуждение, консультации по вопросам биологических особенностей и предоставление семенного материала сортов озимой пшеницы для проведения физиолого-биохимических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Блюм Я.Б., Красиленко Ю.А., Емец А.И. Влияние фитогормонов на цитоскелет растительной клетки // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 4. – С. 557-573.
- Веденчева Н.П., Войтенко Л.В., Мусатенко Л.И., Стеценко Л.А., Шевякова Н.И. Влияние засоления на содержания фитогормонов в листьях *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2010. – Вип. 3 (21). – С. 30-36.
- Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р., Фархутдинов Р.Г. Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом. – М.: Наука, 2007. – 158 с.
- Высоцкая Л.Б., Черкозьянова А.В., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Роль ауксинов и цитокининов в формировании боковых корней у растений пшеницы с частично удаленными первичными корнями // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 3. – С. 455-460.
- Гамбург К.З., Еникеева А.Г., Швецов С.Г. Влияние ауксина на поглощение меченых аминокислот и их включение в белок при переходе из состояния покоя к активной пролиферации // Физиология и биохимия культ. растений – 1992. – Т. 24, № 1. – С. 47-53.
- Косаківська І.В., Войтенко Л.В., Ліхнівський Р.В., Устінова А.Ю. Вплив короткочасних температурних стресів на вміст індоліл-3-оцтової кислоти у рослин із різними типами екологічних стратегій // Укр. бот. журн. – 2013 – Т. 70, №2. – С. 264-269.
- Маслова С.П., Табаленкова Г.Н., Куренкова С.В., Плюсіна С.Н. Сезонная динамика анатомо-морфологической структуры и содержание фитогормонов и сахаров в подземных побегах *Phalaroides arundinaceae* // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 4. – С. 555-561.
- Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев: Наук. думка, 1988. – 78 с.
- Моргун В.В., Санін Є.В., Швартау В.В. Клуб 100 центнерів. – К.: Логос, 2008. – 87 с.
- Терек О.І. Ріст рослин. – Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка, 2007. – 247 с.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Акимова Т.В. Динамика холодо- и теплоустойчивости растений при действии различных стресс-факторов на их корневую систему // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 1. – С. 94-99.
- Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. – М.: Наука, 2006. – 143 с.
- Шевякова Н.И., Мусатенко Л.И., Стеценко Л.А., Ракутин В.Ю., Веденчева Н.П., Войтенко Л.В., Кузнецов В.В., Сытник К.М. Влияние засоления на ростовые показатели растений *Phaseolus vulgaris* L., содержание фитогормонов и полиаминов // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42, № 6. – С. 483-490.
- Davies P.J. Regulatory Factors in Hormone Action: Level, Location and Signal Transduction // Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action / Ed. P.J. Davies. – Dordrecht: Kluwer, 2004. – P. 15-35.
- Del Pozo J.C., Lopez Mataz M.A., Ramirez-Parra E., Gutierrez C. Hormonal control of the plant cell cycle // Physiol. Plant. – 2005. – V. 123. – P. 173-183.
- Hager A. Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Auxin-Induced Elongation Growth: Historical and New Aspects // J. Plant Res. – 2003. – V. 116. – P. 483-505.

Поступила в редакцию
06.03.2014 г.

КОСАКОВСКАЯ и др.

INFLUENCE OF HYPO- AND HYPERTHERMIA ON CONTENT OF FREE AND CONJUGATED FORMS OF INDOLE-3-ACETIC ACID IN PLANTLETS OF *Triticum aestivum* L.

I. V. Kosakovskaya, L. V. Voytenko, R. V. Likhnyovskiy, A. Y. Ustinova

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
e-mail: science@botany.kiev.ua*

We analyzed the influence of short-term (2 hours), hypo- (+2°C) and hyperthermia (+40°C) on the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid (IAA) in the roots and leaves of 7- and 14-day-old seedlings of *Triticum aestivum* L. heat tolerance variety Yatran 60. During growth content of free form of IAA in roots decreased. In the leaves the level of conjugated forms of IAA increased. Heat stress was accompanied by an increase in the pool of endogenous IAA in leaves and roots. The accumulation of the conjugated forms of IAA more active occurred at the 14-day-old seedlings. Cold stress induced a significant increase in the level of conjugated IAA in the leaves of the 7-day-old seedlings. Conjugated IAA content in the roots of the 14-day-old seedlings after cold stress decreased. In the leaves the pool of endogenous IAA and the level of free form slightly increased. After cross-temperature stress endogenous IAA pool in the roots and leaves decreased threefold. It is shown that in the leaves of 7-day and 14-day-old roots of winter wheat seedlings in maintaining auxin homeostasis during hypothermia in the first case and hyperthermia in the second are involved reaction of conjugated.

Key words: *Triticum aestivum* L., free and conjugated indol-3-acetic acid, heat and cold temperature stresses

ВПЛИВ ГІПО- І ГІПЕРТЕРМІЇ НА ВМІСТ ВІЛЬНОЇ І КОН'ЮГОВАНОЇ ФОРМ ІНДОЛІЛ-3-ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ В ПРОРОСТКАХ *Triticum aestivum* L.

I. В. Косаківська, Л. В. Войтенко, Р. В. Лихнівський, А. Ю. Устінова

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної Академії наук України
(Київ, Україна)
e-mail: science@botany.kiev.ua*

Досліджували вплив короткочасної (2 год) гіпо- (+2°C) і гіпертермії (+40°C) на вміст вільної й кон'югованої форм індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) в коренях і надземній частині 7- та 14-добових проростків *Triticum aestivum* L. жаростійкого сорту Ятрань 60. В процесі росту вміст вільної форми ІОК в коренях контрольних рослин зменшувався. В надземній частині зростала кількість кон'югованої форми ІОК. Тепловий стрес викликав збільшення пулу ендогенної ІОК у надземній частині й коренях, при цьому нагромадження ІОК більш активно відбувалося у 14-добових проростків. Холодовий стрес спричиняв значне збільшення кількості кон'югованої ІОК у надземній частині 7-добових проростків. Після холодового стресу вміст кон'югованої ІОК у коренях 14-добових проростків зменшувався. Показано, що в надземній частині 7-добових і коренях 14-добових проростків озимої пшениці жаростійкого сорту Ятрань 60 у підтриманні ауксинового гомеостазу при гіпотермії в першому випадку й гіпертермії в другому задіяні реакції кон'югації. Виявлені зміни у вмісті вільної і кон'югованої форм ІОК мають специфічний характер, що залежить від виду стресу, органа й віку проростків.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., вільна і кон'югована індоліл-3-оцтова кислота, гіпотермія, гіпертермія