

УДК 581.1

КОНСТИТУТИВНАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ХОЛОДОВЫМ ЗАКАЛИВАНИЕМ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ОЗИМЫХ ЗЛАКОВ

© 2018 г. Е. И. Горелова¹, Ю. Е. Колупаев^{1,2}, Т. О. Ястреб¹,
Н. В. Швиденко¹, Ю. В. Попов³,
М. А. Шкляревский¹, Н. И. Рябчун³

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
(Харьков, Украина)

³Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева
Национальной академии аграрных наук Украины
(Харьков, Украина)

Сравнивали показатели антиоксидантной системы этилированных проростков озимых ржи (*Secale cereale* L.), тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в физиологически нормальных условиях и после холодого закаливания (воздействия температуры 2°C в течение 7 сут). Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в обычных условиях у трех злаков существенно не отличалась. В то же время активность гваяколпероксидазы (ГПО) у ржи была намного выше, чем у пшеницы и тритикале. Закаливание вызывало значительное повышение активности СОД у пшеницы и менее существенное в проростках ржи и тритикале. Активность ГПО после закаливания повышалась у всех злаков. Содержание сахаров у незакаленных проростков ржи и тритикале существенно превышало таковое у пшеницы. После холодого закаливания оно пропорционально повышалось у всех трех злаков. Базовое содержание пролина у ржи было значительно выше, чем у пшеницы и тритикале. Закаливание вызывало существенное повышение его содержания у ржи и менее заметное у других злаков. Наибольшее содержание антоцианов наблюдалось в проростках ржи, а наименьшим оно было у пшеницы. После закаливания оно повышалось у всех изучаемых злаков. Содержание бесцветных флавоноидов (поглощающих в УФ В) в обычных условиях и после действия закаливающей температуры у ржи и тритикале было выше, чем у пшеницы. Конститутивная морозоустойчивость (способность выживать после воздействия температуры – 6°C) была характерной только для ржи. Закаливание повышало морозоустойчивость трех злаков, при этом резистентность ржи и тритикале была выше, чем пшеницы. Сделано заключение, что в антиоксидантную защиту ржи больший вклад вносят высокие активность ГПО и содержание пролина, а тритикале – повышенное содержание флавоноидов и сахаров. В то же время у пшеницы при холодого адаптации более существенно изменялась активность антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы.

Ключевые слова: *Secale cereale*, \times *Triticosecale*, *Triticum aestivum*, холодого закаливание, окислительный стресс, антиоксидантные ферменты, пролин, антоцианы, флавоноиды, сахара

Одним из наиболее выраженных последствий влияния низких температур на рас-

тения является повышение вязкости липидной части клеточных мембран (Трунова, 2007). В связи с этим появляются предпосылки для нарушения мембраносвязанных процессов, в первую очередь фотосинтеза и дыхания (Rhoads et al., 2006; Foyer, Noctor, 2009). Если мембраноассоциированные процессы и процес-

Адрес для корреспонденции: Колупаев Юрий Евгеньевич, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, п/о Докучаевское-2, Харьков, 62483, Украина;
e-mail: plant_biology@ukr.net

КОНСТИТУТИВНАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

сы, осуществляемые в матриксе митохондрий и строме хлоропластов, не скоординированы, повышается вероятность акцептирования электронов от переносчиков электрон-транспортной цепи молекулярным кислородом с образованием активных форм кислорода (АФК) (Пиотровский и др., 2011). АФК, генерирующиеся в результате сбоя в работе электрон-транспортных цепей, в дальнейшем могут инициировать неферментативные реакции, приводящие к дополнительному увеличению их количества. В связи с этим, наряду со специфическими адаптивными реакциями, важное значение для выживания растений в условиях действия холода имеет функционирование антиоксидантной (АО) системы, которая предотвращает вторичные окислительные повреждения (Foyer, Noctor, 2009).

АО система включает в себя комплекс ферментов (супероксиддисмутазу – СОД, каталазу, различные пероксидазы, энзимы аскорбат-глутатионового цикла) и ряд низкомолекулярных соединений (аскорбиновая кислота, глутатион, флавоноидные соединения, антиоксиданты, растворимые в липидах – α -токоферол, β -каротин и др.) (Gill, Tuteja, 2010; Колупаев, 2016). В последние годы показано, что существенный вклад в предотвращение отрицательного действия АФК на клеточные компоненты вносят и некоторые соединения, для которых АО функции считаются не основными, в частности сахара (Синькевич и др., 2009) и пролин (Liang et al., 2013). Эти соединения у многих видов при холодовой адаптации накапливаются в значительных количествах (Koster et al., 1992; Синькевич и др., 2010). В ряде исследований показана прямая связь между накоплением сахаров и пролина и устойчивостью растений к гипотермии (Burbulis et al., 2011; Luo et al., 2011). С другой стороны, на некоторых объектах подобной связи не выявлено (Apostolova et al., 2008).

В то же время показано, что на ранних фазах развития у растений ржи, отличающихся от других злаков, в т.ч. озимой пшеницы, определенным уровнем конститутивной морозоустойчивости, проявляются специфические особенности функционирования АО системы. Для них характерны высокая активность гваяколпероксидазы, содержание пролина и антоцианов, обладающих значительной АО активностью (Колупаев и др., 2016).

В качестве модельного объекта зерновых злаков, наряду с пшеницей и рожью, для исследования функционирования протекторных си-

стем, обуславливающих морозоустойчивость, представляет интерес тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) – впервые целенаправленно и успешно созданный человеком межродовой гибрид. Его современные озимые сорта превосходят сорта пшеницы не только по морозоустойчивости, но и по продуктивности (Рибалка та ін., 2015).

Функционирование АО системы тритикале в связи с морозоустойчивостью изучено недостаточно. В ряде работ, выполненных с использованием польских сортов, показано повышение активности СОД, каталазы, неспецифической пероксидазы и аскорбатпероксидазы при холодовой адаптации (Golebiowska, 2011; Szechynska-Hebda et al., 2015; Gawronska, Golebiowska-Pikania, 2016). Установлено, что в период перезимовки в естественных условиях в узлах кушения тритикале содержание пролина было выше, чем у пшеницы, но ниже, чем у ржи (Катышева и др., 2015). Однако комплексное сравнение функционирования ферментативных и неэнзиматических составляющих АО системы тритикале с таковыми у пшеницы и ржи до сих пор не проводилось.

Целью работы было сопоставление основных показателей функционирования АО системы этиолированных проростков тритикале с соответствующими параметрами ржи и пшеницы в обычных условиях и при холодом закаливании.

МЕТОДИКА

Для исследований использовали 3-10-дневные этиолированные проростки озимых ржи (*Secale cereale* L., сорт Память Худоерко), тритикале (\times *Triticosecale* Wittm., сорт Паритет) и пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Досконала).

Семена после 30-минутного обеззараживания в 6% растворе пероксида водорода проращивали на очищенной водопроводной воде при температуре 20°C в течение 3 сут. Затем проростки помещали на 7 сут в холодильную камеру Danfoss (Нидерланды) для закаливания при температуре 2°C (Колупаев и др., 2015).

После окончания закаливания температуру в камере снижали со скоростью 1 градус/ч и подвергали проростки промораживанию при температурах – 6 или – 9°C в течение 5 ч. Далее температуру повышали со скоростью 1 градус/ч до 2°C, затем проростки отращивали 3 сут при температуре 20°C и определяли относительное количество выживших растений. В качестве контроля использовали 4-дневные проростки, не подвергавшиеся закаливанию. Поскольку

**Выживание (%) проростков озимых злаков после промораживания
при температурах – 6 и – 9°C в течение 5 ч**

Вид	Температура промораживания	
	– 6°C	– 9°C
	Без закаливания	
<i>Secale cereale</i>	23,6 ± 1,8	-
× <i>Triticosecale</i>	0,5 ± 0,2	-
<i>Triticum aestivum</i>	0,0	-
	После закаливания	
<i>Secale cereale</i>	73,9 ± 2,7	67,5 ± 2,0
× <i>Triticosecale</i>	72,2 ± 2,4	63,1 ± 3,3
<i>Triticum aestivum</i>	65,5 ± 3,5	48,6 ± 2,4

Примечание. Прочерк означает отсутствие определений.

при низкой температуре развитие проростков замедлялось, 10-дневные закаленные растения соответствовали 4-дневным, выращенным при 20°C. Побеги закаленных и незакаленных проростков использовали для биохимических анализов.

Активность антиоксидантных ферментов определяли по методикам, подробно описанным ранее (Колупаев и др., 2015). Навески побегов гомогенизировали на холоде в 0,15 М К,Na-фосфатном буфере (рН 7,6) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ) и дитиотреитола (1 мМ). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Активность цитозольной СОД (КФ 1.15.1.1), определяли при рН реакционной смеси 7,6, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при рН реакционной смеси 7,0 по количеству разложившегося пероксида водорода за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода. С помощью К,Na-фосфатного буфера рН реакционной смеси доводили до 6,2.

Суммарное содержание сахаров в растительном материале определяли методом Морриса-Роз с использованием антронового реактива (Zhao et al., 2003) с модификациями (Колупаев и др., 2015).

Содержание пролина в корнях и надземной части проростков пшеницы определяли по методу Бейтса и соавт. (Bates et al., 1973) с модификациями. Проллин экстрагировали из рас-

тительного материала дистиллированной водой с последующим 10-минутным кипячением, экстракт фильтровали и к порциям фильтрата добавляли равные объемы нингидринового реактива и ледяной уксусной кислоты и кипятили пробы в течение 1 ч на водяной бане. Светопоглощение окрашенного продукта определяли при длине волны 520 нм. В качестве стандарта использовали L-пролин.

Для определения содержания флавоноидов, которые имеют максимум поглощения в УФ-В области, и антоцианов навески растительного материала гомогенизировали в 1% растворе HCl в метаноле. После центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 15 мин определяли оптическую плотность супернатанта при 300 и 530 (Nogues, Baker, 2000).

Эксперименты проводили независимо три раза в трехкратной биологической повторности. На рисунках и в таблице приведены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между вариантами оценивали по критерию Стьюдента. Обсуждаются различия, достоверные при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проростки пшеницы и тритикале практически не проявляли конститутивной морозостойчивости и после 5 ч охлаждения при – 6°C почти полностью погибали (таблица). В то же время после такого воздействия около 24% незакаленных проростков ржи сохраняли жизнеспособность. После закаливания морозостойчивость проростков всех трех видов повышалась. При воздействии температуры – 6°C различия между злаками были незначительными. Однако после промораживания при – 9°C выживание проростков пшеницы было заметно ниже по сравнению с таковым у тритикале и ржи (таблица).

КОНСТИТУТИВНАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

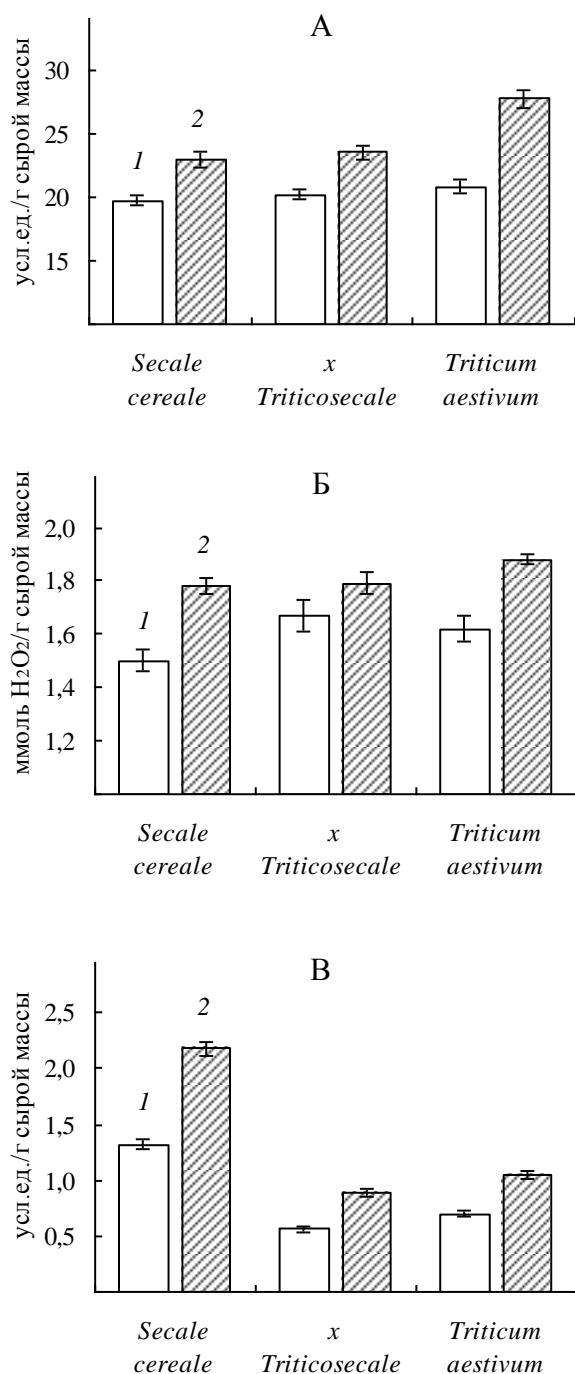


Рис. 1. Активность СОД (А), каталазы (Б) и ГПО (В) в проростках злаков.

Здесь и на рис. 2, 3: 1 – контроль; 2 – закаливание

Конститутивная активность СОД в проростках трех видов существенно не отличалась (рис. 1, А). После холодого закаливания возрастала активность фермента в проростках пшеницы. У других злаков отмечалась лишь тенденция к незначительному повышению активности СОД после закаливания.

Активность каталазы при оптимальной температуре в проростках злаков трех видов не отличалась незначительно (рис. 1, Б). Закаливание вызывало достоверное при $P \leq 0,05$ повышение активности фермента у пшеницы и тенденцию к ее увеличению у тритикале и ржи.

Базовая активность ГПО у ржи была значительно выше, чем у пшеницы и тритикале (рис. 1, В). В то же время у тритикале она была ниже, чем у пшеницы. После холодого закаливания активность фермента повышалась в проростках всех трех видов. При этом показатель активности ГПО у ржи превышал таковые у пшеницы и тритикале более чем в два раза.

Конститутивное содержание сахаров в проростках ржи и тритикале было заметно выше, чем у пшеницы (рис. 2, А). Закаливание вызывало повышение содержания сахаров в проростках трех видов, пропорциональное его количеству до закаливания.

При обычных условиях содержание пролина в проростках ржи было более чем в 2,5 раза выше, чем пшеницы (рис. 2, Б). Количество пролина у проростков тритикале незначительно превышало соответствующую величину, характерную для проростков пшеницы. Закаливание вызывало повышение содержания пролина у всех трех образцов. Наиболее высокие величины абсолютного содержания пролина наблюдались у растений ржи.

Базовое содержание антоцианов в проростках ржи приблизительно в пять раз превышало таковое у пшеницы (рис. 3, А). У тритикале оно было вдвое выше, чем у пшеницы. После закаливания содержание антоцианов повышалось в 1,4-1,5 раза у всех трех видов злаков.

Содержание бесцветных флавоноидов также было более высоким у ржи и тритикале (рис. 3, Б). У этих видов оно возрастало после закаливания, в то время как у пшеницы этот показатель почти не изменялся.

ОБСУЖДЕНИЕ

У этилированных проростков ржи, пшеницы и тритикале проявлялись заметные различия в функционировании протекторной АО системы в обычных условиях и после холодого закаливания. У незакаленных проростков ржи отмечались высокие показатели содержания пролина, антоцианов, флавоноидов, поглощающих в области УФ В, а также активности ГПО (рис. 1-3). Эти результаты согласуются с полученными ранее с использованием проростков из семян других генераций (Колупаев и др.,

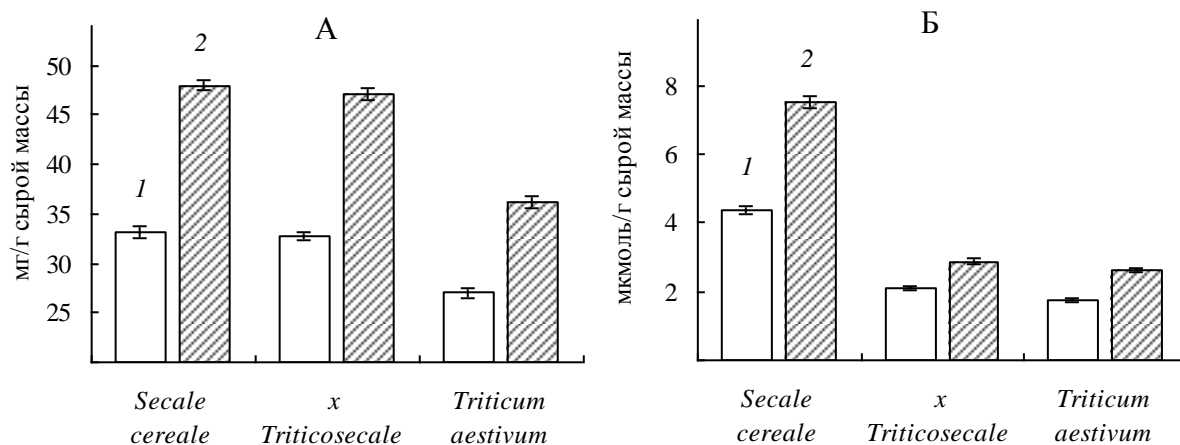


Рис. 2. Содержание сахаров (А) и пролина (Б) в проростках злаков.
Обозначения вариантов, как на рис. 1.

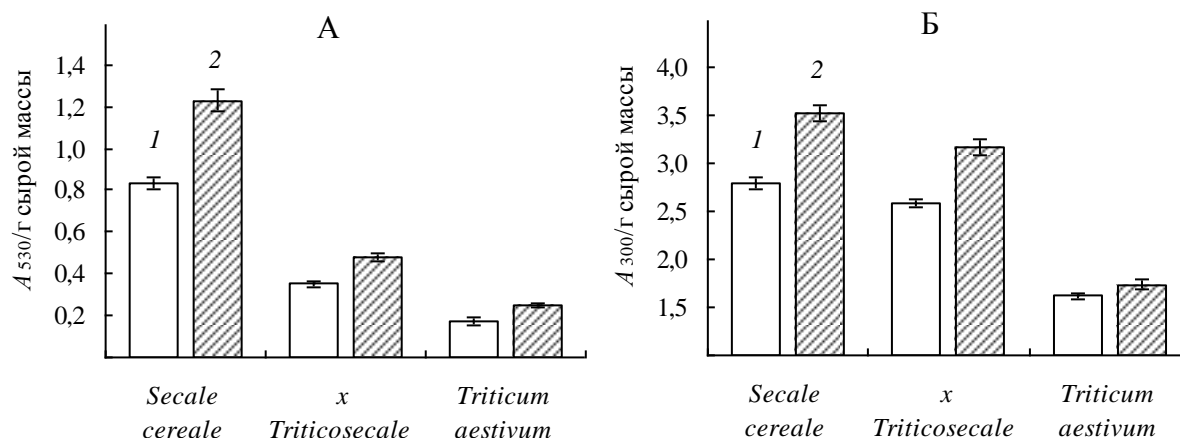


Рис. 3. Содержание антоцианов (А) и флавоноидов (Б) в проростках злаков.
Обозначения вариантов, как на рис. 1.

2015; 2016). Можно полагать, что высокий уровень указанных показателей обуславливает наличие у проростков ржи конститутивной морозоустойчивости. У проростков тритикале такая устойчивость практически не проявлялась (таблица). Однако в закаленном состоянии их резистентность приближалась к морозоустойчивости ржи и значительно превосходила таковую пшеницы. Повышенная устойчивость тритикале к низким температурам, по крайней мере, частично, может быть связана с более эффективным функционированием АО системы. Так, в условиях наших экспериментов для тритикале было характерно повышенное по сравнению с пшеницей содержание бесцветных флавоноидов, антоцианов и сахаров (рис. 2, 3). В то же время все эти показатели АО активности у тритикале были ниже, чем у проростков ржи. Кроме того, у проростков тритикале ак-

тивность пероксидазы была намного ниже, чем у проростков ржи. Более того, эта активность у тритикале была даже ниже, чем у пшеницы.

В целом можно говорить о более существенном вкладе низкомолекулярных протекторов в проявление свойства морозоустойчивости проростков злаков по сравнению с ферментативными антиоксидантами. Исследованные в настоящей работе низкомолекулярные защитные соединения являются полифункциональными. Так, пролин сочетает функции одного из основных совместимых осмолитов растительной клетки с функциями антиоксиданта (Szabados, Savoure, 2009). Также пролин рассматривается как низкомолекулярный шаперон (Liang et al., 2013), который может участвовать в поддержании нативной структуры ферментов, в т.ч. антиоксидантных.

КОНСТИТУТИВНАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

Существует гипотеза, согласно которой пролин может выступать и в качестве метаболического сигнала, регулирующего окислительно-восстановительный гомеостаз и экспрессию некоторых генов стрессового ответа у растений (Hossain et al, 2014). Однако экспериментальных доказательств участия пролина в регуляции экспрессии генов, причастных к адаптивным реакциям растений, пока недостаточно.

Тем не менее, пролин может играть очень важную роль в холодовой адаптации, по крайней мере, отдельных видов растений, в частности ржи. Во многих исследованиях, выполненных в лабораторных и полевых условиях, с растениями, находящимися на разных фазах развития, показано его участие в формировании и поддержании морозоустойчивости (Koster et al., 1992; Катышева и др., 2015; Колупаев и др. 2015; 2016). Так, при длительной холодовой акклимации ржи содержание пролина возрастало почти в 10 раз (Koster et al., 1992). При этом, как уже отмечалось, базовое содержание пролина у растений ржи было существенно выше, чем у пшеницы и тритикале (рис. 2, Б).

Общеизвестна роль сахаров в защите растительных клеток от повреждающего действия гипотермии. Давно выяснено, что при действии гипотермии (закаливающих температур) у злаковых происходит накопление углеводов в форме полифруктозанов, прежде всего в узлах кущения (Bancal, Gaudillere, 1989). Снижение температуры ниже 0°C вызывает у озимых злаков гидролитическое расщепление накопленных при закаливании олигосахаридов, что обуславливает дополнительное увеличение в клетках концентрации моно- и дисахаридов (Колупаев, Трунова, 1994; Livingston III, Henson, 1998). Одной из главных функций углеводов, накапливаемых при стрессах, считается их антиденатурационное действие на белково-липидные компоненты клеток, которые испытывают дегидратацию или влияние других альтерирующих факторов (Колупаев, Трунова, 1992). Показано, в частности, что сахароза может заменять воду в структуре фосфолипидов при стрессовых воздействиях, которые вызывают обезвоживание клеток (Caffery et al., 1988). Наряду с осмопротекторными, антиденатурационными и мембранопротекторными свойствами сахарам присущи и антиоксидантные свойства, обусловленные способностью связывать свободные радикалы (Синькевич и др., 2009). Растения арабидопсиса, обработанные глюкозой, генерировали меньше синглет-

ного кислорода и пероксида водорода (Ramel et al., 2009). Показано, что у растений картофеля экспрессия введенного гена инвертазы дрожжей приводила к снижению оттока сахаров из клеток листьев и, как следствие, их накоплению в фотосинтезирующих тканях, что способствовало повышению устойчивости трансформантов к развивающемуся при гипотермии окислительному стрессу (Синькевич и др., 2009). Содержание сахаров в растительных клетках значительно выше количества «специализированных» антиоксидантов, в частности, оно в несколько раз превышает количество аскорбиновой кислоты (Синькевич и др., 2010). В связи с этим, есть основания говорить о заметном вкладе сахаров в систему антиоксидантной защиты растений.

По-видимому, накопление сахаров имело важное значение для формирования морозоустойчивости проростков тритикале (рис. 2, А). Их количество у этой культуры было практически таким же, как у ржи и значительно превосходило этот показатель у проростков пшеницы. С другой стороны, в полевых условиях содержание сахаров в узлах кущения растений тритикале в течение зимы было ниже, чем у ржи и незначительно превышало их количество у пшеницы (Поморцев, 2013). Не исключено, что вклад сахаров в морозоустойчивость тритикале на разных фазах развития растений может быть неодинаковым, также возможны сортовые различия.

Еще одной группой соединений, важных для формирования морозоустойчивости злаков, по-видимому, являются различные флавоноиды, в т.ч. антоцианы и бесцветные флавоноиды, поглощающие в области УФ В, которые накапливались в больших количествах у ржи и тритикале (рис. 3). Вероятно, что все флавоноиды в той или иной степени участвуют в АО защите клеток. АО свойства флавоноидов объясняются их способностью служить ловушками для свободных радикалов, а также хелатировать ионы металлов, участвующих в радикальных процессах (Es-Safi et al., 2007). В сравнительных экспериментах получены данные об очень высокой антиоксидантной активности флавоноидов, во многом превосходящей активность других антиоксидантов. Так, показано, что эффективность взаимодействия флавоноидов с АФК в четыре раза выше, чем у аскорбиновой кислоты и α -токоферола (Khlestkina et al., 2013). Отдельно следует отметить высокую антиоксидантную активность антоцианов, в т.ч. их бесцветных таутомеров, которые способны эффек-

тивно инактивировать супероксидные анион-радикалы (Neill, Gould, 2003). Показано повышение содержания антоцианов и флавоноидов, имеющих максимум светопоглощения при 350 нм, у растений арабидопсиса при действии низкой температуры и избыточного освещения (Havaux, Kloppstech, 2001; Munne-Bosch et al., 2002). Повышение общего содержания флавоноидов зарегистрировано и при низкотемпературной адаптации пшеницы (Олениченко и др., 2008). У растений сорго и кукурузы при гипотермии индуцировался синтез антоцианов (Shichijo, 1993; Christie et al., 1994).

Для подтверждения связи изученных биохимических показателей, в частности, повышенного содержания флавоноидов и пролина с морозоустойчивостью проростков озимых злаков необходимы исследования ряда сортов тритикале и ржи, различающихся по морозоустойчивости. Такие исследования позволят ответить на вопрос о том, насколько велик вклад этих соединений в свойство морозоустойчивости молодых растений тритикале и ржи и не является ли их повышенное содержание видовой особенностью этих растений, лишь отчасти влияющей на устойчивость к гипотермии и окислительному стрессу.

Следует отметить, что у растений тритикале установлена связь между накоплением низкомолекулярных протекторов и развитием адаптации к ионам тяжелых металлов (Taebi et al., 2014), засухе (Akbarian et al., 2011) и засолению (Salehi, Arzani, 2014). Для констатации связи между повышенной морозоустойчивостью растений тритикале с резистентностью к окислительным повреждениям также целесообразны сравнительные исследования их устойчивости к непосредственным агентам окислительного стресса (пероксиду водорода, солям Fe (II) и пр.), которые проводились нами ранее на проростках ржи и пшеницы (Колупаев и др., 2016).

ЛИТЕРАТУРА

- Катышева Н.Б., Поморцев А.В., Дорофеев Н.В., Пешкова А.А., Рудиковская Е.Г. 2015. Динамика содержания пролина в узлах кущения озимых зерновых культур в течение осенне-весеннего периода. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 3 (36) : 45-53. (Katysheva N.B., Pomortsev A.V., Dorofeev N.V., Peshkova A.A., Rudikovskaya E.G. 2015. Dynamics of proline content in tillering nodes of winter cereal crops during autumn-spring period. Bull. Kharkiv. Natl. Agrar. Univ. Ser. Biology. (Visn. Kharkiv. Natsional. Agrar. Univer. Ser. Biologiya.) 3 (36) : 45-53.)
- Колупаев Ю.Е., Рябчун Н.И., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И. 2015. Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе. Физиология растений. 62 (4) : 533-541. (Kolupaev Yu.E., Ryabchun N.I., Vayner A.A., Yastreb T.O., Oboznyi A.I. 2015. Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii). 62 (4) : 499-506.)
- Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. 2016. Конститутивная и индуцированная холодом устойчивость проростков ржи и пшеницы к агентам окислительного стресса. Физиология растений. 63 (3) : 346-358. (Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Oboznyi A.I., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. 2016. Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii). 63 (3) : 346-358.)
- Колупаев Ю.Е. 2016. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений. Успехи соврем. биологии. 136 (2) : 181-198. (Kolupaev Yu.E. 2016. Plant cell antioxidants and their role in ROS signaling and plant resistance. Uspekhi Sovrem. Biologii. 136 (2) : 181-198.)
- Колупаев Ю.Е., Трунова Т.И. 1992. Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов. Физиология и биохимия культ. растений. 24 (6) : 523-533. (Kolupaev Yu.E., Trunova T.I. 1992. Metabolism features and carbohydrates protective functions in plants under stresses. Fiziologiya i Biochimiya Kult. Rastenii. 24 (6) : 523-533.)
- Колупаев Ю.Е., Трунова Т.И. 1994. Активность инвертазы и содержание углеводов в колеоптилях пшеницы при гипотермическом и солевом стрессах. Физиология растений. 41 (4) : 552-557. (Kolupaev Yu.E., Trunova T.I. 1994. Hypothermia and salt stress influence on invertase activity and carbohydrate content in wheat coleoptiles. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii). 41 (4) : 485-489.)
- Рибалка О.И., Моргун В.В., Моргун Б.В., Починок В.М. 2015. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. Физиология растений и генетика. 47 (2) : 95-111. (Rybalka O.I., Morgun V.V., Morgun B.V., Pochynok V.M. 2015. Agronomic potential and perspectives of triticale. Fiziologiya Rastenii i Genetica. 47 (2) : 95-111.)
- Пиотровский М.С., Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. 2011. Активация НАДФН-оксидазы плазмалеммы при действии низких положительных температур на этиолированные проростки кукурузы. Физиология растений. 58 (2) : 234-242. (Piotrovskii M.S., Shevyreva T.A., Zhestkova I.M., Trofimova M.S. 2011. Activation of plasmalemmal NADPH oxidase in etiolated maize

КОНСТИТУТИВНАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

- seedlings exposed to chilling temperatures. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastenii). 58 (2) : 290-298.
- Поморцев А.В. 2013. Физиологические и биохимические процессы, определяющие зимостойкость озимых зерновых культур в условиях Восточной Сибири: Автореферат канд. дис. Иркутск : 22 с.
- Pomortsev A.V. 2013. Fiziologicheskiye i biokhimicheskiye processy, opredelyayushchiye zimostoikost' ozimyykh zernovykh kul'tur v usloviyakh Vostochnoj Sibiri. PhD Thesis. Irkutsk : 22 p.)
- Синькевич М.С., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. 2009. Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом. Физиология растений. 56 : 186-192.
- Sin'kevich M.S., Deryabin A.N., Trunova, T.I. 2009. Characteristics of oxidative stress in potato plants with modified carbohydrate metabolism, Russ. J. Plan Physiol. (Fiziologiya Rastenii). 56 : 168-174.)
- Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. 2010. Участие сахаров в системе антиоксидантной защиты от индуцированного паракватом окислительного стресса у картофеля, трансформированного геном инвертазы дрожжей. Докл. АН. 434 (4) : 570-573. (Sinkevich M. S., Naraykina N. V., Trunova T.I. 2010. Involvement of sugars in the antioxidant defense against paraquat-induced oxidative stress in potato transformed with yeast invertase gene. Doklady Biological Sciences. 434 : 338-340.)
- Трунова Т.И. 2007. Растение и низкотемпературный стресс: 64-е Тимиряз. чт. Москва: Наука. 54 с. (Trunova T.I. 2007. Plant and Low Temperature Stress, the 64th Timiryazev Lecture (Rasteniye i nizkotemperaturnyj stress. 64-e Timiryazevskoye chteniye). Moscow: Nauka. 54 p.)
- Apostolova P., Yordanova R., Popova L. 2008. Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. Gen. Appl. Plant Physiol. 34 : 281-294.
- Akbarian A., Arzani A., Salehi M., Salehi M. 2011. Evaluation of triticale genotypes for terminal drought tolerance using physiological traits. Indian J. Agricult. Sci. 81 : 1110-1115.
- Bancal P., Gaudillere J.P. 1989. Oligofructan separation and quantification by high performance liquid chromatography. Application to Asparagus of-ficinalis and Triticum aestivum. Plant Physiol. Biochem. 27. : 745-750.
- Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39 : 205-210.
- Burbulis N., Jonytiene V., Kupriene R., Blinstrubiene A. 2011. Changes in proline and soluble sugars content during cold acclimation of winter rapeseed shoots in vitro. J. Food Agricult. Environ. 9 : 371-374.
- Caffery M., Tonseca V., Carl Leopold A. 1988. Lipid-sugar interaction: Relevance to anhydrous biology. Plant Physiol. 86 : 754-758.
- Christie P.J., Alfenito M.R., Walbot V. 1994. Anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. Planta. 194 : 541-549.
- Es-Safi N. E., Ghidouche S., Ducrot P.H. 2007. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. Molecules. 12. : 2228-2258.
- Foyer C.H., Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. Antioxid. Redox Signal. 11 : 861-906.
- Gawronska K., Golebiowska-Pikania G. 2016. The effects of cold-hardening and Microdochium nivale infection on oxidative stress and antioxidative protection of the two contrasting genotypes of winter triticale. Eur. Food Res. Technol. 242 : 1267-1276.
- Gill S.S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.
- Golebiowska G., Wedzony M., Plazek A. 2011. The responses of pro- and antioxidative systems to cold-hardening and pathogenesis differ in triticale (*Triticosecale* Wittm.) Seedlings Susceptible or Resistant to Pink Snow Mould (*Microdochium nivale* Fr., Samuels & Hallett). J. Phytopathol. 159 : 19-27.
- Havaux M., Kloppstech K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoids pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. Planta. 213 : 953-966.
- Hossain M.A., Hoque M.A., Burritt D.J., Fujita M. 2014. Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In: Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling. Academic Press is an imprint of Elsevier, 477-521.
- Khlestkina E.K. 2013. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. Cereal Res. Commun. 41 : 185-198.
- Koster K.L., Lynch D.V. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. Plant Physiol. 98 : 108-113.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. Antioxid. Redox Signal. 19 : 998-1011.
- Livingston III D.P., Henson C.A. 1998. Apoplastic sugars, fructan exohydro-lase and invertase in winter oat: responses to second phase cold hardening. Plant Physiol. 116 : 403-408.

- Luo Y., Tang H., Zhang Y. 2011. Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperatures. *J. Agr. Sci.* 3 : 89-96.
- Munne-Bosch S., Alegre L. 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21 : 31-57.
- Neill S.O., Gould K.S. 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biol.* 30 : 865-873.
- Nogues S., Baker N.R. 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under UV-B radiation. *J Exp Bot.* 51 : 1309-1317.
- Ramel F., Sulmon C., Bogard M. Couée I., Gouesbet G. 2009. Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol.* 9 : 28. Doi: 10.1186/1471-2229-9-28.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol.* 141 : 357-366.
- Salehi M., Arzani A. 2014. Evaluation of triticale genotypes for salt tolerance using physiological traits. *Emir. J. Food Agric.* 26 : 277-283.
- Shichijo C., Hamada T., Hiraoka M., Johnson C.B., Hashimoto T. 1993. Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta.* 191 : 238-245.
- Szabados L., Savoure A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15 : 89-97.
- Szechynska-Hebda M., Hebda M., Mierzwiński D., Kuczynski P., Mireka M., Wedzony M., van Lammerene A., Karpinski S. 2013. Effect of cold-induced changes in physical and chemical leaf properties on the resistance of winter triticale (*x Triticosecale*) to the fungal pathogen *Microdochium nivale*. *Plant Pathol.* 62 : 867-878.
- Talebi S., Nabavi Kalat S.M., Sohani Darban A.L. 2014. The study effects of heavy metals on germination characteristics and proline content of triticale (*Triticosecale* Wittmack). *Intl J Farm & Alli Sci.* 3 : 1080-1087.
- Zhao K., Fan H., Zhou S., Song J. 2003. Study on the salt and drought tolerance of *Suaeda salsa* and *Kalanchoe clavigrammontiana* under isoosmotic salt and water stress. *Plant Sci.* 165 : 837-844.

Поступила в редакцию
10.04.2018 г.

CONSTITUTIVE AND INDUCED BY COLD HARDENING ANTIOXIDANT ACTIVITY IN SEEDLINGS OF WINTER CEREALS

E. I. Gorelova¹, Yu. E. Kolupaev^{1,2}, T. O. Yastreb¹, N. V. Shvidenko¹,
Yu. V. Popov³, M. A. Shklyarevskiy¹, N. I. Ryabchun³

¹*Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)*

E-mail: plant_biology@ukr.net

²*Karazin Kharkiv National University
(Kharkiv, Ukraine)*

³*Yuryev Plant Production Institute of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine
(Kharkiv, Ukraine)*

The parameters of antioxidant system of etiolated seedlings of winter rye (*Secale cereale* L.), triticale (*x Triticosecale* Wittm.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) were compared in physiologically normal conditions and after cold hardening (2°C for 7 days). The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase under normal conditions in three cereals did not differ significantly. At the same time, the activity of guaiacol peroxidase (GPO) in rye was much higher than that of wheat and triticale. The hardening caused a significant increase in the activity of SOD in wheat and less significant in rye and triticale sprouts. The activity of GPO after hardening was increased in all cereals. The sugar content in non-hardened rye and triticale seedlings significantly exceeded that of wheat. After cold hardening, it was proportionally increased in all three cereals. The basic content of proline in rye was significantly higher than that of wheat and triticale. Hardening caused a significant increase in its content in rye and less noticeable in other cereals. The largest content of anthocyanins was observed in sprouts of rye, and the least was in wheat. After hardening, it increased in all cereals studied. The content of colorless flavonoids (absorbing in UV-B) under normal conditions and after the effect of hardening temperature in rye and triticale was higher than that of wheat. Constitutional

КОНСТИТУТИВНА І ІНДУЦІРОВАНА АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ

frost resistance (ability to survive after exposure to temperature -6°C) was characteristic only of rye. Hardening increased the frost resistance of three cereals, while the resistance of rye and triticale was higher than that of wheat. It is concluded that high activity of GPO and proline content make a greater contribution to antioxidant protection of rye, while it of triticale is associated with an increased content of flavonoids and sugars. At the same time, the activity of antioxidant enzymes – SOD and catalase – changed most significantly in wheat at cold adaptation.

Key words: *Secale cereale*, *x Triticosecale*, *Triticum aestivum*, cold hardening, oxidative stress, antioxidant enzymes, proline, anthocyanins, flavonoids, sugars

КОНСТИТУТИВНА ТА ІНДУКОВАНА ХОЛОДОВИМ ЗАГАРТУВАННЯМ АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ПРОРОСТКІВ ОЗИМИХ ЗЛАКІВ

О. І. Горелова¹, Ю. Є. Колупаєв^{1, 2}, Т. О. Ястреб¹, М. В. Швиденко¹,
Ю. В. Попов³, М. А. Шкляревський¹, Н. І. Рябчун³

¹Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
(Харків, Україна)

³Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва
Національної академії аграрних наук України
(Харків, Україна)

Порівнювали показники антиоксидантної системи етіолованих проростків озимих жита (*Secale cereale* L.), тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) і пшениці (*Triticum aestivum* L.) у фізіологічно нормальних умовах і після холодого загартування (впливу температури 2°C протягом 7 діб). Активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази за звичайних умов у трьох злаків істотно не відрізнялася. У той же час активність гваяколпероксидази (ГПО) у жита була набагато вищою, ніж у пшениці і тритикале. Загартування спричиняло значне підвищення активності СОД у пшениці і менш істотне у проростків жита і тритикале. Активність ГПО після загартування підвищувалася у всіх злаків. Вміст цукрів у незагартованих проростків жита і тритикале істотно перевищував такий у пшениці. Після холодого загартування він пропорційно підвищувався у всіх трьох злаків. Базовий вміст проліну у жита був значно вищим, ніж у пшениці і тритикале. Загартування викликало істотне підвищення його вмісту у жита і менш помітне у інших злаків. Найбільший вміст антоціанів спостерігався у проростків жита, а найменшим він був у пшениці. Після загартування він підвищувався у всіх досліджуваних злаків. Вміст безбарвних флавоноїдів, що поглинають в УФ В, за звичайних умов і після дії загартувальної температури у жита і тритикале був вищим, ніж у пшениці. Конститутивна морозостійкість (здатність виживати після впливу температури -6°C) була характерною тільки для жита. Загартування підвищувало морозостійкість трьох злаків, при цьому резистентність жита і тритикале була вищою, ніж пшениці. Зроблено висновок, що в антиоксидантний захист жита більший вклад вносять високі активність ГПО і вміст проліну, а тритикале – підвищений вміст флавоноїдів і цукрів. У той же час у пшениці під час холодової адаптації більш істотно змінювалася активність антиоксидантних ферментів – СОД і каталази.

Ключові слова: *Secale cereale*, \times *Triticosecale*, *Triticum aestivum*, холодове загартування, окислювальний стрес, антиоксидантні ферменти, пролін, антоціани, флавоноїди, цукри