


ХЛОРМЕКВАТХЛОРИД КАК МОДИФИКАТОР УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОТЕРМИИ *FRAGARIA ANANASSA* DUCH.

А.Ю. Ступина , аспирант

П.С. Прудников, к.б.н


ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, д. Жилина, Орловский район, Орловская область, Россия, info@vniispk.ru

Аннотация

Адаптация растений к действию различных стрессоров одно из важных условий для приспособления и противостояния экстремальным условиям окружающей среды. Цель работы заключалась в изучении влияния хлормекватхлорида на работу антиоксидантной системы *Fragaria ananassa Duch.* в условиях понижения температуры в осенний период. Объектами исследования являлись сорта земляники садовой Царица и Урожайная ЦГЛ. В первой декаде сентября проводили некорневые обработки раствором регулятора роста «Атлет» содержащий хлормекватхлорид. Активность антиоксидантной системы защиты (каталаза, пролин, сахара) и анализ напряженности процессов липопероксидации (перекись водорода, малоновый диальдегид) проводили в листьях земляники садовой. Показано, что обработка сортов земляники хлормекватхлоридом, в осенний период, способствовала снижению процессов липопероксидации в тканях листа, тогда как в контрольных вариантах прослеживалось увеличение содержания малонового диальдегида (МДА): у сорта Царица на 14,5%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 40,4%. Это свидетельствует о лучшей сохранности структурно-функциональной целостности клеточных мембран растений, обработанных препаратом «Атлет». Увеличение устойчивости произошло как за счет модификации антиоксидантной активности, так и снижения образования активных форм кислорода (АФК) на примере пероксида водорода (H₂O₂). В обработанных хлормекватхлоридом растениях сорта Царица содержание перекиси водорода в тканях листа было на 46,9%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 35,5% ниже контрольных вариантов. При анализе активности каталазы у опытных растений отмечалась интенсификация работы фермента на 19,8% и 22,9%, тогда как у контрольных вариантов изменений не отмечено. Количество аминокислоты пролин у сортов Царица и Урожайная ЦГЛ увеличилось на 27,1% и 32,3% соответственно, тогда как в контроле у сорта Царица на 12,2%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 9,2%.

Ключевые слова: земляника садовая; малоновый диальдегид; перекись водорода; каталаза; пролин; сахара;

CHLORMEQUATCHLORIDE AS A MODIFICATOR OF RESISTANCE TO HYPOTERMIA *FRAGARIA ANANASSA* DUCH.

A.Yu.Stupina , postgraduate student
P.S. Prudnikov, cand. biol. sci.

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, prudnikov@inbox.ru

Abstract

One of the important criteria for adapting and resisting to extreme environmental conditions is an adaptation to action of different stressors. The purpose of the research was to study the influence of chloromequatchloride on the physiological and biochemical processes of *Fragaria ananassa* Duch. For our research, we used the cultivars of strawberry Tsaritsa and Urozhaynaya TsGL. At the first decade of September, foliar applications were carried out with the solution of the growth regulator "Athlete", which contained a chloromequatchloride. The activity of antioxidant protection system (catalase, proline, sugars) and the analysis of the intensity of lipoperoxidation processes (hydrogen peroxide, malondialdehyde) were carried out in the leaves of strawberries. It was shown, that the treatment of strawberry cultivars with chloromequatchloride in autumn contributed to a decrease in the processes of lipoperoxidation in plant tissues, whereas an increase in the content of MDA was observed in the control variants: in Tsaritsa by 14.5%, and in Urozhaynaya TsGL by 40.4%. This indicates about better safety of the structural and functional integrity of the cell membranes in plants, which were treated by the "Athlete" preparation. The increase of resistance was occurred both due to the modification of antioxidant activity and a decrease in the formation of ROS, on the example of hydrogen peroxide. The content of H₂O₂ was less in the leaf tissues of the plants treated with chloromequatchloride: by 46.9% in Tsaritsa, and in Urozhaynaya TsGL by 35.5% lower than in the control variants. When analyzing the catalase activity in experimental plants, the ferment intensification was noted by 19.8% and 22.9% respectively, while no changes were noted in the control variants. The amount of amino acid in Tsaritsa and in Urozhaynaya TsGL increased by 27.1% and 32.3%, respectively, while in the control cultivar Tsaritsa by 12.2%, and in Urozhaynaya TsGL by 9.2%.

Key words: strawberry; malondialdehyde; hydrogen peroxide; catalase; proline; sugars

Введение

Изменения в активности антиоксидантной системы и интенсивности окислительных реакций происходят при воздействии на растения различных факторов стресса. Для формирования устойчивости наибольшее значение имеет функционирование антиоксидантной системы защиты. Она состоит из низко- и высокомолекулярных соединений (Холявка и др., 2014; Прудников, Гуляева, 2015), из-за чего поддерживается структурное и функциональное состояние клеток. Интенсивность развития перекисного окисления мембран при образовании активных форм кислорода, может быть характерной чертой реакции растений на стресс (Барабой и др., 1992; Загоскина, Назаренко, 2016). О

повреждении клеточных мембран можно судить по накоплению продуктов перекисного окисления липидов, таких как малоновый диальдегид (МДА), наличию активных форм кислорода, например перекись водорода (H_2O_2), а также активности антиоксидантных ферментов (каталазы). Из этого следует, что интенсивность процессов липопероксидации и активность антиоксидантной системы являются своего рода признаками устойчивости растений к факторам стресса (Колупаев и др., 2014; Андреева, 1988).

Большое значение имеет поиск регуляторов роста способствующих увеличению устойчивости растений к неблагоприятным условиям осенне-зимнего периода. Известно, что хлорхолинхлорид входящий в состав препарата «ТУР» благоприятно влиял на морозоустойчивость винограда (Кучер, 1983). Хлормекватхлорид входящий в состав препарата «Атлет», является аналогом хлорхолинхлорида.

В связи с этим целью работы являлось изучение влияния хлормекватхлорида на работу антиоксидантной системы *Fragaria ananassa Duch.* в условиях понижения температуры в осенний период. (Кучер, 1983)

Материалы и методика исследования

Исследования проводили в ФГБНУ ВНИИСПК на базе лаборатории физиологии устойчивости плодовых растений.

Объектами исследований служили сорта земляники садовой Урожайная ЦГЛ и Царица. Опытные растения на участке были размещены рендомизированно в 10 кратной повторности по однострочной схеме посадки 20×70 см, год посадки 2019 г.

В сентябре проводили некорневую обработку растений земляники садовой, препаратом «Атлет», где действующим веществом является хлормекватхлорид. Для приготовления рабочего раствора брали 1,5 мл препарата на 1 л воды. Обработку выполняли 3 раза через 7 дней. Анализы проводили в два этапа. Первую пробу листьев для исследования брали при температуре +5°C, а вторую при -5°C. Контрольными вариантами служили растения обработанные водой.

Оценку интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили на основе определения содержания малонового диальдегида (Стальная, Гаришвили, 1977; Прудников, Ожерельева, 2019), содержание пероксида водорода, как одного из представителей активных форм кислорода определяли по методу, основанному на образовании окрашенного комплекса пероксида титана (Kumar, Knowles, 1993). Для определения содержания свободного пролина применяли качественную реакцию с нингидриновым реактивом (Bates и др., 1973). Активность каталазы определяли по количеству выделяющегося кислорода (Третьяков, 2003). Для определения содержания сахаров в растительной ткани использовали резарциновый реактив (Туркина, Соколова, 1972). Достоверность результатов оценивали в программе MS Excel по Доспехову (Доспехов, 1985).

Результаты исследования

При проведении анализа в октябре при температуре +5°C увеличение МДА в контрольных сортах оказалось выше. Так, у сорта Царица на 14,5%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 40,4%, по сравнению с опытными растениями, обработанными хлормекватхлоридом. Аналогичная картина отмечена в ноябре при температуре -5°C. Так у сорта Царица накопление МДА в контроле выше на 37,0%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 39,0%. При сравнении показателей МДА при различных температурных условиях показано, что изменение содержания малонового диальдегида на фоне снижения температуры, как в контрольном сорте Царица, так и при обработке, было на недостоверном уровне.

В варианте с обработкой сорта земляники садовой Урожайная ЦГЛ интенсивность липопероксидации при понижении температуры не изменилась, тогда, как в контрольном варианте увеличилась на 29,7%. (рисунок 1).

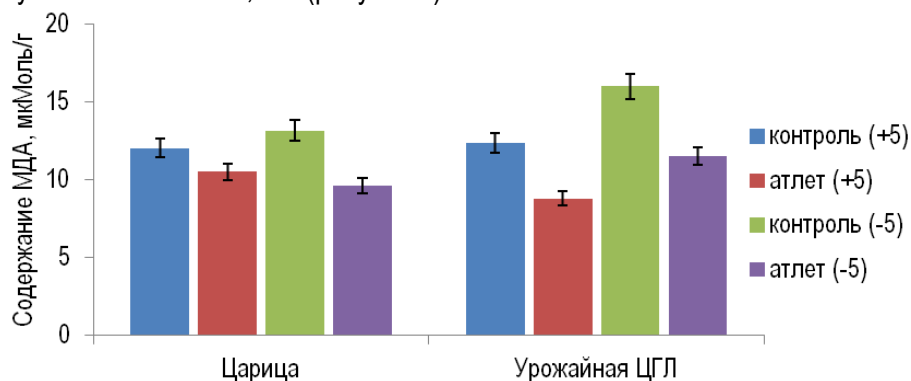


Рисунок 1 – Количество малонового диальдегида в тканях листьев растений земляники при использовании хлормекватхлорида в различных температурных условиях

О более значительном развитии липопероксидации и повреждении структурно-функциональной целостности клеточных мембран под влиянием понижения температуры, может свидетельствовать повышенное содержание МДА в контролях по отношению к опытным вариантам, где обработка хлормекватхлоридом, затрудняла развитие ПОЛ.

При проведении исследования наличия активных форм кислорода, в октябре, при температуре +5°C, о количестве которых судили по пероксиду водорода, видно, что в обработанных хлормекватхлоридом растениях сорта Царица содержание H_2O_2 в тканях листа на 46,9% меньше, чем в контрольных вариантах. Это прослеживалось так же и у сорта Урожайная ЦГЛ. В растениях обработанных препаратом рост пероксида водорода был ниже на 35,5%, чем в контрольных растениях.

Так же, это замечено и в ноябре при температуре -5°C в контрольных образцах растений сорта Царица содержание пероксида водорода на 33,3% больше чем в обработанных растениях, а у сорта Урожайная ЦГЛ в контрольных растениях содержание H_2O_2 на 44,0% больше, чем в опытных образцах.

По мере снижения температуры происходит интенсивность липопероксидации, которая связана с увеличением образования активных форм кислорода. При исследовании выявлено, что при понижении температуры количество пероксида водорода в опытных образцах сорта Царица повысилось на 15,5%, тогда как в контрольных растениях было на недостоверном уровне. Напротив, на растениях сорта Урожайная ЦГЛ при минусовой температуре по сравнению с положительной в обработанных растениях рост перекиси составил 58,8%, тогда как в контрольных растениях 68,8% (рисунок 2).

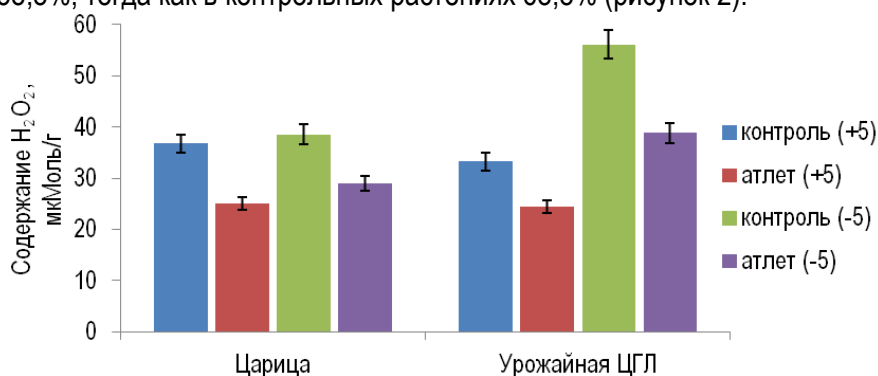


Рисунок 2 – Количество пероксида водорода в листьях растений земляники при использовании хлормекватхлорида в различных температурных условиях

Таким образом, при понижении температуры воздуха усиленное образование активных форм кислорода в контрольных растениях вызывает развитие окислительного стресса, а у опытных вариантов развитие свободно-радикальных процессов оказалось значительно ниже. Это может быть связано и с увеличением активности антиоксидантной системы и низким образованием АФК.

В октябре при температуре +5°C в обработанных растениях сорта Царица активность антиоксидантного фермента каталазы оказалась на недостоверном уровне против контрольных растений. А в растениях сорта Урожайная ЦГЛ обработанных препаратом на 10,0% меньше, чем в контрольных.

При температуре -5°C в ноябре активность каталазы в контрольных растениях сорта Царица на 15,7% ниже, а у сорта Урожайная ЦГЛ на недостоверном уровне.

Так у опытных вариантов активность фермента возросла на 19,8% и 22,9%, тогда как у контрольных вариантов изменения в активности каталазы не отмечено (рисунок 3).

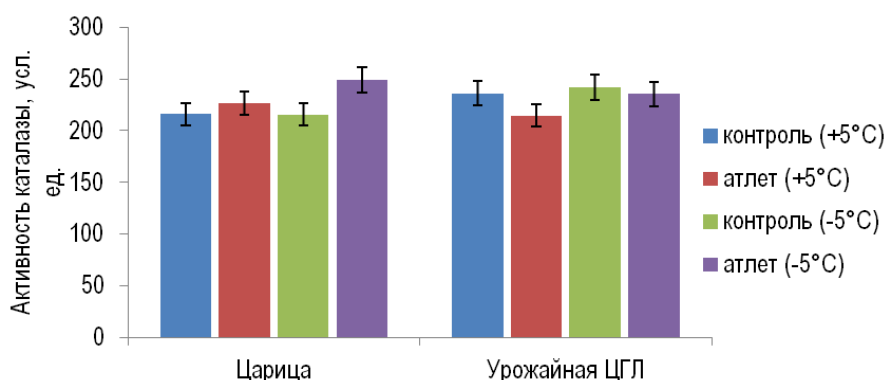


Рисунок 3 – Активность каталазы в листьях растений земляники при использовании хлормекватхлорида в различных температурных условиях

Так же важно было определить влияние обработки хлормекватхлоридом растений земляники садовой на содержание пролина – низкомолекулярного антиоксиданта. Данная аминокислота позволяет предотвратить образование внутриклеточного льда, за счет повышения концентрации клеточного сока. Так же пролин на фоне работы высокомолекулярных антиоксидантов способен гасить избыточное количество АФК.

При проведении анализа в октябре при температуре +5°C хлормекватхлорид не оказал влияние на содержание пролина. Однако в ноябре обработка препаратом способствовала увеличению аминокислоты у сорта Царица на 21,6%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 27,5% против контроля.

Увеличению содержания свободного пролина способствовал, вызванный отрицательной температурой, высокий уровень окислительного стресса. Количество аминокислоты у сортов Царица и Урожайная ЦГЛ увеличилось на 27,1% и 32,3% соответственно, тогда как в контроле у сорта Царица на 12,2%, а у сорта Урожайная ЦГЛ на 9,2% (рисунок 4).

Необходимо было рассмотреть и содержание сахаров в тканях листьев, которые участвуют в антиоксидантной защите. При проведении анализа в октябре при температуре +5°C содержание сахаров в растениях обработанных хлормекватхлоридом было выше на 50,0% у сорта Царица и на 31,6% у сорта Урожайная ЦГЛ по сравнению с их контролями.

Это же наблюдалось и в ноябре при температуре -5°C, когда содержание сахаров у сорта Царица было выше на 78,0% по отношению к контрольным растениям, а у сорта Урожайная на 86,7%.

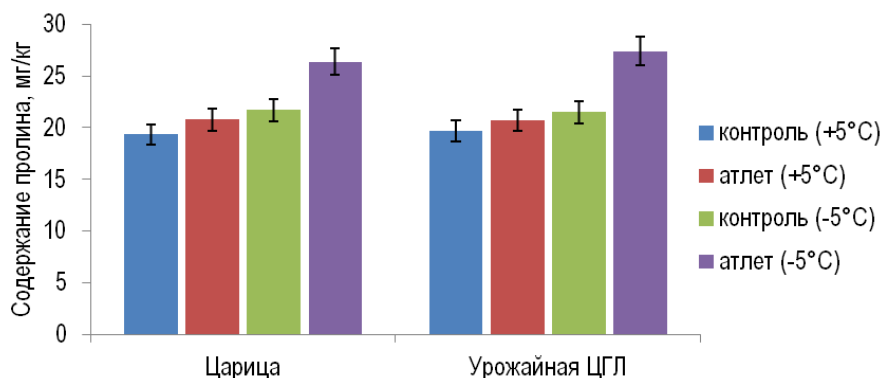


Рисунок 4 – Количество свободного пролина в листьях растений земляники при использовании хлормекватхлорида в различных температурных условиях

Так на фоне снижения температуры содержание сахаров у сорта Царица было выше на 61,7%, у сорта Урожайная ЦГЛ на 63,0%, тогда как в контрольных растениях увеличение сахаров составило 35,8% и 14,8% соответственно (рисунок 5).

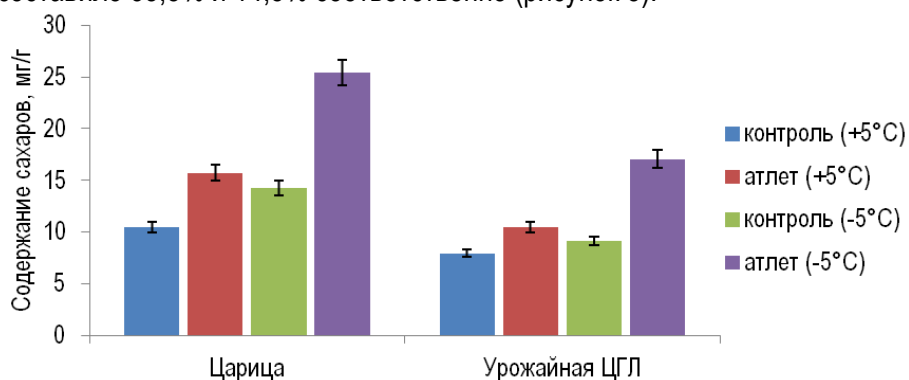


Рисунок 5 – Количество сахаров в листьях растений земляники при использовании хлормекватхлорида в различных температурных условиях

Выводы

Обработка растений земляники садовой хлормекватхлоридом, в осенний период, способствовала снижению процессов липопероксидации в растительных тканях, что свидетельствует о нормальной структурно-функциональной целостности клеточных мембран. Увеличение устойчивости растений *Fragaria ananassa* Duch. сортов Царица и Урожайная ЦГЛ произошло за счет модификации антиоксидантной активности, а так же за счет снижения количества АФК.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М.: Наука. 1988. 128 с.
2. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
3. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат. 1985. 351с.

4. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник московского городского педагогического университета. Серия: естественные науки, 2016. № 2. С. 9-24.
5. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. Пролин: физиологические функции и регуляция содержания в растениях в стрессовых условиях // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія, 2014. №. 2. С. 6-22.
6. Кучер Г.М. Влияние хлорхолинхлорида на физиолого-биохимические процессы и морозоустойчивость винограда: дис. ... канд. биол. наук. Одесса, 1983. 236 с.
7. Мусаев Ф. А., Захарова О. А., Кобелева А. В. Эффективность применения регулятора роста при выращивании земляники садовой в открытом грунте // Вестник ВГАУ. 2017. №1. С. 27-33. DOI: 10.17238/issn2071-2243.2017.1.27
8. Прудников П.С., Гуляева А.А. Особенности действия гипертермии на гормональную систему и антиоксидантный статус *Prunus Armeniaca* L. // В сборнике: Селекция и сорторазведение садовых культур Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 170-летию ВНИИСПК, 2015. С. 151-154.
9. Прудников П.С., Ожерельева З.Е. Физиолого-биохимические методы диагностики устойчивости плодовых культур к засухе и гипертермии (методические рекомендации). Орел: ВНИИСПК, 2019.
10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина. 1977. С. 66-68.
11. Третьяков Н.Н., Паничкин Л.А., Кондратьев М.Н. Практикум по физиологии растений. М.: Колос, 2003. 288 с.
12. Туркина М.В., Соколова С.В. Изучение мембранного транспорта сахарозы в растительной ткани // Физиология растений. 1972. Т. 19. Вып. 5. С. 912-919.
13. Холявка М.Г., Карпова С.С., Калаев В.Н., Лепешкина Л.А., Агапов Б.Л., Артюхов В. Г. Оценка оксидативного статуса растений, произрастающих в различных условиях // Фундаментальные исследования. 2014. № 8. Ч. 4. С. 891-897.
14. Bates L.S., Waldren R.P. Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. V. 39. P. 205-207. DOI: 10.1007/BF00018060
15. Cao Y.-Y., Yang M.-T., Li, X., Zhou Z.-Q., Wang X.-J., Bai, J.-G. Exogenous Sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents // Scientia Horticulturae. 2014. Vol. 179. P. 67-77. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.09.016
16. Kumar G.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers // Plant Physiology. 1993. Vol. 102, N 1. P. 115-124. DOI: 10.1104/pp.102.1.115

References

1. Andreeva, V.A. (1988). *Peroxidase enzyme*. Moscow: Nauka. (In Russian).
2. Baraboi, V.A., Brekhan, I.I., Golotin, V.G., & Kudryashov, Yu.B. (1992). *Peroxidation and stress*. St. Petersburg: Nauka. (In Russian).
3. Dosepov, B.A. (1985). *Methods of the Field Experiment (with statistic processing of investigation results)*. Moscow: Agropromizdat. (In Russian).
4. Zagoskina, N.V., & Nazarenko, L.V. (2016). Active oxygen species and antioxidant system of plants. *Vestnik of Moscow city university. Series: natural sciences*, 2, 9-24. (In Russian, English abstract).

5. Kolupaev, Yu. E., Vayner, A.A. & Yastreb, T.O. (2014). Prolin: physiological functions and regulation of content in plants under stress conditions. *The bulletin of KHarkiv national agrarian university. Series biology*, 2, 6-22. (In Russian, English abstract).
6. Kucher, G.M. (1983). *The influence of chlorcholinechloride on the physiological and biochemical processes and frost resistance of grapes. (Biol. Sci. Cand. Thesis)*. Tairov Research Institute of Viticulture and Wine-Making, Odessa, USSR. (In Russian).
7. Musaev, F. A., Zakharova, O. A. & Kobeleva, A.V. (2017). The efficiency of growth regulator in the cultivation of garden strawberry in the open ground. *Vestnik of Voronezh state agrarian university*, 1, 27-33. (In Russian & English abstract).
8. Prudnikov, P.S., & Gulyaeva, A.A. (2015). Features of hyperthermia effect on the *Prunus armeniaca* L. hormonal system and antioxidant status. In: *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops: Proc. Sci. Conf.* (pp. 151-154). Orel: VNIISPК (In Russian, English abstract).
9. Prudnikov, P.S, & Ozherelieva, Z.E (2019). *Physiological and biochemical methods for diagnosing the resistance of fruit crops to drought and hyperthermia*. Orel: VNIISPК. (In Russian).
10. Stalnaia, I.D., & Garishvili, T.G. (1977). Method for determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. In: V.N. Orekhovich (Ed.) *Modern methods in biochemistry* (pp. 66-68). Moscow: Medicine. (In Russian).
11. Tretiakov, N.N., Panichkin, L.A., & Kondratiev, M.N. (2003). *Workshop on plant physiology*. Moscow: Kolos (In Russian).
12. Turkina, M.V., & Sokolova, S.V. (1972). Study of membrane transport of sucrose in plant tissue. *Physiology of plants*, 19(5), 912-919 (In Russian).
13. Kholyavka, M. G., Karpova, S. S., Kalaev, V. N., Lepeshkina, L. A., Agapov, B. L., & Artyukhov, V. G. (2014). Assessment of the oxidative status of the plants growing in various conditions. *Fundamental research*, 8(4), 891-897. (In Russian, English abstract).
14. Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
15. Cao, Y.-Y., Yang, M.-T., Li, X., Zhou, Z.-Q., Wang, X.-J., & Bai, J.-G. (2014). Exogenous Sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents. *Scientia Horticulturae*, 179, 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.016>
16. Kumar, G.N.M., & Knowles, N.R. (1993). Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiology*, 102(1), 115-124. <https://doi.org/10.1104/pp.102.1.115>