

ИЗУЧЕНИЕ СОРТСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ МЕМБРАН У ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

Зульфугарова С.Т., Омарова С.А., Рустамова С.М., Гусейнова И.М.

Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАНА, AZ1073, Баку, пр. Матбуат 2А

E-mail: zulfugarova@bk.ru

Термостабильность мембран при гипертермии исследовалась у 12 различных сортов пшеницы, различающиеся по стрессоустойчивости, продуктивности и по другим физиологическим параметрам. 7-ми суточные проростки были подвергнуты тепловому шоку в течении 5-ти минут при температурах 49-57⁰С. С целью определения полного выхода электролитов из тканей экстракты растений выдерживали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Экзоосмос из интактных тканей растения регистрировали кондуктометром (Horiba Scientific). На основе этих данных были рассчитаны коэффициенты повреждаемости мембран, которые являются прямыми количественными показателями термopовреждения мембран и обратными – термостабильности. Сортоспецифические различия данных параметров позволили распределить исследуемые сорта пшеницы по степени теплоустойчивости. Максимальное значение полного выхода электролитов было обнаружено у сортов Шираслан-23, Муров-2, а минимальное – у сортов Вугар, Гызылбугда и Тартар-2.

Ключевые слова: пшеница, тепловой стресс, коэффициент повреждаемости мембран, выход электролитов

Введение

Глобальное потепление является одной из важных экологических проблем в мире, которая отрицательно влияет на сельское хозяйство. Высокая температура отрицательно влияет на рост, развитие, а также значительно ограничивает ожидаемый урожай растений. Зерновые культуры очень чувствительны к гипертермии, особенно в период формирования репродуктивных органов. Проблема повышения устойчивости растений к таким неблагоприятным условиям внешней среды имеет большое практическое значение [14]. Теплоустойчивость - с генетической точки зрения, полигенный признак, находящийся под контролем не просто нескольких геномов, а всего генотипа растения в целом [3]. При действии высоких температур одновременно с термостабильностью индуцируется экспрессия генов белков теплового шока (БТШ) [5,8]. БТШ - это группа белков, синтез которых происходит при стрессовых воздействиях. Они также являются молекулярными шаперонами и играют важную роль в белок-белковых взаимодействиях, при фолдинге и сборке сложных белков, стабилизируют белки и облегчают их транспорт через мембраны [13,19]. Стрессовые факторы внешней среды, к воздействию которых проявляется устойчивость растений, могут быть как специфическими, зависящими от особенностей воздействия и вида растения, так и неспецифическими, возникающими при действии любых неблагоприятных факторов и играющими наиболее важную роль. При более высоких температурах резко повышается проницаемость цитоплазматических мембран, а затем наступает коагуляция белков и отмирание клеток. Биомембраны – это системы, чувствительные к абиотическим и биотическим факторам [9]. Основными показателями термостабильности мембран являются повышенная стойкость и сохранение структурной целостности в условиях стресса [12]. Это стало основой для интереса в изучении термостабильности мембран, выражающейся в устойчивости и лучшем сохранении их структурной целостности в стрессовых условиях. Как известно, стресс – «это совокупность всех неспецифических изменений, возникающих под влиянием любых сильных

воздействий» [6]. Сущность неспецифических реакций (таких как гипертермия) в большей степени сводится к изменениям, которые впоследствии обнаруживаются в мембранных образованиях клетки. Ввиду того, что мембраны играют роль естественного барьера, они, являясь мишенями первичного воздействия и первой линией защиты, раньше других компонентов клетки подвергаются действию теплового стресса. Изменения, происходящие при этом в мембранах, становятся причиной каскадного сдвига в метаболизме всей клетки [10].

Основным свойством биологических мембран является их проницаемость. Она способствует пропуску в клетку и из неё различных метаболитов (аминокислот, ионов, сахаров и т.д.), что имеет незаменимое значение для гомеостаза и осморегуляции [7]. Отсюда следует, что изменение мембранной проницаемости для растворённых веществ, в особенности для электролитов, является одним из показателей устойчивости растений к тепловому шоку (ТШ). Устойчивость связана с многочисленными физиологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими изменениями, включая преобразования физических свойств мембран [1]. Между термостабильностью мембран и выносливостью различных сортов пшеницы была установлена прямая корреляция. При действии высоких температур одновременно с термостабильностью индуцируется экспрессия генов белков теплового шока (БТШ). БТШ-это группа белков, синтез которых происходит при стрессовых воздействиях. Они также являются молекулярными шаперонами и играют важную роль в белок-белковых взаимодействиях, при фолдинге и сборке сложных белков, стабилизируют белки и облегчают их транспорт через мембраны.

В природных условиях засуха и высокие температуры оказывают комплексное воздействие [15]. Исследование этих процессов необходимо для понимания разносторонней природы регуляции выносливости растений к неблагоприятным условиям среды и для поиска и идентификации мембранных и молекулярных маркеров устойчивости растений, в которых нуждается сельскохозяйственная практика [16]. Целью данной работы было изучение изменения проницаемости клеточных мембран различных сортов пшеницы для оценки устойчивости к тепловому стрессу.

Материал и методы

Объектами исследования служили 7-суточные проростки 12 различных сортов пшеницы (Тартар-2, Шираслан-23, Гобустан, Нурлу-99, Гиймятли-2/17, Леягтли-80, Муров-2, Гызыл бугда, Гырмызы гюль, Гобустан, Вугар и Фарандоле) взятые из генофонда пшеницы научно-исследовательского института земледелия, различающиеся по стрессоустойчивости, продуктивности и по другим физиологическим параметрам. Устойчивость к гипертермии определялась на листьях недельных проростков, выращенных в водяной культуре в чашках петри при температуре 18-20°C. Перед посевом, в течение 20 минут, семена обрабатывали в 3% растворе перекиси, затем на 24 часа оставили их в темноте. Проросшие семена пересадили на сеточку с влажной марлей. При воздействии высоких температур в диапазоне 49–57° С, учитывая возможность оценки термостабильности биомембран по изменению их проницаемости для электролитов [17,18, 19], мы изучали динамику экзоосмоса электролитов из интактных растительных тканей листьев.

Проницаемость мембран. Измельчённые и взвешенные листья проростков (250 мг) помещали в эрлейнмеровские колбы с 25 мл дистиллированной воды и в течение 5 минут прогревали в водном термостате с интервалом 1°C. Данный режим был выбран согласно методическому указанию, что кратковременное воздействие высоких температур является проверкой на первичную термостабильность растительных клеток. Контрольным образцом служили проростки листьев без тепловой обработки. Прогретые колбы инкубировали в воде в течение 2 часов в лабораторном шейкере. С целью определения полного выхода электролитов из тканей, принимаемого за 100%, выдерживали колбы с образцами на кипящей водяной бане

в течение 30 мин. После охлаждения колб, по выходу электролитов из интактных растительных тканей, определяли проницаемость мембран. Для этого с помощью кондуктометра (*Horiba Scientific*) регистрировали электропроводность водных экстрактов. Проницаемость мембран установили по концентрации электролитов в жидком экстракте, вычисленной в процентах от полного выхода.

Значения выхода электролитов использовали для вычисления коэффициента повреждаемости (КП) мембран по формуле [19]:

$$\text{КП} = \frac{L_D - L_0}{100 - L_0} \times 100(\%), \text{ где}$$

L_D - выход электролитов из прогретой ткани, % от полного выхода;

L_0 - выход электролитов из тканей контрольных растений, % от полного выхода.

Коэффициент повреждаемости мембран – это величина, являющаяся прямым количественным показателем термopовреждения мембран и обратным – термостабильности.

Результаты и обсуждения

Одна из начальных неспецифических ответных реакций растений на температурный стресс – это увеличение проницаемости мембран, связанная с множеством структурно-функциональных изменений, происходящих в мембранах. По этой причине проницаемость рассматривается в качестве интегрального показателя состояния мембран. Усиленный выход электролитов из клеток является доказанным диагностическим показателем повреждения растительных мембран и их термостабильности [2].

На рисунке приведены кривые зависимости динамики экзоосмоса электролитов из интактных тканей листьев недельных проростков сортов пшеницы – от воздействия температур в диапазоне 49-57⁰С с интервалом в 1⁰С. При 5-минутном нагревании листьев, высокая температура вызывало увеличение проницаемости мембран, что сказывалось на усилении утечки электролитов из тканей растений всех сортов. Динамика экзоосмоса, при разных температурах различалась у всех сортов (Таблица). Проницаемость мембран сортов Вугар, Тартар-2, Нурлу-99, Тале-38 и Гобустан оставалось постоянным или увеличивалось медленно и слабее до 52⁰С, чем у остальных трёх сортов (Фарандоле, Шираслан-23 и Муров-2). При температуре 50⁰С наблюдалось существенное повышение проницаемости мембран сортов Фарандоле, Шираслан-23, а при 52⁰С - у Муров-2. Температуру, при которой наблюдалось значительное повышение проницаемости мембран можно назвать температурным порогом повреждения мембран (ТППМ) [9]. ТППМ является качественным показателем характеристики мембран. Различия в величинах ТППМ рассматривается как свидетельство ответных реакций мембран разных сортов на тепловой стресс.

Итак, согласно нашим данным, наибольшая термостабильность мембран свойственна генотипам Тале-38, Вугар и Тартар-2, наименьшая – сортам Муров-2 и Фарандоле, а промежуточная – Нурлу-99, Шираслан-23 и Гобустан. Как было отмечено выше, с целью определения полного выхода электролитов из тканей, принимаемого за 100%, выдерживали колбы с образцами на кипящей водяной бане в течение 30 мин. При 100⁰ Наибольший выход электролитов из прогретой ткани наблюдался у сорта твёрдойпшеницы Тартар-2 (≥200%), а наименьший - у растений сорта Муров -2 (96%).

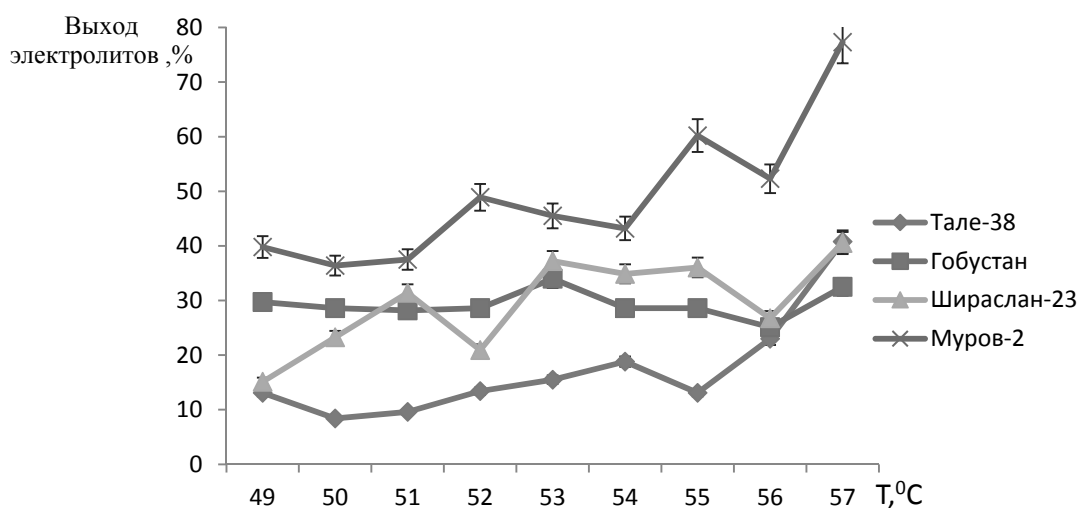


Рисунок. Температурная зависимость проницаемости мембран для электролитов листьев разных сортов пшеницы.

Между устойчивостью растений воздействию высоких температур и термостабильностью мембран, установленной для пшеницы наблюдается прямая корреляция [11]. По результатам наших исследований сорта Шираслан-23, Фарандоле и Муров-2 можно считать низкоустойчивыми, сорта Нурлу-99 и Гобустан - среднеустойчивыми, а генотипы Тартар-2, Вугар и Тале38 – высокоустойчивыми. На основе результатов динамики экзоосмоса электролитов из тканей были рассчитаны КП мембран (таблица).

Таблица.

Коэффициент повреждаемости мембран у различных генотипов пшеницы при температурном интервале 49-57°C

Генотипы	49°C	50°C	51°C	52°C	53°C	54°C	55°C	56°C	57°C	100°C	Конт роль
Тартар-2	6.9	9.6	10.1	11.2	10.6	9.6	12.2	14.9	20.7	200.0	25.0
Вугар	3.5	6.13	12.30	11.40	12.30	10.54	14.90	17.54	25.43	130.0	7.0
Шираслан-23	12.5	15.0	15.5	16.5	16.0	15.0	17.5	20.0	25.5	105.0	19.0
Фарандоле	8.2	12.2	25.7	19.0	13.5	9.5	23.0	35.2	43.3	102.0	22.0
Гырмызы гюль	32.8	34.3	37.4	33.8	40.4	35.3	35.3	44.4	27.3	115.0	13.0
Нурлу99	21.3	20.9	23.0	31.1	31.1	25.7	29.0	31.7	34.3	105.0	11.0
Гобустан	29.7	28.6	28.2	28.6	34.0	28.6	29.6	25.1	32.5	150.0	20.0
Муров-2	39.8	36.4	37.5	48.9	45.5	43.2	60.2	60.0	81.0	96.0	11.0
Леягетли-80	13.6	11.7	15.4	23.6	21.8	19.0	18.1	32.8	21.8	123.0	13.0
Гийметли-2/17	22.1	18.8	22.1	27.0	28.7	27.0	27.8	30.3	32.0	135.0	12.0
Тале38	13.1	8.4	9.6	13.4	15.5	18.8	13.1	23.0	40.8	148.0	25.0
Гызыл бугда	5.0	19.6	15.5	18.8	25.4	15.5	18.1	33.6	39.4	136.0	14.0

Как было указано выше, величина КП является относительной мерой выхода электролитов из тканей, индуцированного только действием температуры [4], поэтому она является прямым количественным показателем термopовреждения мембран и обратным – термостабильности. Исходя из данных в таблице, можно прийти к выводу, что у всех сортов КП мембран возрастал прямо пропорционально температуре нагрева. Наименьшая величина КП наблюдалась у сортов Вугар, Тартар-2 и Гызыл бугда, а наибольшая у генотипов-Гырмызыгюль и Муров-2.

Работа выполнена при поддержке гранта (EIF-KETPL-2-2015-1(25)-56/35/3) Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики.

Литература

1. **Александров В.Я.**, Кислюк И.М.(1994). Реакция клеток на действие теплового шока. Физиологический аспект. Физиол. растений. 36(1), 43–49.
2. **Корогаева Н.Е.**, Антипина А.И., Грабельных О.И., Варакина Н.Н., Боровский Г.Б., Войников В.К. 2001. Митохондриальные низкомолекулярные белки теплового шока и устойчивость митохондрий злаков к гипертермии. Физиол. растений. 48 (6), 917–922
3. **Кошкин, Е. (2018).** *Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур*. Litres.
4. **Лукаткин, А. С., Шаркаева, Э. Ш., & Зауралов, О. А. (1993).** Динамика изменений экзосмоса электролитов из листьев кукурузы при различной интенсивности холодового стресса. *Физиол. растений*, 40(5), 770-775.
5. **Нилова, И. А., Топчиева, Л. В., & Титов, А. Ф. (2015).** Экспрессия генов БТШ у пшеницы при действии высоких температур. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*, (12).
6. **Селье Г. (1972).** На уровне целостного организма. М.: Наука, 122 с.
7. **Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. (1973).** Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент (Диссертация).
8. **Чиркова, Т. В. (1997).** Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям. *Соросовский образовательный журнал*, 9, 12-17.
9. **Хохлова, Л. П. (2016).** Экспрессия генов стрессовых белков и идентификация молекулярных маркеров устойчивости растений к повышенным температурам и засухе. *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки*, 158(2).
10. **Хохлова, Л. П.Р. Н. Валиуллина, Д. Р. Мидер, Н. И. Акберова (2015).** Термостабильность мембран и экспрессия генов низкомолекулярных белков теплового шока (мБТШ) при действии на растения повышенных температур и водного дефицита.
11. **Blum, A., Klueva, N., & Nguyen, H. T. (2001).** Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica*, 117(2), 117-123.
12. **Marcum, K. B. (1998).** Cell membrane thermostability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass. *Crop Science*, 38(5), 1214-1218.
13. **Pandey, B., Kaur, A., Gupta, O.P., Sharma, I., Sharma, P. (2015).** Identification of HSP20 Gene Family in Wheat and Barley and Their Differential Expression Profiling Under Heat Stress. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175 (5), 2427-2446
14. **Prasad, P. V. V., Djanaguiraman, M., Jagadish, S. V. K., & Ciampitti, I. A. (2018).** Drought and High Temperature Stress and Traits Associated with Tolerance. *Sorghum: State of the Art and Future Perspectives*, (agronmonogr58).
15. **Schauberger, B., Archontoulis, S., Arneith, A., Balkovic, J., Ciaias, P., Deryng, D., ... & Pugh, T. A. (2017).** Consistent negative response of US crops to high temperatures in observations and crop models. *Nature communications*, 8, 13931.
16. **Sung D.V., Kaplan F., Lee K.J., Guy C.L. (2003).** Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* 8, 179–187.

17. **Wahid, A.,** Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
18. **Xu, Y.,** Wang, J., Bonos, S. A., Meyer, W. A., & Huang, B. (2018). Candidate Genes and Molecular Markers Correlated to Physiological Traits for Heat Tolerance in Fine Fescue Cultivars. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 116.
19. **Xu, Y.,** Zhan, C., & Huang, B. (2011). Heat shock proteins in association with heat tolerance in grasses. *International journal of proteomics*, 2011

Zülfüqarova S.T., Öməröva S.A., Rüstəmovə S.M., Hüseynova İ.M.

HİPERTERMİYA ZAMANI BUĞDA BİTKİSİNDƏ MEMBRANLARIN SORTSPESİFİK TERMOSTABİLLİYİNİN TƏDQIQI

Hipertermiya zamanı membranların termostabilliyi stresə davamlılığına, məhsuldarlığına və digər fizioloji parametrlərə görə fərqlənən 12 buğda sortunda tədqiq edilmişdir. 7 günlük cücərtilər 5 dəq müddətində 49-57⁰S temperaturlarda istilik şokuna məruz qoyulmuşdur. Eyni zamanda bitki ekstraktları toxumalardan elektrolitlərin tam çıxımını müəyyən etmək məqsədilə 30 dəq müddətində qaynayan su hamamında saxlanılmışdır. İntakt bitki toxumalarından ekzoosmos konduktometrlə (*Horiba Scientific*) registrasiya edilmişdir. Alınan nəticələr əsasında membranların termozədələnməsinin bir-başə kəmiyyət göstəricisi və termostabilliyin əks göstəricisi olan membranların zədələnmə əmsalları hesablanmışdır. bu parametrlərin sortspesifik müxtəlifliyi tədqiq olunan buğda sortlarını istiliyə davamlılığına görə paylaşmağa imkan vermişdir. Elektrolitlərin tam çıxımının maksimal qiyməti Şiraslan-23 və Murov-2 sortlarında, minimal qiyməti isə Vüqar, Qızıl buğda və Tərtər-2 sortlarında müşahidə edilmişdir.

Açar sözlər: buğda, istilik stresi, membran zədələnmə əmsalı, elektrolit çıxımı

Zulfugarova S.T., Omarova S.A., Rustamova S.M., Huseynova I.M.

MEASUREMENT OF MEMBRANE THERMOSTABILITY IN DIFFERENT WHEAT CULTIVARS EXPOSED TO HEAT STRESS

The membrane thermostability was detected in 12 wheat genotypes differing in stress tolerance, productivity and other physiological parameters, during heat stress. 7-day-old seedlings were exposed to heat shock for 5 minutes at 49-57⁰C. In order to determine the total electrolyte leakage from the tissues, plant extracts were kept in a boiling water bath for 30 minutes. Electrolyte leakage from the leaf tissue was recorded with a conductivity meter (*Horiba Scientific*). Based on these indicators, was calculated membrane damage rate (MDR). According to our calculations, the highest MDR was found in cultivars Shiraslan-23, Murov-2 and the lowest rates were detected in Vugar, Gyzyll bugda and Tartar-2.

Keywords: wheat, heat stress, membrane damage rate (MDR), electrolyte leakage

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 4.XII.2018