

І.В. КОСАКІВСЬКА, Л.В. ВОЙТЕНКО, А.Ю. УСТІНОВА
Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 201601, Україна

ВПЛИВ КОРОТКОЧАСНИХ ТЕМПЕРАТУРНИХ СТРЕСІВ НА ВМІСТ АБСЦИЗОВОЇ КИСЛОТИ В РОСЛИН ІЗ РІЗНИМИ ТИПАМИ ЕКОЛОГІЧНИХ СТРАТЕГІЙ

Ключові слова: Festuca pratensis, Rumex patientia × R. tianshanicus, Brassica campestris, Amaranthus caudatus, абсцизова кислота, температурний стрес, екологічна стратегія

Характеру і ролі пристосувальних змін, які відбуваються на різних організаційних рівнях і є основою формування екологічних стратегій рослин, останнім часом приділяється значна увага (Ackerly et al. 2000; Косаківська, 2007; Пяттигин, 2008;). Двовимірна класифікація екологічних стратегій, котра враховує як вплив негативних чинників, так і позитивних умов і біологічну продуктивність (Grime, 1974), а також співвідношення величини потенційного росту рослини та фактично реалізованого (Миркин и др., 1999), на сьогодні визнана в широких наукових колах. Згідно з нею виділяють три групи рослин: *віоленти*, *патієнти* та *експлеренти*. *Віоленти* — конкурентоспроможні рослини, однаково нестійкі до дії стресів і відхилень від норм. *Патієнти* — зростають у несприятливих умовах і переживають стрес із допомогою спеціальних адаптаційних пристосувань. *Експлеренти* здатні швидко рости в сприятливих умовах за низької конкуренції та переходити до генеративного розвитку в несприятливих умовах; вони чутливі до абіотичних і біотичних стресів.

Складна, багатокомпонентна гормональна система рослин забезпечує координацію і регуляцію основних фізіологічних процесів — таких, як ріст, розвиток, фотосинтез, дихання тощо. Фітогормони діють у дуже низьких концентраціях на рівні 10^{-6} — 10^{-12} М, не беручи при цьому безпосередньої участі в активованих ними біохімічних реакціях (Дерфлінг, 1985). Одним із основних фітогормонів, задіяних у формуванні адаптаційного синдрому, вважається абсцизова кислота (АБК) (Wilkinson, Davies, 2002). У рослинних тканинах знайдено вільну та зв'язану форми АБК. Зв'язана форма утворюється з об'єднання складного ефіру абсцизової кислоти й D-глюкози. На впливи різноманітних стресових чинників рослини реагують різким зростанням вмісту вільної форми АБК в органах і тканинах, яке відбувається, перш за все, за рахунок гідролізу зв'язаних форм (Hansen, Dorffling, 1999).

Нині відома незначна кількість наукових публікацій, присвячених порівняльному аналізу фітогормонів у рослин із різними типами екологічних стратегій. Так, при визначенні вмісту АБК у трьох видів експлерентів і двох патієнтів

встановлено, що концентрація фітогормону на 1 г сирової речовини вища в експлерентів (Усманов и др., 1990). З'ясовано також, що в експлерентів вміст АБК вищий у коренях, а в пацієнтів — у надземній частині рослини (Борзенкова и др., 2001).

Нашим завданням було дослідити зміни вмісту вільної та зв'язаної форм АБК у рослин із різними типами екологічних стратегій у відповідь на короткочасні (тепловий і холододовий) температурні стреси. Ми зробили припущення, що характер змін у вмісті фітогормону стресу, яким є абсцизова кислота, має корелювати з певними адаптивними ознаками досліджуваних рослин.

Матеріали та методи дослідження

Добираючи об'єкти для дослідження, ми віддали перевагу новим перспективним кормовим та енергоємним культурам місцевої флори й інтродуцентам.

Як віолент була відібрана *Festuca pratensis* Huds. — багаторічний нещільно кущовий верховий злак, який характеризується потужною кореневою системою, що дозволяє ефективно використовувати ґрунтові ресурси. Як пацієнт вибрали нову кормову рослину — гібрид від схрещування *Rumex patientia* L. і *R. tianschanicus* A. Los. Він характеризується високою екологічною пластичністю, зимостійкістю, стійкістю до засолення й підвищеної вологості. Як експлеренти були відібрані *Brassica campestris* L. — холодо- і зимостійка кормова, сидеральна, технічна та медоносна культура, котра має С-3 тип фотосинтезу, й *Amaranthus caudatus* L. — високоврожайна, екологічно пластична культура, посухо- та солестійка, витривала до хвороб, має С-4 тип фотосинтезу.

Відкаліброване за розміром насіння перші 2 доби пророщували в чашках Петрі на зволоженому фільтрувальному папері в термостаті за температури +20 °С і постійної темряви. Після цього чашки Петрі переносили на світло (фотоперіод — 16 год світла : 8 год темряви). Для вивчення впливу короткочасних температурних стресів на вміст ендогенної АБК 7-добові проростки впродовж 2 год надавали впливу температури +40° і +4 °С. Проростки зважували на електронних вагах ОНАУS Adventurer (Китай) по 30 мг у трьох повторах і фіксували в камері для глибинного заморожування (Jouan VX100, Чехія) за температури –82 °С.

Фракцію АБК виділяли за допомогою охолодженого 80 %-ного етанолу з додаванням 1—2 мкл антиоксиданту (0,02 %-ного діетилдитіокарбому натрію). Спиртові екстракти упарювали до водного залишку для видалення полісахаридів і виморожували. Аліквоту водного залишку доводили розчином 2N HCl до рН 3,0 і центрифугували 20 хв при 10000 g на центрифугі К-24 фірми «Janetski» (НДР).

Вільні форми АБК тричі екстрагували дітиловим ефіром із супернатанту. Ефірний екстракт випаровували до сухого залишку на вакуумному ротаційному випаровувачі (типу 350 р, ПНР) за температури не вище +40 °С. Зв'язані форми АБК визначали, провівши гідроліз водного залишку (після екстракції вільних форм) у 1N NaOH у 30 %-ному етиловому спирті на водяній бані. Подальшу екстракцію зв'язаних форм АБК здійснювали аналогічно визначенню вільних. Додаткове очищення фракції АБК проводили за допомогою кислотноружної реекстракції та методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пласти-

нах Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРН) у системі розчинників хлороформ : етилацетат : льодяна оцтова кислота (70 : 30 : 5). Зони хроматограм, які відповідали R_f стандарту АБК, елюювали етанолом, після чого елюати упарювали досуха.

Якісний і кількісний аналіз АБК здійснювали з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на рідинному хроматографі Agilent 1200 LC з діодно-матричним детектором G 1315 В (США), на колонці Eclipse XDB-C 18 із параметрами 4,6 × 150 мм, розмір часток — 5 мкм. Елюцію фітогормонів проводили в системі розчинників метанол : вода : оцтова кислота (59 : 40 : 1) в ізокритичному режимі. Хроматограми обраховували за допомогою програмного забезпечення Chem Station (версія В.03.01) у режимі *offline*. Досліді здійснювали в трьох біологічних і п'яти аналітичних повторях. Цифровий матеріал обробляли статистично за допомогою програм «Excel 2002» та «Origin 6.0». Достовірність різниці оцінювали за критерієм Ст'юдента, використовуючи 5 %-ний рівень значущості ($P \leq 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення

Екстремальні температури належать до найбільш розповсюдженого в природі стресового чинника, що спричиняє порушення водного режиму, уповільнює ріст і знижує продуктивність рослин. У процесі еволюції в рослин на різних організаційних рівнях сформувався певний комплекс захисних реакцій, який регулюється фітогормонами. Відомо, що одним із перших під впливом абіотичних стресових чинників змінюється вміст АБК. Під дією стресових темпе-

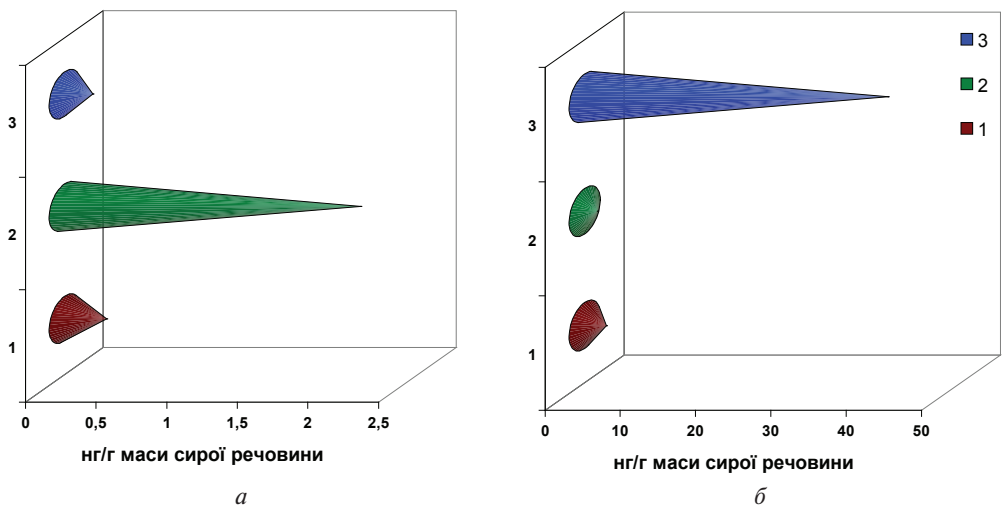


Рис. 1. Вплив короточасних температурних стресів на вміст вільної і зв'язаної форм АБК у проростках *Brassica campestris*: а — вільна, б — зв'язана форми; 1 — тепловий, 2 — холодний стреси, 3 — контроль

Fig. 1. Effect of short-term temperature stress on the level of free and conjugated forms of ABA in seedlings of *Brassica campestris*: а — free form, б — conjugated form; 1 — heat stress, 2 — cold stress, 3 — control

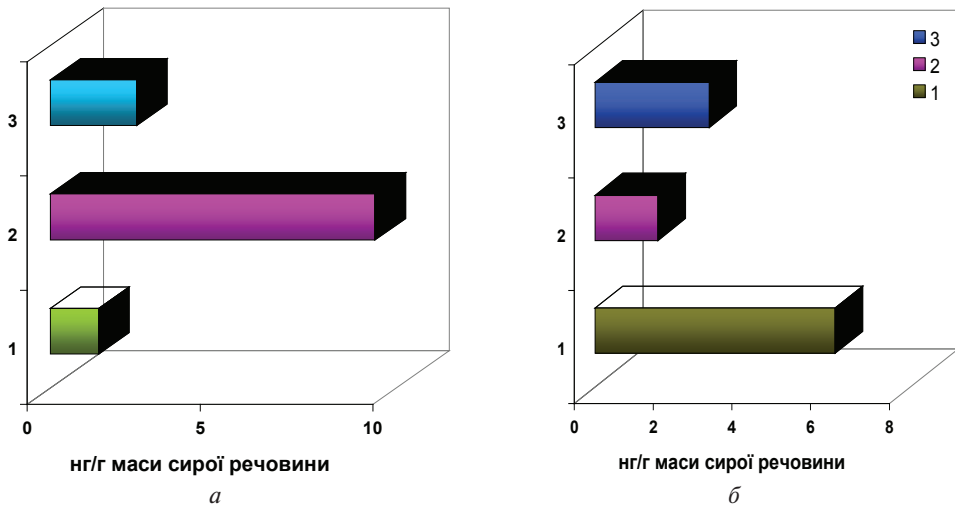


Рис. 2. Вплив короточасних температурних стресів на вміст вільної і зв'язаної форм АБК у проростках *Amaranthus caudatus*: а — вільна, б — зв'язана форми; 1 — тепловий, 2— холодний стреси, 3 — контроль

Fig. 2. Effect of short-term temperature stress on the level of free and conjugated forms of ABA in seedlings of *Amaranthus caudatus*: а — free form, б — conjugated form; 1 — heat stress, 2— cold stress, 3 — control

ратур відбувається накопичення ендогенної АБК у пшениці й огірка (Веселов и др., 2002; Титов и др., 2003). Ультрафіолетове опромінення стимулює збільшення кількості фітогормону в *Arabidopsis thaliana* (Ракитин и др., 2008), тоді як зелена частина світлового спектра, навпаки, негативно впливає на вміст вільної форми АБК у цих рослин (Головацкая, 2008). Екзогенна АБК здатна підвищувати стійкість до дії абіотичних стресових чинників (Churchill et al., 1998). Регулюючи процес закриття продихів, АБК у такий спосіб пом'якшує дію стресу (Nejad, Meeteren, 2007). Стимулюючи експресію окремих генів і синтез нових поліпептидів, сприяє формуванню захисних реакцій і підвищенню стійкості рослин. Зміни в концентрації ендогенної АБК є сигналом для експресії генів білків, чутливих до холодного стресу (Beck et al., 2007; Shinozaki, 2007; Таланова и др., 2009; Шакирова и др., 2009).

Ми встановили, що в контрольних умовах у всіх досліджених видів переважала зв'язана форма АБК, причому найбільший вміст фітогормону виявлено в проростках експлерента із С-3 типом фотосинтезу *Brassica campestris* (рис. 1). Високий, порівняно з іншими дослідженими видами, вміст вільної форми АБК у контрольних умовах виявлено в проростків експлерента із С-4 типом фотосинтезу *Amaranthus caudatus* (рис. 2). Натомість у патієнта гібрида *Rumex patientia* × *R. tianschanicus* (рис. 3) в контрольних умовах вміст зв'язаної форми АБК був значно меншим порівняно з віолентом *Festuca pratensis* Huds. (рис. 4) і експлерентом *B. campestris* (рис. 1). Загалом це збігається з результатами інших дослідників і відповідає особливостям екологічної стратегії експлерентів, спрямованої на

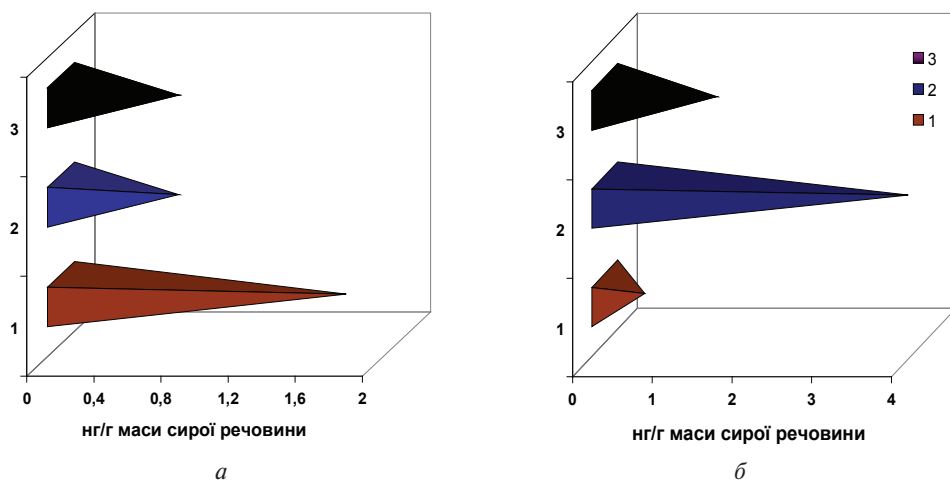


Рис. 3. Вплив короткотривалих температурних стресів на вміст вільної і зв'язаної форм АБК у проростках *Rumex patientia* × *R. tianschanicus*: а — вільна, б — зв'язана форми; 1 — тепловий, 2 — холодний стреси, 3 — контроль

Fig. 3. Effect of short-term temperature stress on the level of free and conjugated forms of ABA in seedlings of *Rumex patientia* × *R. tianschanicus*: а — free form, б — conjugated form; 1 — heat stress, 2 — cold stress, 3 — control

швидкий перебіг вегетативного розвитку та перехід до репродуктивного періоду (Усманов и др., 1990; Борзенкова и др. 2001). В експлерента *A. caudatus*, теплолюбивої рослини із С-4 типом фотосинтезу, в контрольних умовах вміст вільної та зв'язаної форм АБК був майже на одному рівні (досить низьким).

Водночас у експлерента *B. campestris*, холодостійкої рослини із С-3 типом фотосинтезу, визначено найвищий серед досліджених рослин вміст зв'язаної форми АБК (40,3 нг/г сирової речовини) на фоні незначної кількості вільної форми фітогормону (0,2 нг/г сирової речовини). Тобто у вмісті вільної і зв'язаної форм фітогормону між видами з однаковою екологічною стратегією, але різними біохімічними особливостями метаболізму, виявлені певні відмінності. Для віолента *F. pratensis* також встановлено високий вміст зв'язаної форми АБК у контрольних умовах (рис. 4).

Тепловий стрес спричиняв значне збільшення вмісту вільної форми АБК на фоні зменшення кількості зв'язаної форми фітогормону в проростках пацієнта *Rumex patientia* × *R. tianschanicus* (рис. 3) і віолента *F. pratensis* (рис. 4). Слід зазначити, що лише в проростках експлерента *A. caudatus*, теплолюбивої рослини, що має С-4 тип фотосинтезу, збільшувався вміст зв'язаної форми АБК у відповідь на короткочасний тепловий стрес (рис. 2).

Найбільш показовою була реакція на короткочасний холодний стрес у проростків віолента *F. pratensis*. Так, вміст вільної форми АБК зростав майже в 50 разів (рис. 4), а в пацієнта *Rumex patientia* × *R. tianschanicus* практично не змінювався (рис. 3). Збільшення вмісту вільної форми АБК після короткочасного холодного стресу спостерігалось також в проростках експлерентів *B. campestris* (рис. 1) й *A. caudatus* (рис. 2) (у десять разів і чотири рази відповідно). Натомість

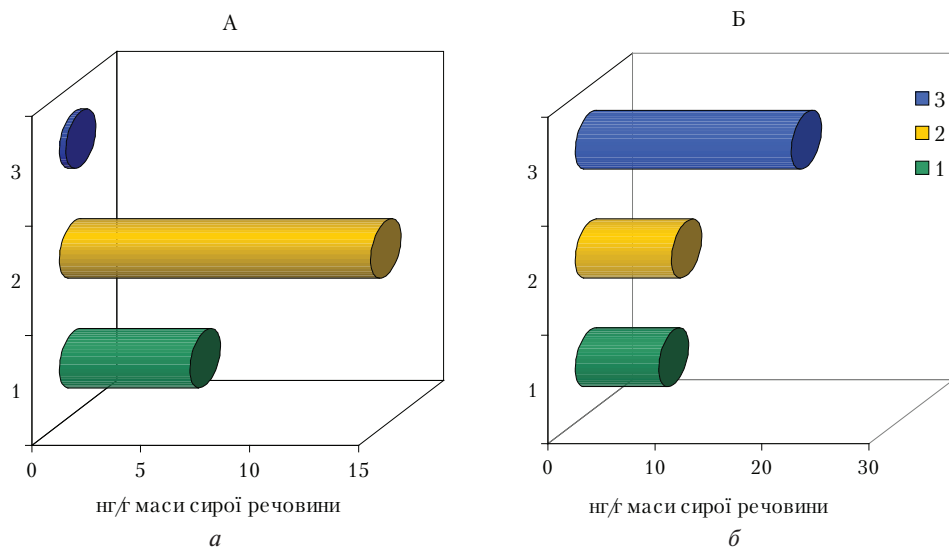


Рис. 4. Вплив короткочасних температурних стресів на вміст вільної і зв'язаної форм АБК у проростках *Festuca pratensis*: а — вільна, б — зв'язана форми; 1 — тепловий, 2— холодний стреси, 3 — контроль

Fig. 4. Effect of short-term temperature stress on the level of free and conjugated forms of ABA in seedlings of *Festuca pratensis*: а — free form, б — conjugated form; 1 — heat stress, 2— cold stress, 3 — control

лише у пацієнта *Rumex patientia* × *R. tianschanicus* мало місце збільшення вмісту зв'язаної форми АБК (у 2,5 раза) після короткочасного холодного стресу (рис. 3).

Отже, зафіксовані після короткочасних температурних стресів зміни у вмісті вільної і зв'язаної форм АБК прямо корелюють із характеристиками екологічних стратегій досліджених видів. *Rumex patientia* × *R. tianschanicus*, який належить до пацієнтів, здатних існувати в несприятливих умовах, відрізнявся за характером змін у вмісті вільної і зв'язаної форм АБК від експлерентів *B. campestris* і *A. caudatus*, а також віолента *F. pratensis*, які зазвичай зростають за сприятливих умов низької конкуренції і є однаково чутливими до дії абіотичних і біотичних стресів. Збільшення вмісту вільної форми АБК після короткочасного холодного стресу в експлерентів і віолента свідчить про активацію захисних процесів. Зафіксовані зміни у вмісті АБК вказують на участь фітогормону в індукованих температурними стресами реакціях. Отримані результати дозволяють розглядати показники вмісту вільної і зв'язаної форм АБК як біологічний маркер при визначенні терmostійкості рослин і їхньої належності до певної групи екологічних стратегій.

Автори висловлюють щире подяку членові-кореспондентові НАН України Я.П. Дідуху за наукове обговорення й консультації щодо визначення екологічних стратегій досліджених видів, а також д-ру с.-г. наук Д.Б. Рахметову за надання насіннєвого матеріалу для фізіолого-біохімічних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Борзенкова Р.А., Яшков М.Ю., Пьянков В.И. Содержание абсцизовой кислоты и цитокининов у дикорастущих видов с разными типами экологических стратегий // Физиол. раст. — 2001. — **48**, № 2. — С. 229—237.
2. Веселов Д.С., Сабиржанова И., Ахиярова Г. и др. Роль гормонов в быстром ростовом ответе растений пшеницы на осмотический и холодовой шок // Физиол. раст. — 2002. — **49**, №4. — С. 572—576.
3. Головацкая И.Ф. Регуляция гиббереллинами роста, развития и гормонального баланса растений *Arabidopsis* на зеленом и синем свете // Физиол. раст. — 2008. — **55**, №3. — С. 348—354.
4. Дерфлинг К. Гормоны растений: Системный поход. — М.: Мир, 1985. — 304с.
5. Косаківська І.В. Екологічний напрям у фізіології рослин: досягнення і перспективи // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2007. — **39**, № 4. — С. 279—290.
6. Миркин Б.М., Усманов И.Ю., Наумова Л.Г. Типы стратегий растений: место в системах видовых классификаций и тенденции развития // Журн. общ. биол. — 1999. — **60**, № 5. — С. 581—595.
7. Пятыгин С.С. Стресс у растений: физиологический подход // Журн. общ. биол. — 2008. — **69**, № 4. — С.294—298.
8. Ракин В.Ю., Прудникова О.Н., Карягин В.В., Ракина Т.Я. и др. Выделение этилена, содержание АБК и полиаминов в *Arabidopsis thaliana* при УФ-В стрессе // Физиол. раст. — 2008. — **55**, № 3. — С. 355—361.
9. Таланова В.В., Акимова Т.В., Титов А.Ф. Динамика содержания АБК в листьях и корнях проростков огурца и их теплоустойчивости под влиянием общего и локального прогрева // Физиол. раст. — 2003. — **50**, № 1. — С. 100—104.
10. Таланова В.В., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., Малышева И.Е. и др. Экспрессия генов транскрипционного фактора WRKY и стрессовых белков у растений пшеницы при холодовом закаливании и действии АБК // Физиол. раст. — 2009. — **56**, № 5. — С. 776—782.
11. Титов А.Ф., Таланова В.В., Акимова Т.В. Динамика холодо- и теплоустойчивости растений при действии различных стресс-факторов на их корневую систему // Физиол. раст. — 2003. — **50**, № 1. — С. 94—99.
12. Усманов И.Ю., Кудоярова Г.Р., Мартынова А.В. и др. Соотношение индолилуксусной и абсцизовой кислот у растений с разными типами адаптивных стратегий // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1990. — **22**, № 1. — С. 65—68.
13. Шакирова Ф.М., Аллагулова И.Р., Безрукова М.В., Авамбаев А.М., Гималов Ф.Р. Роль эндогенной АБК в индуцируемой холодом экспрессии TADHN гена дегидрина в проростках пшеницы // Физиол. раст. — 2009. — **56**, № 5. — С.796—800.
14. Ackerly D.D., Dudley S.A., Sulton S.E. et al. The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions // BioScience. — 2000. — **50**(11). — P. 979—995.
15. Beck E.H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress // J. BioSci. — 2007. — **32**(3). — P. 501—510.
16. Churchill G.C., Reaney M.J.T., Abrams S.R., Gusta L.V. Effects of abscisic acid and abscisic acid analogs on the induction of freezing tolerance of winter rye (*Secale cereale* L.) seedlings // Plant Growth regul. — 1998. — **25**(1). — P. 35—45.
17. Grime J.P. Vegetation classification by reference to strategies // Nature. — 1974. — **250**(1). — P. 26—31.
18. Hansen H., Dorffling K. Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants // J. Exp. Bot. — 1999. — **50**(6). — P. 1599—1605.
19. Nejad A.R., van Meeteren U. The role of abscisic acid in disturbed stomatal response characteristics of *Tradescantia virginiana* during growth at high relative air humidity // J. Exp. Bot. — 2007. — **58**(3). — P. 627—636.

20. *Shinozaki K., Yamaguchi— Shinozaki K.* Gene networks involved in drought stress response and tolerance // *J. Exp. Bot.* — 2007. — **58**(1). — P. 221—227.
21. *Wilkinson S., Davies W.J.* ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants // *Plant Cell Environ.* — 2002. — **25**(1). — P. 195—210.

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 04.05.2012 р.

И.В. Косаковская, Л.В. Войтенко, А.Ю. Устинова

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕССОВ НА СОДЕРЖАНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ У РАСТЕНИЙ С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ СТРАТЕГИЙ

Определено содержание свободной и связанной форм абсцизовой кислоты в контрольных условиях и после кратковременных температурных стрессов у растений с разными типами экологических стратегий. Показано, что в нормальных условиях у всех исследованных видов преобладала связанная форма АБК. Для эксплерентов *Brassica campestris* L. и *Amaranthus caudatus* L. установлены максимальные показатели в содержании фитогормона. Зафиксированные после кратковременных температурных стрессов изменения в целом совпадают с адаптационными характеристиками исследованных видов и свидетельствуют об участии АБК в формировании и реализации экологической стратегии вида. *Rumex patientia* L. × *R. tianshanicus* A. Los., принадлежащий к пациентам, которые растут в неблагоприятных условиях, содержал меньшее количество АБК по сравнению с эксплерентами *B. campestris* и *A. caudatus*, а также виолентом *Festuca pratensis* Huds., которые произрастают в благоприятной обстановке низкой конкуренции и одиночно чувствительны к действию абиотических и биотических стрессов. Полученные результаты позволяют рассматривать данные о содержании свободной и связанной форм АБК как возможный биологический маркер растений при определении их термоустойчивости и типа экологической стратегии.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Festuca pratensis*, *Rumex patientia* × *R. tianshanicus*, *Brassica campestris*, *Amaranthus caudatus*, абсцизовая кислота, температурный стресс, экологическая стратегия.

I.V. Kosakivska, L.V. Voytenko, A.Yu. Ustinova

M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

EFFECT OF SHORT-TERM TEMPERATURE STRESSES ON LEVEL OF ABSCISIC ACID IN PLANTS WITH DIFFERENT TYPES OF ECOLOGICAL STRATEGY

We analyzed the changes in level of free and conjugated forms of abscisic acid (ABA) in 7-days seedlings of plants with different types of ecological strategy after short-term high and low temperature stresses. It was revealed that in control conditions the level of conjugated form of ABA in all analyzed species was higher compared with free form of phytohormon. Explerents *A. caudatus* and *B. campestris* are characterized by the highest level of free and conjugated forms of ABA in control conditions. The level of phytohormon in patient *R. patientia* × *R. tianshanicus* was lower compared with violent *F. pratensis* and explerents *A. caudatus* and *B. campestris*. The obtained data allow concluding that changes in the level of conjugated and free forms of ABA of investigated plants after short-term temperature stresses correlate with the type of their ecological strategy. ABA contents may be used as possible biomarker of plants thermotolerance and their ecological strategy type.

К e y w o r d s: *Festuca pratensis*, *Rumex patientia* × *R. tianshanicus*, *Brassica campestris*, *Amaranthus caudatus*, abscisic acid, temperature stresses, ecological strategy.