

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.132

doi: 10.17223/19988591/23/10

С.А. Войцековская^{1,2}, Э.Р. Юмагулова³,
Е.Н. Сурнина⁴, Т.П. Астафурова⁴

¹Томский государственный педагогический университет (г. Томск)

²Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
Томского государственного университета (г. Томск)

³Нижевартовский государственный гуманитарный университет (г. Нижневартовск)

⁴Томский государственный университет (г. Томск)

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Pinus sylvestris* L.) БОЛОТНЫХ И ЛЕСНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Работа выполнена по Госзаданию Министерства образования
и науки РФ (№ РК 01201261252) и при финансовой поддержке РФФИ
(грант № 12-04-90877 мол_рф_нр).

Показаны особенности фотосинтетического аппарата, активности некоторых ферментов анаэробного дыхательного метаболизма, содержания аскорбиновой кислоты и каталазной активности в двухлетней хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) естественных экосистем верхового и низинного болота и соснового леса в различных районах Томской области. Результаты исследований показали, что в сформированном фотосинтетическом аппарате при близких условиях произрастания (биоценозы соснового леса) количество хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, а также их соотношения достоверно не отличались. Содержание зеленых, желтых пигментов, а также активность фермента каталазы достоверно ниже у растений болотных экосистем. Повышенную активность алкогольдегидрогеназы и функционирование окислительного пентозофосфатного пути дыхания отмечена в хвое сосны обыкновенной, произрастающей на болоте. Выявлены определенные связи между изменениями в содержании аскорбата и каротиноидов. В хвое болотных популяций растений сосны сохранялось высокое содержание аскорбата при снижении уровня каротиноидов.

Ключевые слова: болотные экосистемы; *Pinus sylvestris*; фотосинтетические пигменты; ферменты анаэробного дыхательного метаболизма; антиоксидантная система; каталаза; аскорбат.

Введение

Под влиянием глобальных климатических факторов и локальных воздействий на экосистемы происходят ухудшение общего экологического состояния биосферы, нарушение естественного круговорота и баланса углерода,

смена растительности. В связи с этим большое значение приобретают исследования по проблеме адаптации растительных организмов к изменению окружающей среды [1].

Болотные экосистемы выполняют комплекс важных экологических функций в биосфере [2–4]. Главным компонентом болот являются растения-продуценты. Они играют большую роль в круговороте углерода в биосфере. Фотосинтез и дыхание растений – два взаимосвязанных и взаимодополняющих процесса, в ходе которых происходит превращение неорганического углерода атмосферы в органическую форму, обеспечение организмов энергией, метаболитами для всех процессов жизнедеятельности, депонирование углерода в виде разнообразных органических соединений в общей биомассе растений и в конечном счете в торфе и выделение CO_2 и O_2 в атмосферу. Среди разнообразных экологических факторов, оказывающих воздействие на растения болотных экосистем, ведущим в условиях обильного застойного увлажнения является недостаток кислорода. В условиях дефицита кислорода метаболические способы адаптации растений касаются прежде всего процесса дыхания, что объясняется спецификой воздействия. Компенсаторные перестройки дыхательного метаболизма в значительной степени отражают использование эволюционно сформированных систем гликолиза, переходящего в спиртовое брожение, и окислительного пентозофосфатного пути, поставляющих АТФ, промежуточные вещества для биосинтезов и биологические восстановители. Чувствительным показателем физиологического состояния растений, отражающим интенсивность фотосинтеза и адаптивные перестройки метаболизма, является содержание фотосинтетических пигментов [5–7].

В адаптации растений к неблагоприятным воздействиям важная роль также принадлежит функционированию эффективных антиоксидантных систем, способных обеспечить защиту от активных форм кислорода, накапливающихся при разных формах стресса [8]. Антиоксидантные системы состоят из низкомолекулярных соединений (аскорбиновая кислота, каротиноиды, глутатион, токоферол, флавоноиды) и ферментов (пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза и др.) [9]. В условиях стресса растения способны к индукции активности антиоксидантной системы, в результате чего они приобретают устойчивость к действующему фактору.

Известно, что растения, устойчивые к недостатку кислорода, обладают более высоким содержанием аскорбата, токоферола, активностью защитных ферментов [5]. В процессе переноса электронов, накапливающихся в дыхательной цепи клетки в условиях дефицита кислорода, на молекулярный кислород образуются его активные формы (супероксид-ион, перекись водорода), которые атакуют липиды мембран, денатурируют белки и нуклеиновые кислоты, существенно повреждая растительные клетки [10].

Цель работы – сравнительное исследование ряда показателей, характеризующих основные жизненно важные физиологические функции: фото-

синтез, дыхание и особенности антиоксидантной системы у сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. (семейство Pinaceae) из болотных и лесных естественных экосистем в различных районах Томской области.

Материалы и методики исследования

Исследованные объекты произрастали в естественных биоценозах соснового леса в окрестностях сел Победа 1, Большое Протопопово 2 и Тимирязево 3; опытные участки были расположены на территории болотных экосистем низинного типа – Таган (1, 2, 3) – и верхового типа – Полянника. Характеристика этих болотных экосистем проведена ранее [11]. Исследования проводились на двухлетней развитой хвое. Количество хлорофиллов *a* и *b*, а также сумму каротиноидов определяли в этиловом спирте на спектрофотометре UV-1650 pc UV-spectrophotometer (Shimadzu) при длинах волн 665, 649 и 440,5 нм [12]. Для определения активности ферментов производили гомогенизацию растительных тканей при пониженной температуре в среде следующего состава: трис-HCl буфер (50 мМ, pH 7,8), аскорбат натрия (5 мМ), цистеин (3 мМ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (1 мМ) и ДТТ (5 мМ) [13]. Гомогенат центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин при 4°C. Активность ферментов измеряли в супернатанте спектрофотометрически (UV-1650 pc UV-spectrophotometer, Shimadzu). Ферментативную активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) определяли в окислительно-восстановительных превращениях НАД⁺ или НАДН в реакционных средах, содержащих трис-HCl буфер (50 мМ, pH 9,5), НАДН (2 мкМ); ацетальдегид (50 мкМ) или НАД (15 мМ) и этанол (50 мМ). Функционирование фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) исследовали в реакционной смеси, содержащей трис-HCl буфер (30 мМ, pH 7,4), глюкозо-6-фосфат Na соль (0,12 мМ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,25 М) и НАДФ (11 мМ) [14]. Содержание белка определяли по методике Бредфорда [15]. Полученные данные выражали в единицах ферментативной активности на 1 мг белка. Определение активности каталазы проводили по методу Баха и Опарина; содержание свободной и связанной аскорбиновой кислоты исследовали, используя 2,6-дихлорфенолиндифенол [16].

Обработку результатов проводили статистически с помощью компьютерных программ Excel и StatSoft STATISTICA 6.0. В табл. 1–4 приведены средние арифметические и ошибки среднеарифметической величины. Разницу между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в сформированном фотосинтетическом аппарате при близких условиях произрастания (биоценозы сосно-

вого леса) количество хлорофиллов a и b и каротиноидов, а также их соотношение в двухлетней хвое сосны обыкновенной достоверно не отличались (табл. 1). Среднее содержание пигментов на контрольных участках имело следующие значения: хлорофилла a – 1 068 мкг/г сырой массы; хлорофилла b – 373 мкг/г сырой массы и каротиноидов – 292 мкг/г сырой массы (рис. 1).

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика содержания фотосинтетических пигментов в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем соснового леса и болотных экосистем, мкг/г сырой массы

Экосистема	Хлорофилл a	Хлорофилл b	Сумма $(a + b)$	Сумма каротиноидов	a/b	$(a + b)$ Каротиноиды
Сосновый лес 1	1035 ± 43	368 ± 19	1403 ± 62	284 ± 12	2,9	4,9 ± 0,02
Сосновый лес 2	1101 ± 17	377 ± 15	1478 ± 23	299 ± 6	2,9	4,9 ± 0,07
Болото низинное 1	961 ± 23*	316 ± 5*	1278 ± 28*	211 ± 5*	3,0	6,1 ± 0,003*
Болото низинное 2	938 ± 17*	312 ± 14*	1250 ± 30*	203 ± 2*	3,0	6,2 ± 0,12*
Болото низинное 3	732 ± 34*	253 ± 8*	985 ± 41*	148 ± 7*	2,9	6,7 ± 0,05*
Болото верховое	332 ± 13*	116 ± 1*	448 ± 14*	95 ± 4*	2,9	4,7 ± 0,11

Примечание. Здесь и далее в таблицах между разными экосистемами все различия статистически значимы ($p \leq 0,05$).

Исследование пигментного фонда хвои сосны обыкновенной показало, что в условиях болотных экосистем содержание зеленых и желтых пигментов достоверно ниже, чем у растений всех исследованных биоценозов соснового леса (табл. 1, рис. 1). Больше всего эта разница была выражена для растений болотной экосистемы верхового типа, что, по-видимому, обусловлено своеобразным сочетанием эдафических и климатических факторов, характерных для сфагновых болот. Различия в содержании пигментов значительны. Соотношение хлорофилла a к хлорофиллу b в разных вариантах не изменялось, а отношение суммы хлорофилла a хлорофиллу b к каротиноидам в условиях низинного болота возрастало (см. табл. 1), что свидетельствует о происходящих адаптивных перестройках.

О переходе гликолиза в брожение свидетельствовало резкое повышение активности алкогольдегидрогеназы – основного тестового фермента для гипоксического воздействия любого типа, который катализирует заключительную реакцию спиртового брожения. В хвое сосны, произрастающей на верховом болоте, активность НАДН-алкогольдегидрогеназы была значительно выше, чем в образцах соснового леса соснового биоценоза (табл. 2). Одновременно отмечено увеличение активности НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы, что указывало на возможность вторичной переработки этанола растениями, испытывающими анаэробиз [5].

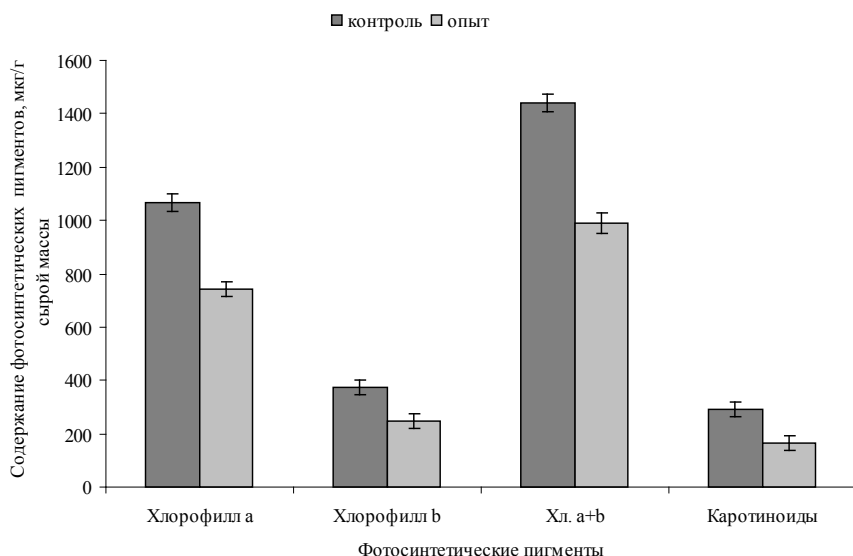


Рис. 1. Содержание фотосинтетических пигментов в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем соснового леса и болотных экосистем, мкг/г сырой массы

Таблица 2

Активность некоторых ферментов анаэробного дыхательного метаболизма в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. разных экосистем

Фермент	Активность, мЕ/мг белка	
	Сосновый лес 1	Болото верховое
НАДН-алкогольдегидрогеназа	$60,6 \pm 3,58$	$229,6 \pm 19,21$
НАД-алкогольдегидрогеназа	$3,7 \pm 0,28$	$59,6 \pm 2,24$
НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	$1,44 \pm 0,07$	$9,88 \pm 0,01$

Вместе с усилением гликолиза в хвое сосны, произрастающей на верховом болоте, активировалась работа окислительного пентозофосфатного пути дыхания, о чем свидетельствует высокая активность его стартового фермента НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (табл. 2). Подтверждается представление о том, что в условиях кислородной недостаточности процессы гликолиза и апопомического распада углеводов осуществляются параллельно в силу их тесной взаимосвязи [5].

Изучение активности фермента каталазы в двухлетней хвое сосны обыкновенной болотных экосистем низинного и верхового типа показало достоверное уменьшение данного параметра, по сравнению с сосной обыкновенной экосистемы соснового леса 3. Так, каталазная активность в хвое сосны, произрастающей в условиях низинного болота 1, была в 2 раза ниже, а в условиях верхового болота – в 4 раза ниже соответствующих показателей хвои сосны лесной экосистемы (табл. 3).

Таблица 3

**Активность каталазы в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L. экосистем
соснового леса и болотных экосистем, мг/г сырой массы
перекиси водорода, разложенной ферментом**

Экосистема	Активность каталазы
Сосновый лес 3	$45,33 \pm 2,4$
Болото низинное 1	$24,00 \pm 1,21^*$
Болото верховое	$11,33 \pm 0,52^*$

Каталаза – фермент, эффективно работающий при высокой концентрации пероксида водорода, может ликвидировать его избыточные количества. Активность каталазы в растениях связана в основном с митохондриями, цитоплазмой и пероксисомами [9]. Антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные соединения могут быть гидрофильными и гидрофобными. Аскорбиновая кислота находится в водной фазе клетки, хлоропластах, митохондриях и других структурах, также в межмембранном пространстве клеточных органелл. Как восстанавливающий агент аскорбиновая кислота способна напрямую реагировать с супероксидным, гидроксильным и токоферольным радикалами [5]. Согласно полученным данным, в хвое сосны, произрастающей в условиях верхового болота, обнаружено более высокое содержание аскорбиновой кислоты, по сравнению с хвоей сосны в экосистеме соснового леса 2 и соснового леса 3, что, вероятно, свидетельствует о защитной роли аскорбата (табл. 4).

Таблица 4

**Содержание аскорбиновой кислоты в двухлетней хвое *Pinus sylvestris* L.
экосистем соснового леса и болотной экосистемы, мг %**

Экосистема	Содержание аскорбата
Сосновый лес 3	$374,0 \pm 0,91$
Сосновый лес 2	$444,6 \pm 0,82$
Болото верховое	$506,0 \pm 0,90^*$

Отмечены определенные связи между изменениями в содержании аскорбата и каротиноидов. В хвое болотных растений сохранялось высоким содержание аскорбата, но интенсивно снижался уровень каротиноидов. Известно, что аскорбат выполняет защитную функцию уже на первых этапах образования активных форм кислорода в гидрофильной среде, тогда как каротиноиды защищают мембранно-связанные компоненты в гидрофобной среде. Каротиноиды как липофильные антиокислители способны дезактивировать многие активные формы кислорода, особенно синглетный кислород. Не менее важными в защите клеточных структур являются реакции взаимодействия каротиноидов с органическими радикалами жирных кислот, обрывающие цепь свободнорадикального окисления, защищая мембраны клетки от деструкции.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что в двухлетней хвое сосны обыкновенной в условиях дефицита кислорода для корневой системы изменяется уровень фотосинтетических пигментов и обнаруживаются особенности дыхательного метаболизма. В условиях соснового леса содержание фотосинтетических пигментов значительно выше, чем в болотных экосистемах, среди которых пониженное содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов выявлено на верховом болоте, по сравнению с низинным. В хвое сосны болотных экосистем активируются процессы анаэробного дыхательного обмена, которые обеспечивают стратегию выживания растений. Разнонаправленные изменения содержания антиоксидантов в хвое сосны болотных и лесных экосистем свидетельствуют об особенностях реакции ассимиляционного аппарата растений на длительное затопление. Участие веществ, обладающих антиокислительными свойствами, – каталазы, аскорбиновой кислоты, каротиноидов, – создает мощный антиоксидантный пул обменных процессов в надземных органах, необходимых для выживания растений в условиях дефицита кислорода для корневой системы.

Благодарим доктора сельскохозяйственных наук, профессора Л.И. Инишеву, руководителя проблемной лаборатории агроэкологии ТГПУ, за научную консультацию и предоставленную возможность для проведения эксперимента.

Литература

1. Иванова Н.А., Юмагулова Э.Р. Эколого-физиологические механизмы адаптации и типы стратегии сосудистых растений верховых болот. Ханты-Мансийск : Печатное дело, 2010. 165 с.
2. Лапишина Е.Д. Флора болот юго-востока Западной Сибири. Томск, 2003. 296 с.
3. Chapin F.S., Bret-Harte M.S., Hobbie S.E., Zhong H. Plant functional types as predictors of transient responses of arctic vegetation to global change // Journal of Vegetation Science. 1996. Vol. 7, № 3. P. 347–358.
4. Woodward F.I., Cramer W. Plant functional types and climatic changes: Introduction // Journal of Vegetation Science. 1996. Vol. 7. P. 306–308.
5. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. Л. : Изд-во СПб. ун-та, 2002. 240 с.
6. Зотикова А.П., Бендер О.Г. Структура и функция ассимиляционного аппарата кедров сибирского в горах Центрального Алтая // Journal of Siberian Federal University. Biology. 2009. № 2 (1). С. 80–89.
7. Романова Л.И. Метаболическая реакция сеянцев лиственницы сибирской на затопление корней // Лесоведение. 2004. № 1. С. 31–37.
8. Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Карташов А.В. и др. Изучение индуцибельных и конститутивных механизмов устойчивости к солевому стрессу у гравилата городского // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 5. С. 692–698.
9. Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект). Калининград : Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. 111 с.

10. Вартапетян Б.Б. Учение об анаэробном стрессе растений – новое направление в экологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений. 2. Дальнейшее развитие проблемы // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 6. С. 805–836.
11. Головченко А.В., Инишева Л.И., Губина А.В., Голубина А.Б. Характеристика биохимических процессов в эвтрофных и мезотрофных болотах Сибири // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2009. Вып. 11(89). С. 207–212.
12. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений / под ред. О.А. Павлиновой. М. : Наука, 1971. С. 154–170.
13. Юзбеков А.К. Спектрофотометрические способы определения активности ключевых ферментов фотосинтетического метаболизма у C_3 и C_4 -растений: методическое пособие. Киев : Ин-т физиологии растений и генетики АН УССР, 1990. 32 с.
14. Астафурова Т.П., Войцековская С.А., Верхотурова Г.С. Исследование путей адаптации растений к гипобарической гипоксии // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2007. № 1. С. 67–74.
15. Bradford R.M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
16. Леишук Р.И., Вайшла О.Б., Войцековская С.А. Практикум по биохимии. Томск : Изд-во ТГУ, 2002. 192 с.

Поступила в редакцию 16.04.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 3 (23). P. 111–119

doi: 10.17223/19988591/23/10

Svetlana A. Voizekhovskaya^{1,2}, Elvira R. Umagulova³,
Elena N. Surnina⁴, Tatyana P. Astafurova⁴

¹ Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia

² Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Nizhnevartovsk State University for the Humanities, Nizhnevartovsk, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

STUDY OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF PINE NEEDLES OF SCOTS PINE (*Pinus sylvestris* L.) BOG AND FOREST POPULATIONS

Under the impact of global climatic factors and local influence on ecosystems there is a deterioration of common ecological conditions of the biosphere, disturbance of natural circulation and carbon balance and vegetation changing. In connection with this, investigations of adaptation of plant's organisms to environmental changes acquire a great significance. Mire ecosystems perform a complex of important ecological functions in the biosphere. The main components of mire are plants producing biomass, which plays a big role in carbon circulation in the biosphere. Among different ecological factors influencing mire plants, a leading factor under the conditions of abundant congested moistening is oxygen deficiency. Under the conditions of oxygen deficiency, metabolic modes of adaptation of plants are connected, first of all, with process of respiration, which is explained by the specificity of influence. Recompense rearrangements of respiration metabolism reflect, considerably, the use of evolutionary formed glycolysis systems, which transforms into alcohol fermentation, and a pentaphosphate

way leading to an increased ATF production, intermediate substances for biological synthesis and biological rehabilitation. A sensitive index of plant physiological condition, which reflects intensity of photosynthesis and adaptive reconstruction of metabolism, is the quantity of photosynthetic pigments. .

The aim of this work is connected with a comparable investigation of a series of indexes, which characterize major vitally important physiological functions: photosynthesis, respiration and peculiarities of anti-oxygenating system of Scot's pine *Pinus sylvestris* L. (fam. Pinaceae) in natural ecosystems of mire and pine forest in Tomsk and Bakchar districts of Tomsk oblast. The studied objects grew in natural pine forest biocenosis near villages Pobeda, Bolshoe Protopopovo and Timiryazev (control): experimental sites were located on the territory of mire ecosystems of eutrophic type – Tagan and oligotrophic type – Polynyanka. Two- year old pine needles were used for investigation.

The performed investigations showed that Scot's pine, growing in different ecological conditions, differs by the level of photosynthetic pigments and by peculiarities of respiration exchange. Under the conditions of pine forest the content of photosynthetic pigments is considerably higher, compared with mire ecosystems. Among mire pines there is a lower content of chlorophyll "a" and "b" and carotenoids on oligotrophic bog, compared with eutrophic mire. In pine needles, processes of anaerobic transpiration exchange activate, which promotes a strategy of survival of plants. Different changes of the content of anti-oxidants in pine needles under the conditions of mire and forest ecosystems show specific peculiarities of pine reaction to long-time inundation of the assimilation mechanism of plants. Participation of substances with anti-oxidant features (catalase, ascorbic acid and carotenoids) creates a strong anti-oxidant pool of substances in above-ground organs of plants; supports correlative connections between the root system and photosynthetic organs, which are necessary for survival of plants under the conditions of oxygen deficiency for the root system.

Key words: peat ecosystems; pine; photosynthetic pigments; enzymes of anaerobic respiratory metabolism; antioxidant system; catalase; ascorbate.

Received April 16, 2013