

---

---

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

---

---

УДК 581.12:581.1.03; 633.15:632.111.6

**Т.П. Астафурова, С.А. Войцековская, Г.С. Верхотурова**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

*В ассимилирующих тканях при гипобарической гипоксии у растений амаранта сорта Валентина активируется окислительный пентозофосфатный путь и уменьшается содержание амарантина, обладающего антиоксидантными свойствами. Одновременно у амаранта сорта Кизлярец резко повышается активность алкогольдегидрогеназы, перерабатывающей этанол. Обсуждаются различные пути биохимической адаптации к недостатку кислорода у растений р. Amaranthus.*

Закономерности реагирования живых систем на внешние воздействия связаны с формированием неспецифических адаптационных перестроек, индуцирующих устойчивость организма. Среди таких неспецифических ответов известно множество реакций, характерных только для отдельных видов, но интересных для познания механизмов адаптации в целом [1–5]. Более полно в настоящее время исследовано действие дефицита кислорода на корневую систему растений. Остаются недостаточно изученными вопросы структуры и функции фотосинтетического аппарата в условиях корневой гипоксии и метаболические приспособления зеленых растений, попадающих в условия кислородного голодания. Моделировать состояние гипоксии для целого растения можно в барокамерах, устройство которых позволяет создавать необходимые условия – недостаток кислорода, углекислоты и изменение атмосферного давления, т.е. формировать модель гипобарической гипоксии. Изменения в ассимилирующих органах показывают, что при корневой гипоксии и аноксии у устойчивых и неустойчивых растений сначала уменьшается только число активных реакционных центров фотосистем. Более длительная аноксия в области корней приводит к тому, что в хлоропластах листьев увеличивается число осмиофильных глобул, т.е. имеет место частичная деструкция мембранной системы тилакоидов [6]. Исследования действия гипобарической гипоксии на целое растение выявили, что в зеленых листьях развиваются компенсаторные взаимоотношения фотосинтеза и дыхания, активируются анаплеротические механизмы накопления низкомолекулярных метаболитов и образования энергетических эквивалентов [7].

В стресс-физиологии растений придается большое значение ядерно-цитоплазматическим отношениям, когда нормальный онтогенез пластид является необходимым условием для правильной экспрессии ядерных стрессорных генов. Показано, что в трансдукции стрессорного сигнала принимают участие такие эндогенные компоненты, как этилен, жасмоновая кислота, углеводы, полиамины и различные антиоксиданты, к числу которых относится и амарантин. Согласно современным представлениям, он играет важную роль

в фотосинтетических, метаболических и защитных реакциях растений [8]. Повышенным содержанием амарантина обладают растения рода *Amaranthus*, особенно высокое количество его отмечается в листьях амаранта трехцветного сорта Валентина. В литературе есть данные об отношении видов рода *Amaranthus* к стрессу, в частности к гипоксии [9–10], действию водного стресса [11]. В связи с этим поиск эндогенных метаболитов, обеспечивающих устойчивость растений даже в пределах одного рода или вида, является новым и перспективным направлением стресс-физиологии.

Цель работы – изучение направленности метаболизма в ассимилирующих тканях двух видов амаранта, различающихся содержанием бетацианина амарантина, в условиях гипобарической гипоксии.

Объектами исследования являлись 24-суточные проростки двух видов амаранта: амарант тёмный (*Amaranthus hypochondriacus* L.) сорта Кизлярец и амарант трёхцветный (*Amaranthus tricolor* L.) сорта Валентина, который отличается высоким содержанием амарантина [8]. Амарант характеризуется высокой урожайностью, а благодаря его высокому адаптационному потенциалу обладает уникальной способностью приспосабливаться к различным условиям внешней среды. Зерно и зеленая масса амаранта могут широко использоваться в пищевых, кормовых и технических целях. По качественным показателям – содержанию белка, аминокислот, витаминов, макро- и микроэлементов, биологически активных веществ, масла – он превосходит основные традиционные кормовые и пищевые культуры [8–10].

Растения выращивали на дерново-луговой почве под люминесцентными лампами (интенсивность 40 Вт/м<sup>2</sup>, фотопериод 12 ч) при температуре 25°C. Для создания анаэробных условий образцы помещали в барокамеры с пониженным парциальным давлением кислорода (P = 8 кПа, PO<sub>2</sub> = 2 кПа) на 16 ч в темноту (для исключения фотосинтеза). Контрольные растения находились в это время в условиях нормальной аэрации (P = 101 кПа, PO<sub>2</sub> = 21 кПа) и при нормальном атмосферном давлении в темноте. Особенности гипобарической среды характеризуются одновременным снижением парциального давления газов, среди которых наибольшее значение для растений имеют O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>. В отличие от других типов гипо- и аноксии (затопление, вытеснение воздуха инертными газами и т.д.) действие гипобарической гипоксии можно изучать на автотрофных тканях, которые в условиях разреженной атмосферы непосредственно взаимодействуют с воздухом, обедненным кислородом.

Эксперименты проводились в 4 биологических повторностях, были продублированы 4 раза. Для опытов использовали взрослые листья предпоследнего яруса 24-дневных растений амаранта. Гомогенизацию производили при пониженной температуре на льду в 8 мл охлажденной среды выделения следующего состава: трис-НСl буфер (рН 7,8) – 0,05 М, аскорбат натрия – 5 мМ, цистеин – 3 мМ, MgCl<sub>2</sub> – 1 мМ и дитиотрейтол – 5 мМ [12]. Гомогенат отжимали через 4 слоя капрона и центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 20 мин на холоде (центрифуга К-24, Германия). Состав среды выделения и реакционных сред для определения активности ферментов подбирали согласно специфике объекта. В работе использовали реактивы фирм «Sigma» (США) и «Реахим» (Россия).

Ферментативную активность алкогольдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.1, НАД-АДГ и НАДН-АДГ) определяли в окислительно-восстановительных превращениях НАД<sup>+</sup> или НАДН<sup>+</sup> в реакционных средах: трис-НСl буфер (рН 7,5) – 0,2 М; НАДН – 2 мкМ; ацетальдегид – 50 мкМ или НАД – 15 мМ и этанол – 50 мМ [13]. Активность НАД-малатдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.37, НАД-МДГ) определяли по восстановлению НАД в присутствии малата. Реакционная среда для НАД-МДГ содержала трис-НСl (рН 9,1) – 0,1 М; малат Na – 1,93 М и НАД – 11 мМ [12]. Реакционная смесь для НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.49; НАДФ-ГФДГ) содержала трис-НСl (рН 7,4) – 0,03 М; глюкозо-6-фосфат Na соль – 0,12 мМ; MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O – 0,25 М и НАДФ – 11 мМ [14]. Активность ферментов определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-2100, Shimadzu Corp., Япония) по изменению оптической плотности при 340 нм и рассчитывали в мкМ НАДН/мин на 1 мг белка и на 1 г сырой массы. Содержание растворимого белка определяли по Бредфорду [15], количество амарантина – по поглощению при 537 нм [16, 17], содержание пигментов в спиртовой вытяжке – спектрофотометрически [19]. Результаты обрабатывали статистически, различия между сравниваемыми средними считали при  $p < 0,05$  [18].

Амарант, подобно кукурузе, просо и сорго, обладает C<sub>4</sub>-путём фотосинтеза и относится к аспартатным C<sub>4</sub>-растениям, отличающимся высоким содержанием лизина. Он также характеризуется большой скоростью фиксации углекислоты в расчёте на единицу поверхности листа, обладает мощной продуктивностью в условиях высокой инсоляции и температуры. В условиях 16-часовой гипобарической гипоксии повышается содержание белка в листьях 24-суточных проростков обоих видов рода амарант (табл. 1). Обычно при анаэробнозе содержание белка в растениях понижается вследствие усиления его распада и торможения синтеза. В литературе имеются указания и на увеличение содержания белка при ограничении аэрации [1, 3]. Это может объясняться, с одной стороны, медленной утилизацией белка в обмене веществ в данных условиях, с другой – синтезом анаэробных белков, многие из которых идентифицированы как ферменты анаэробного обмена. Они участвуют в трансформации дыхательных путей при адаптации растений к недостатку кислорода.

Таблица 1

**Содержание белка в проростках амаранта при нормальной аэрации (контроль) и в условиях гипобарической гипоксии (опыт) (P = 8 кПа, PO<sub>2</sub> = 2 кПа, время экспозиции 16 ч)**

Объект	Варианты	Содержание белка, мг/г сырой массы
Амарант тёмный, сорт Кизлярец	Контроль	6,23±0,16
	Опыт	7,63±0,16
Амарант трёхцветный, сорт Валентина	Контроль	6,45±0,29
	Опыт	8,29±0,20

*Примечание.* Все различия между контролем и опытом достоверны при  $p < 0,05$ .

В листьях амаранта после 16-часового воздействия гипобарической гипоксии наблюдаются изменения содержания фотосинтетических пигментов (табл. 2). При этом у опытных растений сорта Валентина количество зеленых пигментов выше, чем в контроле, а содержание каротиноидов не изменяется.

Т а б л и ц а 2

**Содержание пигментов в листьях амаранта при действии гипобарической гипоксии (P= 8 кПа, PO<sub>2</sub> = 2 кПа, 16 ч), мкг/г сырой массы**

Варианты опыта	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Сумма хл <i>a</i> + хл <i>b</i>	хл <i>a</i> / хл <i>b</i>	Каротиноиды	хл <i>a</i> + хл <i>b</i> каротиноиды
Сорт Валентина						
Контроль	1701,3 ± 89,7	640,0 ± 20,9	2476,4 ± 81,9	2,9	1394,2 ± 38,04	1,91
Опыт	2361,3 ± 92,3*	711,9 ± 17,9*	3141,5 ± 161,5*	3,0	1363,1 ± 36,7	1,87
Сорт Кизлярец						
Контроль	1868,3 ± 116,9	584,8 ± 30,8	2589,0 ± 80,4	3,1	944,3 ± 83,0	2,13
Опыт	1992,2 ± 75,8	689,3 ± 34,6	1946 ± 75,5	3,0	1465,6 ± 131,4*	1,6

\* Различия между контролем и опытом достоверны при  $p < 0,01$ .

В то же время у амаранта сорта Кизлярец уровень зеленых пигментов при гипоксии не изменяется, но увеличивается количество каротиноидов. Подобное увеличение зеленых пигментов известно [20] и укладывается в представление о том, что при недостатке кислорода замедляется окисление хлорофилла. Обнаруженные особенности в содержании фотосинтетических пигментов являются, вероятно, результатом определенных метаболических изменений.

Определение содержания бетацианина амарантина в листьях 24-дневных растений амаранта совпадает с данными о более высоком его количестве в растениях сорта Валентина [8]. Под действием 16-часовой гипоксии содержание амарантина в листьях амаранта темного сорта Кизлярец не изменяется и достоверно уменьшается в листьях амаранта трехцветного сорта Валентина (табл. 3). Такие количественные изменения амарантина с учетом его защитной функции дают основание для дальнейшего рассмотрения путей метаболизма у этих растений при действии кислородной недостаточности.

В листьях растений на свету при недостатке кислорода тормозится работа цикла Кребса [7], что подтверждают и данные исследования. Активность НАД-МДГ уменьшается в листьях обоих видов амаранта (табл. 3). Заключительный этап обмена ди- и трикарбоновых кислот в листьях амаранта темного ингибируется на 22%, а в листьях амаранта трехцветного – на 41% в пересчете на 1 г сырой массы. Одновременное изучение преобразования глюкозы по окислительному пентозофосфатному пути показало, что активность

НАДФ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в листьях амаранта трехцветного сорта Валентина возрастает на 33% по сравнению с контролем (табл. 4).

В листьях амаранта темного сорта Кизлярец после гипоксической экспозиции активность фермента достоверно не изменяется как в пересчете на 1 г сырой массы, так и на 1 мг белка.

Таблица 3

**Влияние гипобарической гипоксии (P = 8 кПа, P O<sub>2</sub> = 2 кПа, 16 ч) на содержание бетацианина амарантина в 24-дневных растениях двух видов амаранта**

Объект	Условия опыта	Содержание амарантина	
		мкг/г сырой массы	%
Амарант темный, сорт Кизлярец	Аэрация	115,6 ± 9,3	100
	Гипоксия	99,7 ± 9,8	87
Амарант трехцветный, сорт Валентина	Аэрация	375,02 ± 6,43	100
	Гипоксия	288,16 ± 27,2*	76

\* Различия между контролем и опытом достоверны при p < 0,01.

Таблица 4

**Изменение активности НАД-малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в листьях 24-суточного амаранта под влиянием гипобарической гипоксии (P=8 кПа, PO<sub>2</sub>=2 кПа, при 16 ч)**

Объект	Условия опыта	Активность ферментов			
		НАД-малатдегидрогеназы		Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	
		Е/г сырой массы	МЕ/мг белка	МЕ/г сырой массы	МЕ/мг белка
Амарант темный, сорт Кизлярец	Аэрация	2,93 ± 0,27	501,8 ± 35,48	34,17 ± 1,43	5,85 ± 0,26
	Гипоксия	2,87 ± 0,28	390,0 ± 39,83*	29,53 ± 1,51*	5,78 ± 0,18
Амарант трехцветный, сорт Валентина	Аэрация	3,28 ± 0,25	503,3 ± 27,25	51,74 ± 2,34	7,66 ± 0,24
	Гипоксия	2,34 ± 0,16*	296,8 ± 18,30*	92,21 ± 3,75*	10,19 ± 0,43*

\* Различия между контролем и опытом достоверны при p < 0,05.

Определение активности НАДН-зависимой алкогольдегидрогеназы, функционирующей в сторону восстановления ацетальдегида, выявило различный характер работы фермента у изучаемых сортов (табл. 5). В листьях сорта Кизлярец активность НАДН-АДГ уменьшается под действием 16-часовой гипоксии, а в листьях сорта Валентина в этих же условиях наблюдается резкая активация фермента, что косвенно может свидетельствовать о накоплении этанола. В то же время изменение активности НАД-АДГ имеет противоположный характер: возрастает при гипоксии в листьях сорта Кизлярец и уменьшается в ассимилирующих тканях сорта Валентина.

Полученные результаты позволяют выявить механизмы изменения метаболизма в ассимилирующих органах растений амаранта, находящихся в тем-

ноте в условиях гипобарической гипоксии. При недостатке кислорода в листьях амаранта количество амарантина уменьшалось только у одного из изучаемых видов – амаранта трехцветного сорта Валентина. Этот сорт отличался повышенным содержанием амарантина (300–500 мкг/г сырой массы) по сравнению с амарантом темным сорта Кизлярец (90–130 мкг/г сырой массы).

Таблица 5  
Активность алкогольдегидрогеназы у 24-дневных растений амаранта при нормальной аэрации ( $P = 101$  кПа,  $PO_2 = 2$  кПа) и в условиях гипобарической гипоксии ( $P = 8$  кПа,  $PO_2 = 2$  кПа, при 16 ч)

Субстрат, фермент	Условия опыта	Активность фермента	
		МЕ/мг белка	МЕ/г сырой массы
Сорт Кизлярец			
Ацетальдегид, НАДН-АДГ	Аэрация	27,58 ± 3,6	61,38 ± 5,40
	Гипоксия	21,71 ± 2,77	46,47 ± 4,08
Этанол, НАД-АДГ	Аэрация	6,28 ± 0,84	16,58 ± 1,71
	Гипоксия	9,30 ± 1,09	22,06 ± 2,48
Сорт Валентина			
Ацетальдегид, НАДН-АДГ	Аэрация	36,67 ± 2,51	66,86 ± 5,94
	Гипоксия	87,63 ± 8,85	138,26 ± 22,84
Этанол, НАД-АДГ	Аэрация	11,39 ± 1,19	25,82 ± 2,44
	Гипоксия	6,38 ± 0,98	17,2 ± 0,90

*Примечание.* Все различия между контролем и опытом достоверны при  $p < 0,01$ .

Соотношение путей дыхательного метаболизма при кратковременной гипоксии у амаранта трехцветного сорта Валентина заключается в снижении энзиматической активности цикла Кребса и увеличении активности АДГ по восстановлению ацетальдегида в этанол. Это сопровождается усилением доли альтернативного пентозофосфатного пути окисления углеводов, что вместе с высоким содержанием биологически активного алкалоида амарантина может обеспечивать его устойчивость к недостатку кислорода. Пентозофосфатный путь поставляет НАДФН, который используется как восстановитель в биосинтетических процессах, в условиях, когда не происходит образование НАДФН при фотосинтезе. Поэтому он имеет особенно большое значение в нефотосинтезирующих тканях, прорастающих семенах, а также в часы темнового периода. При функционировании этого пути окисления углеводов образуется рибозо-5-фосфат, необходимый для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. При недостатке кислорода количество амарантина уменьшается только у сорта Валентина, что, по-видимому, может восполняться также через продукты, образующиеся в окислительном пентозофосфатном пути. Известно, что синтез амарантина происходит через образование шикимовой

кислоты путем конденсации эритрозо-4-фосфата из пентозофосфатного пути и фосфоэнолпирувата из гликолиза [21]. Способность бетацианина амарантина образовывать комплексы с ионами переменной валентности, в частности с железом, медью, цинком, которые регулируют и катализируют свободнорадикальные процессы [8], активизирующиеся в растениях при гипоксическом стрессе [3, 22], приводит к его расходованию и обеспечивает устойчивость к гипоксии растений сорта Валентина. Усиление работы окислительного пентозофосфатного пути, которое отмечается в исследовании, характерно для более приспособленных к дефициту кислорода растений [3].

В листьях растений сорта Кизлярец, судя по активности НАД-АДГ, при недостатке кислорода происходит усиление работы фермента, а следовательно, имеет место обращение конечных этапов спиртового брожения и окисление образующихся восстановленных коферментов, необходимых для поддержания высокой скорости гликолитического пути. Одновременно в листьях амаранта сорта Кизлярец в условиях гипобарической гипоксии снижается активность малатдегидрогеназы, работающей на заключительных этапах цикла ди- и трикарбоновых кислот и не происходит активация окислительного пентозофосфатного пути, судя по активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Таким образом, выявлены особенности функционирования отдельных этапов дыхательного обмена в ассимилирующих тканях в темноте при гипобарической гипоксии у двух видов амаранта, отличающихся по содержанию антиоксиданта амарантина. Выполняя протекторную функцию в растениях, амарантин обеспечивает наряду с другими защитными реакциями устойчивость сорта Валентина к кислородной недостаточности. Он снижает уровень свободнорадикальных процессов в клетках, а одновременное усиление использования глюкозы по окислительному пентозофосфатному пути повышает устойчивость этих растений к недостатку кислорода, обеспечивает восполнение амарантина и восстановление коферментов. Устойчивость растений сорта Кизлярец при неизменном, но более низком содержании амарантина в условиях недостатка кислорода обеспечивается усилением окисления продуктов брожения за счет активации алкогольдегидрогеназы, работающей от этанола.

### Литература

1. Чиркова Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1988. 244 с.
2. Crawford R.M.M. Metabolic Adaptation to Anoxia / In Hook D.D., Crawford R.M.M., eds / Plant Life in Anaerobic Environments // Ann. Arbor. Science, 1978. P. 119–136.
3. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. Л.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 240 с.
4. Вартапетян Б.Б. Учение об анаэробном стрессе растений – новое направление в экологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 931–953.
5. Еришова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2007. 263 с.
6. Ладыгин В.Г. Влияние корневой гипоксии и аноксии на функциональную активность и структуру хлоропластов листьев *Pisum sativum* и *Glycine max* // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 2. С. 246–258.

7. Астафурова Т.П. Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания при адаптации растений к условиям гипобарической гипоксии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 1997. 40 с.
8. Гинс М.С. Биологически активные вещества амаранта. Амарантин: свойства, механизмы действия и практическое использование. М.: Изд-во РУДН, 2002. 184 с.
9. Чиркова Т.В., Белоногова В.А., Магомедов И.М. Оценка устойчивости различных видов амаранта к недостатку  $O_2$  // Вестник СПб. ун-та. 1992. Вып. 3, № 17. С. 79–82.
10. Чиркова Т.В. Амарант – культура XXI века // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 10. С. 23–27.
11. Голик К.Н., Гуляев Б.И., Зубцова А.Я., Антонец А.Н. Обмен  $CO_2$  у амаранта при различном водообеспечении // Физиология и биохимия культурных растений. 1993. Т. 25, № 6. С. 540–545.
12. Юзбеков А.К. Спектрофотометрические способы определения активности ключевых ферментов фотосинтетического метаболизма у  $C_3$  и  $C_4$ -растений: Метод. пособие. Киев: Институт физиологии растений и генетики АН УССР, 1990. 44 с.
13. Методы биохимического анализа растений. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1978. 192 с.
14. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание: Учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1975. 392 с.
15. Bradford 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.
16. Муравьева Д.А., Бубенчикова В.Н., Беликов В.В. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего // Фармация. 1984. Т. 36, № 5. С. 28–29.
17. Гинс М.С., Кононков П.Ф., Гинс В.К., Лысенко Г.Г., Дэсалень Т.Л., Бравова Г.Б. Физико-химические свойства и биологическая активность амарантина из растений *Amaranthus tricolor* L. // Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. С. 450–454.
18. Кузнецов В.К. Ускоренный метод статистической обработки результатов наблюдений при сравнении средних // Социально-гигиенические исследования: Тр. II Моск. мед. ин-та. 1973. Т. 19, № 3. С. 253.
19. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. 1971. С. 154–170.
20. Астафурова Т.П., Зайцева Т.А., Зотикова А.П., Рябчук Ю.А. Формирование пигментного аппарата в проростках ячменя в условиях гипобарической гипоксии // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 6. С. 900–905.
21. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М.: Мир, 1986. Т. 2. 312 с.
22. Ershova A.N. Enzyme activity of antioxidative system in plants with different tolerance under hypoxia and  $CO_2$ -media // Acta Physiologiae Plantarum. 2004. Vol. 26. P. 224–225.