

Булатова К.* , Мазкират Ш., Кудайбергенов М., Байтаракова К.

Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства,
Казахстан, Алматинская обл., п. Алмалыбак
*e-mail: bulatova_k@rambler.ru

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОРОСТКАХ НУТА В ПЕРИОД АККЛИМАТИЗАЦИИ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

В статье приведены результаты физиолого-биохимических изменений в проростках 4-х образцов нута на этапах 2-х вариантного закаливания при низких положительных температурах в лабораторных условиях. Установлено, что содержание осмопротекторов: свободного пролина и сахарозы повышалось в зависимости от длительности и силы стрессового фактора у всех генотипов, за исключением сорта Мальхотра. Информативность биохимических показателей, сопряженных с перезимовкой, проявлялась в период понижения температуры от +13°C до +2°C. Так, между уровнем сахарозы и перезимовкой нута выявлена высокая положительная корреляция ($r = +0,88$). На этой же стадии закаливания между концентрацией фотосинтетических пигментов, каротиноидов (хлорофилл а, b, ксантофиллы + каротиноиды) и перезимовкой нута в полевых условиях также выявлена высокая положительная корреляция ($r = 0,98; 0,98; 0,91$, соответственно). Указанные показатели могут служить физиологическими маркерами в отборе холодо-морозостойких форм нута.

Общая активность антиоксидантных ферментов (пероксидазы, супероксиддисмутазы) на всех этапах 2-го варианта закаливания положительно коррелировала с уровнем сахарозы и свободного пролина в растениях. При усилении стрессового воздействия на растения прослеживалась взаимосвязь пероксидазной активности с числом перезимовавших растений.

Ключевые слова: нут, холодостойкость, акклиматизация, пролин, сахароза, фотосинтетические пигменты, супероксиддисмутаза, пероксидаза.

Bulatova K.* , Mazkirat Sh., Kudaibergenov M., Baitarakova K.

Kazakh scientific research institute of agriculture and plant growing,
Kazakhstan, Almaty region, Almalybak v. *e-mail: bulatova_k@rambler.ru

Physiological and biochemical changes in chickpea seedlings during acclimatization to low temperatures in the laboratory conditions

In this article represented the results of physiological and biochemical changes in 4 samples of chickpea seedlings at the stages of two variants' cold acclimation under laboratory conditions. It was found that osmoprotectants: The free proline and sucrose increased as the lengthening and intensifying of the stress factors in all genotypes except for Malhotra variety. The informativeness of the biochemical parameters associated with overwintering was manifested during the period of temperature decrease from +13 to +2 °C. Thus, there were high positive correlations between accumulation of sucrose and the concentration of photosynthetic pigments, carotenoids (chlorophyll a, b, xanthophyll + carotenoids) in seedlings and overwintering level of chickpea in the field conditions ($r = 0.98, 0.98, 0.91$, respectively).

At all stages of the 2nd variant in cold acclimation, the general activity of antioxidant enzymes (peroxidase, superoxide dismutase) was positively correlated with the level of sucrose and free proline in plants. When stress treatment was strengthened in plants, the relationship between peroxidase activity and the number of overwintered plants was revealed.

Key words: chickpea, cold resistance, acclimatization, proline, sucrose, photosynthetic pigments, superoxide dismutase, peroxidase.

Болатова К.*, Мазқират Ш., Құдайбергенов М., Байтарақова Қ.

Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми зерттеу институты,
Қазақстан, Алматы облысы, Алмалыбақ ауылы *e-mail: bulatova_k@rambler.ru

Зертханалық жағдайда төмен температураға жерсіндіру кезеңінде ноқат өскіндеріндегі физиологиялық және биохимиялық өзгерістер

Мақалада зертханалық жағдайда төмен температураға шынығудың 2 нұсқадағы кезеңдерінде ноқат өскіндерінің 4 үлгілеріндегі физиологиялық және биохимиялық өзгерістердің нәтижелері келтірілген. Осмопротектор заттарының (бос аминқышқылы пролин және сахароза) мөлшерінің деңгейі стресті фактордың ұзақтығы мен күшейтілу шамасына қарай Мальхотра сортынан басқа барлық генотиптерде артатындығы тұрақтандырылды. Қыстап шығу мен биохимиялық параметрлер: сахароза мөлшері арасындағы оң корреляциялық байланыс температура +13 °С-дан +2 °С-қа дейін төмендеген кезеңде байқалды ($r = +0,88$). Шынығудың осы кезеңінде фотосинтетикалық пигменттер концентрациясы мен каротиноидтар (хлорофил а, b, ксантофилдер + каротиноидтар) сондай-ақ егістік жағдайында қыстап шыққан ноқат арасында жоғары оң корреляция анықталды ($r = 0,98; 0,98; 0,91$, сәйкесінше). Көрсетілген мәліметтерді ноқаттың суыққа және қыстап шығуына төзімді формаларын талдап алуға физиологиялық маркер ретінде қолдануға мүмкіндік береді. Шынығудың 2-ші нұсқасының барлық сатыларында антиоксидантты ферменттердің (пероксидаза, супероксиддисмутаза) жалпы белсенділігі мен өсімдіктегі сахароза және бос пролин деңгейі арасында оң байланысты көрсетті. Өсімдіктерге стрестік әсерді күшейткен кезде пероксидаза белсенділігі мен қыстап шыққан өсімдіктер саны арасында өзара байланыс болатындығы байқалады.

Түйін сөздер: ноқат, суыққа төзімділік, жерсіндіру, пролин, сахароза, фотосинтетикалық пигменттер, супероксиддисмутаза, пероксидаза.

Введение

Нут (*Cicer arietinum*), относится к семейству Бобовых (Fabaceae), для растений которого характерно высокое содержание полноценного белка в семенах. Содержание незаменимых аминокислот в белке бобовых в 1,5-2 раза выше, чем в белке зерна злаковых. Белок, создаваемый бобовыми культурами обходится производству гораздо дешевле белка злаковых, поскольку растения включают в биологический круговорот азот воздуха за счет симбиоза с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*. Органические остатки бобовых обогащают почву азотом в большей степени, нежели пожнивные остатки других культур, поэтому они являются хорошими предшественниками в севооборотах.

В мировом земледелии нут занимает по площади возделывания 3-е место среди зернобобовых культур. Нут является продуктом питания, широко распространенным в странах Азии, Африки, Средиземноморья.

В Казахстане интерес к нуту увеличивается в последние годы, поскольку его возделывание выгодно в экономическом отношении: цена за 1 т. зерна нута на мировом рынке в 5 раз превышает стоимость тонны зерна пшеницы. В рамках диверсификации и доходности посевов, улучшения состояния почв возделывание нута в Казахстане имеет большие перспективы.

Нут относится к холодостойким культурам и может переносить в фазе всходов заморозки до -8°C. Эта культура является и одной из самых засухоустойчивых однолетних бобовых культур.

Традиционно эта культура высевается весной, что зачастую приводит к подпаданию растений в генеративную фазу под высокую температуру и дефицит влаги, что существенно снижает урожайность нута. Преимуществом посева нута под зиму является то, что растения избегают стрессовый период и, за счет удлинения сроков развития, эффективного использования водных ресурсов повышают урожайность семян до 70% (Singh, 1997a: 418), (Croser, 2003b: 186). Большая часть сельскохозяйственных угодий нашей страны находится в регионах с недостаточным увлажнением, в связи с чем наряду с созданием засухоустойчивых форм, актуальной проблемой является создание сортов нута, пригодных для осеннего сева, преимущественно на Юге и Юго-Востоке Казахстана. Создание холодо- и морозостойких форм нута будет способствовать продвижению культуры в более холодные и высокогорные регионы.

При растущем к культуре интересе со стороны товаропроизводителей, необходимы новые подходы к селекции сортов нута, пригодных для осеннего сева, включающие современные достижения молекулярной биологии, физиологии, биохимии, позволяющие вести отбор желаемых

форм вне зависимости от сезона на базе маркерных показателей, сопряженных с хозяйственно-ценными признаками.

На устойчивость нута к низким температурам влияют морфологические, физиологические, биохимические и генетические факторы. Уязвимость растений при неблагоприятных низкотемпературных стрессовых факторах в значительной мере зависит от стадии развития. Croser и др. (Croser et al., 2003б: 185) неблагоприятными для роста и развития нута считают температурный режим от -1,5 до 15°C (холодовой стресс). Замерзание внутри- и межклеточного содержимого в тканях растений в период перезимовки представляет большую проблему для регионов, где нут высевает под зиму: страны средиземноморья, Европы, Центральной Азии и Закавказья, Западной и Северной Африки (Singh 1993: 121).

Устойчивость растений к промерзанию связана с механизмами противостояния на клеточном уровне, происходящими в период холодной акклиматизации. В это время в растениях происходят метаболические и физиологические изменения, снижающие повреждающий температурный уровень. Процесс холодной акклиматизации или закалки связан с возрастанием в клетках сахаров, растворимых белков, свободных аминокислот, активности антиоксидантных веществ ферментной и неферментной природы, появления новых изоформ ферментов (Hughes, 1990а: 161), (Dunn, 1996б: 291), (Chohan, 2011в: 189), (Tatar, 2013г: 260). Более интенсивное накопление антоцианина, флавоноидов, свободного пролина, повышение активности антиоксидантной активности энзимов наблюдается у более холодостойких форм нута (Tatar, 2013а: 260), (Tugan, 2014б: 499). Растворимые углеводы, выполняя функции осморегуляторов, влияют на оводненность растительных клеток, способствуют стабильности клеточных мембран, длительному сохранению фотосинтетической активности при неблагоприятных условиях (Maller 2002: 1), в связи с чем у более устойчивых форм накопление углеводов в период акклиматизации проходит более интенсивно (Saghfi 2014: 591). Экзогенное воздействие криопротекторами (глицин-бетаином) вызывает повышение морозостойкости растений, что приводит к повышению урожайности числа семян и др. (Nauуар 2005: 381).

Поскольку устойчивость к тем или иным стрессовым факторам абиотического характера является сложным признаком и контролируется множеством генов, для растения не может

существовать один какой-либо показатель, характеризующий устойчивость/чувствительность к стрессу, только по комплексу признаков возможна дифференциация генотипов по устойчивости к определенному неблагоприятному фактору среды (Kaug 2012: 569).

Перезимовка нута зависит от многих факторов, в т.ч. от таких как: сроки посева, применение удобрений, контроля вредителей и болезней, способов обработки почвы и др. В связи с тем, что все эти факторы влияют на результаты полевой оценки, скрининг генотипов нута на морозостойкость необходимо вести и в контролируемых условиях, при которых элементы сложного показателя могут быть дифференцированы и оценены по отдельности (Croser 2003: 185). Лабораторные методы скрининга на морозостойкость по физиолого-биохимическим, белковым и молекулярным маркерам, методы оценки, связанные с получением объектов исследований в контролируемых условиях (климокамерах, термостатах) имеют преимущества для изучения ответных реакций растений на стресс, поскольку идентичность условий для всех испытуемых генотипов, возможность повторять эксперименты и моделировать совокупность элементов стресса повышают точность результатов исследований.

Целью наших исследований являлось изучение физиологических и биохимических изменений в проростках нута при разных вариантах лабораторного закалывания, идентичных по продолжительности, но различающихся по интенсивности воздействия холодого стресса на последних двух неделях акклиматизации и выявление эффективных маркеров для отбора устойчивых к перезимовке форм.

Материалы и методы исследований

В качестве объектов исследований использовались 2 сорта: Мальхотра, Луч (Казахстан) и 2 линии нута 7Б (Россия), Erbsen Sponishe (Германия), из рабочей коллекции отдела зернобобовых культур КазНИИЗиР. Образцы характеризовались разным уровнем устойчивости к перезимовке по результатам полевой оценки на стационаре отдела. В 2015-2016 годах количество перезимовавших растений составило у образцов: Луч – 82%, Мальхотра – 62%, Erbsen Sponishe – 60%, линия 7Б – 18%.

Для постановки экспериментов в лабораторных условиях семена испытуемых образцов нута стерилизовали 2 % перекисью водорода и проращивали в чашках Петри в термостате при

температуре 23-25°C, после чего жизнеспособные проросшие семена высаживали в равной численности в емкости с почвой, полностью обеспеченной минеральными удобрениями: 128,7 мг/кг фосфора, 123 мг/кг калия и 39,15 мг/кг фосфора, содержание гумуса – 5,0 %. 14 дней проростки продолжали развитие в климокамере при дневной/ночной температуре 18/16°C, 11 часовом освещении в 20000 люксов (имитация благоприятного периода в начале осени для роста и развития), затем температура снижалась до +13°C и растения находились в этих условиях еще 1 неделю (имитация начала периода акклиматизации). Растения этого этапа являлись контрольными для обоих вариантов осенней заделки. В ходе 2-ух вариантов лабораторного холодого закаливания, велись отборы проб для анализа физиолого-биохимических изменений в растениях. Образцы хранились до проведения анализов при температуре -80°C, затем листья и корневые шейки измельчались и растирались в жидком азоте. Хлорофилл и каротиноиды экстрагировали 80% ацетоном, концентрацию хлорофилла *a* и *b*, а также каротиноидов определяли на *uv/vis* спектрофотометре (6715 JENWAY, Англия) при длинах волн 646,8, 663,2 и 470 нм по формулам Wellburn (Wellburn 1994: 307). Определение свободного пролина вели методом Bates L.D. (Bates 1972: 2005), содержание сахара – методом Dubois M и др. (Dubois 1956: 350). Экстракцию антиоксидантных ферментов проводили фосфатным буфером 50 mM, pH 7,0 содержащим 0,25 mM EDTA, PVP25 (2%, w/v), 1 mM аскорбиновую кислоту, глицерин (10%, w/v) по прописи Mohammad R. A. (Mohammad 2013: 291). Экстракт использовали для определения активности супероксиддисмутазы (SOD) и пероксидазы (POD). Активность SOD определяли на основе ее способности ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (NBT) по методам Beauchamp (Beauchamp 1971: 276). За единицу активности фермента принимали его количество способное ингибировать 50% восстановление NBT, выражали активность в ед./г сырой массы навески (unit/g FW). Активность POD определяли по скорости реакции окисления бензидина по Бояркину А.Н (Бояркин 1951: 352), интенсивность образования продукта окисления измеряли при длине волны 460 нм, за единицу активности принимали изменение оптической плотности на 0,1 значения, активность выражали в ед. · мин⁻¹ · г сырой массы навески⁻¹ (unit min⁻¹ g FW⁻¹). Все измерения проводились в трехкратной повторности, стати-

стическую обработку первичных данных, в том числе и корреляционный анализ проводили с помощью программы STATISTICA 7.

Результаты исследований и их обсуждение

Моделирование вариантов осенней акклиматизации нута в контролируемых условиях климокамер было проведено на основе анализа многолетних данных метеорологических показателей метеостанции института. Низкие положительные температуры начинаются во второй декаде октября, тогда как отрицательный температурный фон начинается со 2-ой декады ноября. При весеннем возобновлении роста и развития растений в марте месяце могут возникать ночные заморозки вплоть до первой декады апреля, что чревато для состояния растений.

С учетом полученных данных нами моделировано 2 варианта акклиматизации проростков нута в климокамерах: 2-ух недельные проростки нута, вегетировавшие при благоприятных условиях, далее находились при температуре +13°C в течение 3-ей недели (контрольный вариант), затем растения разделены на 2 группы, одна из которых продолжала вегетировать 4-ую и 5-ую недели при температуре +13°C, что имитировало акклиматизацию при теплой осени (I вариант). 2-ая группа растений подвергалась воздействию более низких температур, при которой происходило постепенное снижение температуры до +2°C. (II вариант, рисунок 1).

Во время холодого стресса в тканях растений образуются активные формы кислорода (ROS), которые могут вызвать повреждения макромолекул, изменить метаболическую активность в растениях. Антиоксидантные защитные механизмы стимулируются эндогенными антиоксидантами, к числу которых относятся сахара, свободные аминокислоты, фенольные соединения, пластиды, ферменты и пр. (Janska 2010: 395, Parida 2007:37, Pechanova 2013: 637).

Изучение характера внутриклеточных физиолого-биохимических изменений у растений нута при различных вариантах акклиматизации в контролируемых условиях велось нами по содержанию свободного пролина и сахарозы, фотосинтетических пигментов, каротиноидов и ксантофиллов, активности антиоксидантных ферментов.

Пролин известен как осмотик, накапливающийся в растениях во время стрессовых условий. Это многофункциональная аминокислота, выполняющая роль осморегулятора, стабили-

затора белков и клеточных мембран, индуктора генов, связанных со стресс устойчивостью, антиоксиданта (Szabados 2010: 90). Пролин действует и как сигнальная молекула, запускающая экспрессию защитных генов (Janmohammadi 2012: 1). Содержание свободного пролина в проростках испытываемых образцов нута (за исключением сорта Мальхотра) повышается как к концу акклиматизации при температуре +13°C, так и к концу 2-ого варианта акклиматизации (таблица

1). Сорт Мальхотра характеризовался быстрым ростом концентрации свободной аминокислоты как в 1-ую неделю акклиматизации при температуре +13°C, так и в период ее снижения до +7°C.

Этот сорт относится к дези типу нута, который считают более устойчивым к стрессовым факторам (Yadav 2006: 198).

Пик накопления свободного пролина в начальные недели закаливания отмечен также и Pitsu (Pitsu 2000: 37).

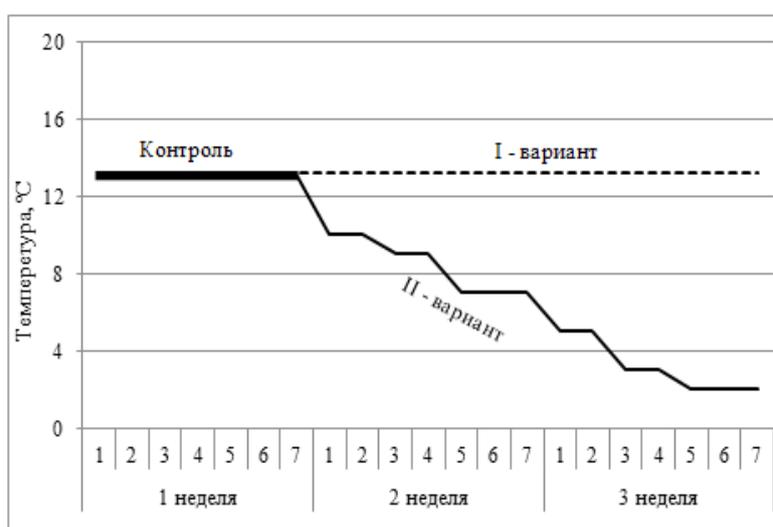


Рисунок 1 – Схема акклиматизации 2-ух недельных образцов нута к холодному стрессу осеннего периода развития в лабораторных условиях

Ряд авторов полагает, что кратковременное влияние холодного стресса в 10°C вызывает запуск механизмов акклиматизации более эффективно у устойчивых форм нута, нежели у чувствительных образцов (Nazari 2012: 183).

Аналогичные результаты по влиянию кратковременного холодного стресса на рост пролина в листьях как закаленных, так и не прошедших акклиматизацию растений получены (Turan 2014: 499).

Таблица 1 – Накопление свободного пролина (мг%) в листьях проростках нута в период акклиматизации в лабораторных условиях

Наименование образца	Акклиматизация				
	Контроль	I вариант		II вариант	
	1-ая неделя (+13°C)	2-ая неделя (+13°C)	3-я неделя (+13°C)	2-ая неделя (+13+7°C)	3-я неделя (+7+2°C)
Мальхотра	384,7±3,53	234,1±3,53	192,9±4,71	437,7±9,41	315,3±14,12
Луч	154,1±8,24	102,4±3,53	402,4±2,35	140,0±1,18	284,7±21,18
Линия 7Б	171,8±4,71	92,9±1,18	435,3±11,7	284,7±2,35	292,9±5,88
Erbsen.Sp.	140,0±5,88	163,5±1,18	217,7±5,88	143,5±2,35	378,8±9,41

Корреляционный анализ не выявил значимых взаимосвязей между уровнем перезимовки растений и накоплением свободного пролина при обоих вариантах акклиматизации. Отсутствие взаимосвязи между накоплением свободного пролина в период акклиматизации и морозостойкостью обнаружено у рапса (Janska, 2010a: 35), (Klima, 2012b: 157). По всей видимости, пролин играет в большей степени роль сигнальной молекулы, от скорости проявления триггерного эффекта которой зависит устойчивость генотипа к низкотемпературным стрессовым факторам, перезимовке. Так, в первую же неделю акклиматизации (+13°C) нами отмечена положительная корреляция между уровнем

свободного пролина и содержанием сахарозы ($r=0,81$), а также с активностью пероксидазы ($r=0,71$).

Растворимые сахара, в том числе и сахароза, играют важную роль в акклиматизации растений к холоду. Они функционируют и как осмопротекторы, и как источники углерода и энергии для роста. Кроме того, сахара служат и как сигнальные молекулы, способствующие организации ответных защитных механизмов при стрессовых ситуациях (Rolland, 2006a: 675), (Ruan, 2014b: 33).

Содержание сахарозы в листьях нута линейно возрастало на всех этапах двух вариантов закаливания (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание сахарозы (%) в проростках нута в период акклиматизации в лабораторных условиях

Наименование	Акклиматизация					
	Контроль	I вариант			II вариант	
	1-ая неделя (+13°C)	2-ая неделя (+13°C)	3-я неделя (+13°C)	2-ая неделя (+13+7°C)	3-я неделя (+7+2°C)	
Мальхотра	3,09±0,03	3,27±0,11	4,90±0,41	3,65±0,52	7,13±0,26	
Луч	2,75±0,27	4,01±0,27	4,54±0,14	3,54±0,01	5,48±0,60	
Линия 7Б	2,93±0,25	4,31±0,15	4,37±0,52	3,02±0,17	4,99±0,59	
Erbsen.Sp.	2,92±0,13	3,79±0,42	3,59±0,05	3,39±0,15	5,02±0,84	

Положительная взаимосвязь ($r=0,88$) выявлена между накоплением сахарозы в проростках нута при усилении воздействия стресса (снижение температуры с +13 до +7°C) и уровнем перезимовки в полевых условиях.

Интенсивное и линейное накопление свободного пролина и растворимых углеводов при понижении температуры в листьях более устойчивого образца нута установлено (Saghfi 2014: 591), ими же выявлено, что у чувствительного образца с увеличением продолжительности воздействия стресса рост в накоплении углеводов замедляется.

Это может быть связано со снижением фотосинтетической активности у чувствительных к холоду растений и использованию ими углеводов в качестве источника энергии (Yuanquan 2009: 145).

Холодовой стресс оказывает значительное влияние на фотосинтетическую активность листьев, содержание соответствующих пигментов, каротиноидов и их окисленных форм. Содержание хлорофилла *a* и *b* положительно

коррелирует с устойчивостью к низким температурам у пшеницы и ржи (Janmohammadi 2010: 236). На содержание хлорофилла *a* в листьях нута в период акклиматизации к низким положительным температурам влияли как длительность воздействия стрессового фактора, так и его интенсивность (таблица 3). Стабильную фотосинтетическую активность на всех этапах закаливания сохранял сортообразец Мальхотра. Концентрация хлорофилла *b* в листьях данного сорта была стабильной как при усилении интенсивности холодового стресса, так и при увеличении его продолжительности (таблица 2).

Значительная положительная корреляция ($r=0,98$) выявлена между содержанием хлорофилла *a* на 2-ой стадии акклиматизации при пребывании растений в понижающемся температурном режиме от +13°C до +7°C и уровнем перезимовки сортообразцов.

Аналогично, высокая корреляция установлена и между содержанием хлорофилла *b*, ксантофилла и каротиноидов в проростках нута на этой же стадии акклиматизации и высоким

процентом перезимовки ($r=0,98, 0,91$, соответственно).

Полученные результаты указывают на то, что содержание фотосинтетических пигментов и каротиноидов может служить физиологическим маркером в отборе холодо- и морозостойких форм нута в лабораторных условиях.

Абиотические стрессы нарушают баланс между реактивными формами кислорода

(ROS) и их утилизацией в клетке, что вызывает повреждение макромолекул (Ishikawa, 2010a: 9), (Huseynova, 2012b: 1516.). Антиоксидантные ферменты: пероксидаза, супероксиддисмутаза, (полифенолоксидаза (PPO) и каталаза (CAT) инактивируют активные формы кислорода, обеспечивая жизнеспособность растения в период воздействия неблагоприятных факторов среды.

Таблица 3 – Содержание хлорофилла а, b, ксантофиллов и каротиноидов в проростках при двух вариантов акклиматизации в лабораторных условиях

Наименование	Акклиматизация				
	Контроль	I вариант		II вариант	
	1-ая неделя (+13°C)	2-ая неделя (+13°C)	3-я неделя (+13°C)	2-ая неделя (+13+7°C)	3-я неделя (+7+2°C)
Хлорофилл а, мг/г					
Мальхотра	1,56±0,008	1,94±0,008	2,12±0,035	1,76±0,010	1,73±0,003
Луч	1,66±0,006	1,75±0,004	1,35±0,007	2,14±0,009	1,28±0,004
Линия 7Б	1,58±0,008	2,15±0,004	1,20±0,003	1,35±0,003	1,12±0,005
Erbsen.Sp.	1,94±0,007	2,3±0,002	1,26±0,003	1,82±0,001	1,33±0,004
Хлорофилл b, мг/г					
Мальхотра	0,40±0,002	0,48±0,002	0,56±0,012	0,41±0,001	0,41±0,003
Луч	0,40±0,000	0,41±0,000	0,31±0,001	0,52±0,001	0,28±0,005
Линия 7Б	0,36±0,004	0,55±0,004	0,30±0,000	0,30±0,000	0,25±0,001
Erbsen.Sp.	0,47±0,002	0,49±0,002	0,30±0,006	0,43±0,002	0,30±0,003
C_{x+c} , мг/г					
Мальхотра	0,46±0,004	0,57±0,004	0,67±0,033	0,51±0,001	0,53±0,002
Луч	0,29±0,008	0,47±0,003	0,39±0,005	0,58±0,023	0,48±0,003
Линия 7Б	0,48±0,002	0,54±0,003	0,41±0,002	0,44±0,014	0,46±0,001
Erbsen.Sp.	0,50±0,004	0,58±0,004	0,37±0,004	0,48±0,011	0,50±0,005

Изучение характера изменения активности антиоксидантных ферментов изучалось нами на растениях нута, прошедших **II-ой вариант закаливания**, поскольку наиболее информативные изменения в растениях нута по содержанию сахарозы, фотосинтетических пигментов, сопряженных со стрессовым влиянием наблюдались при нем.

Результаты исследований показали, что активность супероксиддисмутазы заметно возросла у сортообразца Мальхотра при 1 недельном снижении температуры от +13 до +7°C), тогда как у остальных генотипов, в том числе у имеющих высокий уровень перезимовки (Луч,

E.Sponishe) возрастание активности фермента отмечено при более низком температурном режиме закаливания (1 неделя при +7 +2°C, рисунок 2). Выше нами отмечено, что сортообразец Мальхотра характеризуется быстрой ответной реакцией на снижение температурного режима по накоплению в тканях свободного пролина на этом же этапе закаливания. Полученные результаты подтверждают заключения (Mantri 2007: 303) о том, что ответные реакции на воздействие стрессовых факторов существенно различаются как между устойчивыми и неустойчивыми формами, так и в пределах каждой группы, что сви-

детельствует о множественности генетического контроля ответных антистрессовых механизмов генотипов.

Возрастание активности SOD в ходе акклиматизации при 10°C у более холодостойкой линии нута установлено (Туған 2014: 499). Более высокая активность антиоксидантных ферментов у стресс устойчивых генотипов нута в сравнении с чувствительными формами показана Кауг 2012: 569).

Пероксидазная активность на этапе недельного закаливания при температурах от +13 до +7°C незначительно повышалась или не изменялась у всех устойчивых к перезимовке гено-

типов, тогда как у линии 7Б она в значительной мере подавлялась (рисунок 3).

При более низких положительных температурах закаливания (+7-+2°C) ее активность повышается у всех изученных генотипов. Между активностью пероксидазы проростков нута на этапах понедельного закаливания от +13 до +7°C и от +7 до +2°C и уровнем перезимовки выявлена значительная положительная взаимосвязь ($r=0,83$ и $0,78$, соответственно). Высокая корреляция выявлена между пероксидазной активностью нута на этапе закаливания при +13 – +7°C и содержанием в них сахарозы ($r=0,99$).

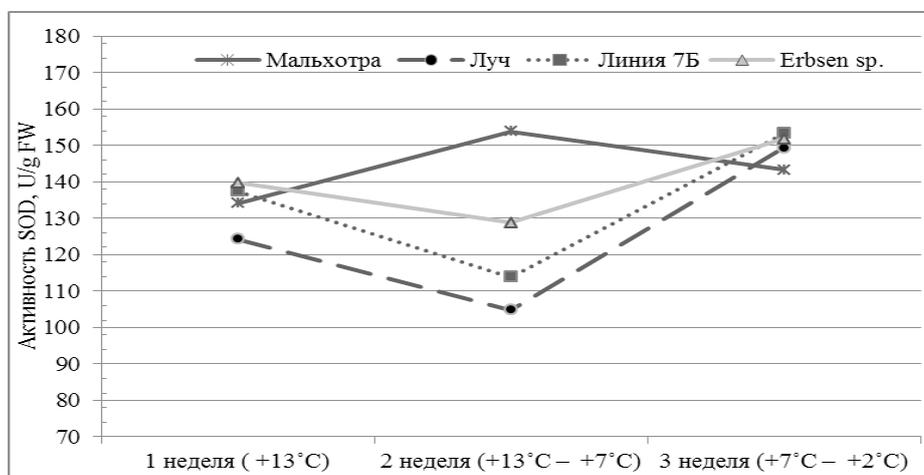


Рисунок 2 – Изменение активности супероксиддисмутазы при II варианте акклиматизации в лабораторных условиях

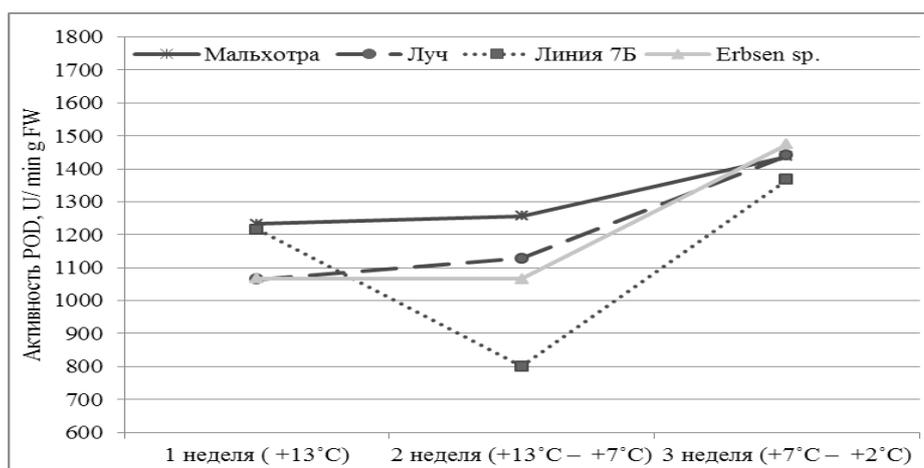


Рисунок 3 – Изменение активности пероксидазы при II варианте акклиматизации в лабораторных условиях

Исходя из характера изменения уровня активностей SOD и POD у морозостойких соотобразцов нута, можно заключить, что сбалансированное изменение активности супероксиддисмутазы и пероксидазы является одним из механизмов защиты от активных форм кислорода и способствует успешной перезимовке растений.

Заключение

В результате моделирования 2-ух вариантов акклиматизации растений к холодовому стрессу в лабораторных условиях проведена оценка физиолого-биохимических изменений в проростках 4-ех образцов нута. Наиболее информативные изменения выявлены в растениях нута при втором варианте закаливания при постепенном снижении температурного режима от +13

до +2 °С. на этапе 1-недельного снижения температуры от +13 до +7°С. Между уровнем сахарозы и перезимовкой нута выявлена высокая положительная корреляция ($r=+0,88$). На этой же стадии закаливания между концентрацией фотосинтетических пигментов, каротиноидов (хлорофилл *a*, *b*, ксантофиллы+каротиноиды) и перезимовкой нута в полевых условиях также выявлена высокая положительная корреляция ($r=0,98; 0,98; 0,91$, соответственно). Общая активность пероксидазы на всех этапах 2-ого варианта закаливания положительно коррелировала с уровнем сахарозы и свободного пролина в растениях, а также с числом перезимовавших растений.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК 0783/ГФ4, ГР №0115РК00697

Литература

- 1 Singh K.B., Ocamp O.B., Exploitation of wild Cicer species for yield improvement in chickpea // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – V. 95. – P. 418-423.
- 2 Croser J.S., Clarke H.J., Siddique K.H.M., Khan T.N. Low Temperature Stress: Implications for Chickpea (Cicer arietinum L.) Improvement // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2003. – V. 22. – P. 185–219.
- 3 Singh K.B., Malhotra R.S., Saxena M.C. Relationship between cold severity and yield loss in chickpea. (Cicer arietinum L.) // Journal of Agronomy. – 1993. – V. 170. – P. 121-127.
- 4 Hughes M.A., Dunn M.A. The effect of temperature on plant growth and development // Biotech. Genet. – 1990. – V. 8. – P. 161–188.
- 5 Hughes M.A., Dunn M.A. The molecular biology of plant acclimation to low temperature // J. Exp. Bot. – 1996. – V. 47. – P. 291–305.
- 6 Chohan A., Raina S.K. Comparative studies on morphological and biochemical characters of chickpea genotypes under chilling stress // J. Environ. Biol. – 2011. – V. 32. – P. 189-194.
- 7 Tatar O., Ozalkan C., Atasoy G.D. Partitioning of dry matter, proline accumulation, chlorophyll content and antioxidant activity of chickpea (Cicer arietinum L.) plants under chilling stress // Journal of Agricultural Science. – 2013. – V. 19. – P. 260-265.
- 8 Turan Ö., Ekmekci Y. Chilling tolerance of Cicer arietinum lines evaluated by photosystem II and antioxidant activities // Turkish Journal of Botany. – 2014. – V. 38. – P. 499-510.
- 9 Maller P.R., McKay K.N., Jenks B.A. Growing chickpea in the northern great plains // Montana State University Press. – 2002. – V. 47. P. 1-8.
- 10 Saghi S., Eivazi A.R. Effect of cold stress on proline and soluble carbohydrates accumulation in two chickpea cultivars // J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. – 2014. – V. 32. – P. 591-595.
- 11 Nayyar H., Chander K., Kumar S., Bains T. Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea Agron. Sustain. Dev. – 2005. – V. 25. – P. 381–388.
- 12 Kaur S., Arora M., Gupta A.K., Kaur N. Exploration of biochemical and molecular diversity in chickpea seeds to categorize cold stress-tolerant and susceptible genotypes // Acta Physiol Plant. – 2012. – V. 34. – P. 569–580.
- 13 Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. of Plant Physiology. – 1994. – V. 144. – P. 307–313.
- 14 Bates L.D., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water – stress studies // Plant and Soil. – 1973. – V. 39. – P. 2005-2007.
- 15 Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smoth F. Colorimetric Method for determination of Sugars and related Substances // Analytical Chemistry. – 1956. – V. 28. – P. 350-356.
- 16 Mohammad R.A., Majid M. Antioxidative and biochemical responses of wheat to drought stress // Journal of Agricultural and Biological Science. – 2013. – V. 8. – P. 291-301.
- 17 Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal Biochem. – 1971. – V. 44. – P. 276-287.
- 18 Бояркин, А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. – 1951. – Т. 16, вып. 4. – С. 352-355.
- 19 Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sciences. – 2010. – V. 15. – P. 89-97.

- 20 Janmohammadi M. Metabolic analysis of low temperature responses in plants // *Current Opinion in Agriculture*. – 2006. – V. 1. – P. 1-6.
- 21 Petcu E, Perbea M., Dupa Z., Ionescu D. Study on the relationship between frost resistance and free proline content in some winter wheat and barley genotypes // *Romanian agricultural science*. – 2010. – V. 13-14. – P. 37-41.
- 22 Nazari M.R., Maali M.R., Mehraban F.H., Khaneghah H.Z. Change in Antioxidant Responses against Oxidative Damage in Black Chickpea Following Cold Acclimation // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2012. – V. 59. – P. 183-189.
- 23 Janska A., Zelenkova S., Klima M., Vyvadilova M., Prasil I.T. Freezing tolerance and proline content of in vitro selected hydroxiprolin resistant winter oilseed rape // *Czech J.genet.plant Breed*. – 2010. – V. 46. – P. 35-40.
- 24 Klima M., Vitamvas P., Zelenkova S., Vyvadilova M., Prasil I.T. Dehydrin and proline content in Brassica napus and B.carinata under cold stress at two irradiances // *Biologia Plantarum*. – 2012. – V. 56. – P. 157-161.
- 25 Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms // *Annu Rev Plant Biol*. – 2006. – V. 57. – P. 675-709.
- 26 Ruan Y.L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling // *Annu Rev Plant Biol*. – 2014. – V. 65. – P. 33-67.
- 27 Yuanyuan M., Yali Z., Jiang L., Hongbo S. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress // *African journal of Biotechnology*. – 2009. – V. 8. – P. 145-153.
- 28 Janmohammadi M. Study of interrelationship between vegetative/reproductive transition stage and cold induced proteins expression using proteomics analysis in wheat grown under field conditions (Ph.D. Thesis). – University of Tehran. – 2010, 236 pp.
- 29 Ishikawa T., Takahara K., Hirabayashi T., Matsumura H., Fujisawa S., Terauchi R. Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1 // *Plant Cell Physiol*. – 2010. – V. 51(1). – P. 9-20.
- 30 Huseynova I.M. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 8. – P. 1516-1523.
- 31 Mantri N.L., Ford R., Coram T.E., Pang E.C. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought // *BMC Genomics*. – 2007. – V. 8. – P. 303-316.
- 32 Yadav S.S., Kumar J., Yadav S.K., Singh S., Yadav V.S., Turner N.C., Redden R. Evaluation of Helicoverpa and drought resistance in desi and kabuli chickpea // *Plant. Genet. Res*. – 2006. – V. 4. – P. 198-203.

References

- 1 Singh K.B., Ocamp O.B. "Exploitation of wild Cicer species for yield improvement in chickpea" *Theoretical and Applied Genetics* 95 (1997): 418-423. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220050>
- 2 Croser J.S., Clarke H.J., Siddique K.H.M., Khan T.N. "Low Temperature Stress: Implications for Chickpea (Cicer arietinum L.) Improvement" *Critical Reviews in Plant Sciences* 22 (2003): 185-219. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/713610855>
- 3 Singh K.B., Malhotra R.S., Saxena M.C. "Relationship between cold severity and yield loss in chickpea. (Cicer arietinum L.)" *Journal of Agronomy* 170 (1993): 121-127. DOI: 10.1111/j.1439-037X.1993.tb01065.x
- 4 Hughes M.A., Dunn M.A. "The effect of temperature on plant growth and development" *Biotech. Genet* 8 (1990): 161-188.
- 5 Hughes M.A., Dunn M.A. "The molecular biology of plant acclimation to low temperature" *J. Exp. Bot.* 47 (1996): 291-305. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/02648725.1990.10647868>
- 6 Chohan A., Raina S.K. "Comparative studies on morphological and biochemical characters of chickpea genotypes under chilling stress" *J. Environ. Biol.* 32 (2011): 189-194. ISSN: 0254-8704
- 7 Tatar O., Ozalkan C., Atasoy G.D. "Partitioning of dry matter, proline accumulation, chlorophyll content and antioxidant activity of chickpea (Cicer arietinum L.) plants under chilling stress" *Journal of Agricultural Science*. 19 (2013): 260-265.
- 8 Turan Ö., Ekmekci Y. "Chilling tolerance of Cicer arietinum lines evaluated by photosystem II and antioxidant activities" *Turkish Journal of Botany* 38 (2014): 499-510. DOI:10.3906/bot-1309-7
- 9 Maller P.R., McKay K.N., Jenks B.A. "Growing chickpea in the northern great plains" *Montana State University Press*. 47 (2002): 1.
- 10 Saghfi S., Eivazi A.R. "Effect of cold stress on proline and soluble carbohydrates accumulation in two chickpea cultivars" *J.Curr. Microbiol. Appl. Sci* 32 (2014): 591-595. ISSN: 2319-7706
- 11 Nayyar H., Chander K., Kumar S., Bains T. "Glycine betaine mitigates cold stress damage in Chickpea" *Agron. Sustain. Dev.* 25 (2005): 381-388. DOI: 10.1051/agro:2005033
- 12 Kaur S., Arora M., Gupta A.K., Kaur N. "Exploration of biochemical and molecular diversity in chickpea seeds to categorize cold stress-tolerant and susceptible genotypes" *Acta Physiol Plant* 34 (2012): 569-580. DOI 10.1007/s11738-011-0856-z
- 13 Wellburn A.R. "The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution" *J. of Plant Physiology*. 144 (1994): 307-313. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- 14 Bates L.D., Waldren R.P., Teare I.D. "Rapid determination of free proline for water – stress studies" *Plant and Soil*. 39 (1973): 2005-2007. DOI: 10.1007/BF00018060
- 15 Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smoth F. "Colorimetric Method for determination of Sugars and related Substances" *Analytical Chemistry*. 28 (1956): 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017
- 16 Mohammad R.A., Majid M. "Antioxidative and biochemical responses of wheat to drought stress" *Journal of Agricultural and Biological Science*. 8 (2013): 291-301. ISSN: 1990-6145

- 17 Beauchamp C., Fridovich I. "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels" *Anal Biochem* 44 (1971): 276-287. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- 18 Boiarkin, A.N. "Bystryi metod opredeleniia aktivnosti peroksidazy" *Biokhimiia*. 16 (1951): 352-355. (In Russian).
- 19 Szabados L., Savoure A. "Proline: a multifunctional amino acid" *Trends Plant Sciences*. 15 (2010): 89-97. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009
- 20 Janmohammadi M. "Metabolic analysis of low temperature responses in plants" *Current Opinion in Agriculture*. 1 (2012): 1-6.
- 21 Petcu E, Perbea M., Dupa Z., Ionescu D. "Study on the relationship between frost resistance and free proline content in some winter wheat and barley genotypes" *Romanian agricultural science* 13-14 (2010): 37-41.
- 22 Nazari M.R., Maali Amiri M.R., Mehraban F.H., Khaneghah H.Z. "Change in Antioxidant Responses against Oxidative Damage in Black Chickpea Following Cold Acclimation" *Russian Journal of Plant Physiology* 59 (2012): 183-189. ISSN: 1021_4437
- 23 Janska A., Zelenkova S., Klima M., Vyvadilova M., Prasil I.T. "Freezing tolerance and proline content of in vitro selected hydroxiproline resistant winter oilseed rape" *Czech J.genet.plant Breed.* 46 (2010): 35-40. ISSN : 1212-1975
- 24 Klima M., Vitamvas P., Zelenkova S., Vyvadilova M., Prasil I.T. "Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B.carinata* under cold stress at two irradiances" *Biologia Plantarum*. 56 (2012): 157-161. ISSN : 0006-3134
- 25 Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. "Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms" *Annu Rev Plant Biol* 57 (2006): 675-709. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441
- 26 Ruan Y.L. "Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling" *Annu Rev Plant Biol.* 65 (2014): 33-67. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251
- 27 Yuanyuan M., Yali Z., Jiang L., Hongbo S. "Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress" *African journal of Biotechnology*. 8 (2009): 145-153. ISSN: 1684-5315
- 28 Janmohammadi M. "Study of interrelationship between vegetative/reproductive transition stage and cold induced proteins expression using proteomics analysis in wheat grown under field conditions" (Ph.D. Thesis., University of Tehran, 2010).
- 29 Ishikawa T., Takahara K., Hirabayashi T., Matsumura H., Fujisawa S., Terauchi R. "Metabolome analysis of response to oxidative stress in rice suspension cells overexpressing cell death suppressor Bax inhibitor-1" *Plant Cell Physiol.* 51(1) (2010): 9-20. DOI: 10.1093/pcp/pcp162
- 30 Huseynova I.M. "Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought" *Biochim Biophys Acta.* 8 (2012): 1516-1523. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.02.037
- 31 Mantri N.L., Ford R., Coram T.E., Pang E.C. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought // *BMC Genomics* 8 (2007): 303-316. DOI:10.1186/1471-2164-8-303
- 32 Yadav S.S., Kumar J., Yadav S.K., Singh S., Yadav V.S., Turner N.C., Redden R. "Evaluation of *Helicoverpa* and drought resistance in desi and kabuli chickpea" *Plant. Genet. Res* 4 (2006): 198-203. DOI: <https://doi.org/10.1079/PGR2006123>