

ORIGINAL ARTICLE

Tebuconazole Regulates Fatty Acid Composition of Etiolated Winter Wheat Seedlings

A.V. Korsukova^{1,2*}, T.G. Gornostai¹, O.I. Grabelnych^{1,2},
N.V. Dorofeev¹, T.P. Pobezhimova¹, N.A. Sokolova¹,
L.V. Dudareva¹, V.K. Voinikov¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

*E-Mail: avkorsukova@gmail.com

Received May 12, 2016

The fatty acid composition of shoots of unhardened and hardened to cold etiolated winter wheat seedlings grown from seeds treated with tebuconazole-based protectant «Bunker» (content of tebuconazole 60 grams per liter, g/L), and the seedlings frost resistance has been studied. It is shown that treatment of winter wheat seeds by «Bunker» preparation (1,5 microliter per gram of seeds, $\mu\text{l/g}$) is accompanied by an increase of the fatty acids unsaturation in the shoots and increase of the seedlings frost resistance ($-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h). The most pronounced decrease in the content of saturated palmitic acid and increase in the content of unsaturated α -linolenic acid were observed during cold hardening of winter wheat seedlings grown from seeds treated by tebuconazole-based protectant. It is concluded that the seeds treatment with tebuconazole-based protectant causes changes of fatty acid composition of winter wheat seedlings to increase their frost resistance.

Key words: triazole, tebuconazole, winter wheat, *Triticum aestivum* L., fatty acid composition, α -linolenic acid, Double Bond Index, frost-resistance

Низкотемпературная адаптация морозостойких травянистых растений характеризуется структурными перестройками клеточных мембран, благодаря которым минимизируется риск их повреждения внеклеточным льдом, увеличивается текучесть липидного бислоя мембран и снижается температура его фазового перехода из жидкокристаллического в гелеобразное состояние, увеличивается проницаемость мембран для оттока воды в межклетники, что предотвращает внутриклеточное льдообразование (Khochachka and Somero, 1988; Vereshchagin, 2007; Trunova, 2007). Изменение жирнокислотного состава мембранных липидов при холодовом закаливании заключается в увеличении содержания мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот (МНЖК и ПНЖК) (Vereshchagin, 2007; Makarenko *et al.*, 2010). Считается, что наибольшее значение при низкотемпературной адаптации злаков имеет увеличение содержания ПНЖК – α -линоленовой кислоты (Vereshchagin, 2007). Увеличение степени ненасыщенности жирных кислот связано с работой ацил-липидных десатураз (Los', 2014). Показано, что к увеличению активности данных ферментов может приводить обработка растений экзогенной абсцизовой кислотой (АБК), которая совместно с низкотемпературным закаливанием ещё в большей степени усиливает десатуразную активность (Bakht *et al.*, 2006). В литературе имеются данные, что производные 1,2,4-триазола – ингибиторы синтеза стероидов и терпеноидов – приводят к повышению содержания эндогенной АБК (Prusakova and Chizhova, 1998; Chizhova *et al.*, 2005).

Ранее нами было показано, что обработка семян озимой пшеницы производным 1,2,4-триазола – тебуконазолом ((1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол)) приводит к ингибированию ростовых процессов у этиолированных проростков озимой пшеницы, индукции синтеза низкомолекулярных дегидринов и повышению морозоустойчивости проростков (Korsukova *et al.*, 2015). Поскольку производные 1,2,4-триазола вызывают повышение содержания АБК, которая в свою очередь увеличивает активность десатураз, что приводит к увеличению ненасыщенности жирных кислот в составе липидов, можно предположить, что тебуконазол-содержащий препарат способен оказывать влияние на жирнокислотный состав липидов, повышая устойчивость проростков озимой пшеницы к низким температурам.

В связи с этим в настоящей работе изучалось влияние обработки семян тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» на жирнокислотный состав побегов этиолированных проростков озимой пшеницы.

MATERIALS AND METHODS

В работе использовали этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт «Иркутская»). Семена обрабатывали тебуконазол-содержащим протравителем семян (водно-суспензионный концентрат) «Бункер» (1,5 мкл/г семян) – системным фунгицидом профилактического и лечебного действия фирмы «Август» (Россия), содержание тебуконазола в препарате 60 г/л. Семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге на воде в темноте при 24 °С в течение 3-х суток.

Холодовое закаливание 3-х суточных этиолированных проростков из необработанных и обработанных препаратом «Бункер» семян проводили в течение 7-ми суток при температуре 2 °С в камере тепла/холода МКТ-240 (ЦКП СИФИБР СО РАН «Фитотрон»).

Для определения морозоустойчивости холодозакалённые этиолированные проростки из необработанных и обработанных препаратом «Бункер» семян промораживали при температуре –8 °С в течение 24 ч. Затем проростки оттаивали при 2 °С в течение суток, после чего оставляли растения отрастать в темноте при 24 °С в течение 7-и суток. Количество выживших после промораживания проростков выражали в процентах от общего числа проростков.

Для изучения жирнокислотного состава анализировали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). Исследуемый материал по 1 г замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С. Затем образцы растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния. Экстракцию липидов, получение и анализ МЭЖК проводили по ранее описанной методике (Grabel'nykh et al., 2014). Хлороформные экстракты липидов хранили при –20 °С с добавлением ионола до концентрации 0,05% (Keits, 1975). Анализ МЭЖК проводили методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии 5973/6890N MSD/DS (“Agilent Technologies”, США). Детектор – квадрупольный масс-спектрометр, способ ионизации – электронный удар, энергия ионизации – 70 эВ; анализ проводили в режиме регистрации полного ионного тока. Для разделения смеси МЭЖК использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX (30

м × 250 мкм × 0,50 мкм) со стационарной фазой (ПЭГ). Газ-носитель – гелий, скорость потока газа – 1 мл/мин. Температура испарителя – 250 °С, источника ионов – 230 °С, детектора – 150 °С; температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280 °С. Диапазон сканирования – 41–450 а.е.м. Объём вводимой пробы – 1 мкл, делитель потока – 5 : 1. Разделение смеси МЭЖК выполняли в изотермическом режиме при 200 °С. Для идентификации МЭЖК проводили расчёт эквивалентной длины алифатической цепи (ECL), использовали библиотеки масс-спектров NIST 05, Christie и сравнение времени удерживания со временем удерживания стандартных соединений. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах от общего их содержания в образце. Для оценки ненасыщенности жирных кислот использовали индекс двойной связи (Double Bond Index): $DBI = \sum P_j n_j / 100$, где P_j – содержание жирной кислоты (вес. %) и n_j – количество двойных связей в каждой кислоте (Lyons et al., 1964). В таблице также представлены показатели \sum_{SFA} – сумма насыщенных жирных кислот, \sum_{USFA} – сумма ненасыщенных жирных кислот, \sum_{USFA} / \sum_{SFA} – отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в 3-х кратной повторности (n). В связи с тем, что характер распределения большинства данных отличался от нормального, для характеристики выборки представлена медиана (Me), а разброс значений в

выборке – в виде интерквартильной широты [25%;75% процентиль] или доверительного интервала (95% рассчитанный по методу Уилсона). Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для доказательства наличия значимых различий между медианами по вариантам использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса. Для сравнения пропорций (данные по выживаемости) использовали Z-тест. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

RESULTS AND DISCUSSION

В таблице 1 приведён жирнокислотный состав побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных из семян обработанных и необработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», до и после холодого закаливания. Как видно из данных, представленных в таблице 1, жирные кислоты, входящие в состав побегов озимой пшеницы, содержат в углеродной цепи от 14 до 22 атомов.

В контрольных проростках до закаливания среди насыщенных жирных кислот (НЖК) преобладают: пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и бегеновая (C22:0) кислоты, а среди мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот (МНЖК и ПНЖК) – олеиновая (C18:1(n-9)), линолевая (C18:2(n-6)) и α -линоленовая (C18:3(n-3)) кислоты. Содержание остальных НЖК, МНЖК и ПНЖК не превышает 1% (Таблица 1).

По сравнению с контрольными растениями в незакалённых проростках озимой пшеницы, выращенных из семян, обработанных протравителем

«Бункер», наблюдалось снижение содержания НЖК и увеличение содержания ПНЖК (Таблица 1). Содержание α -линоленовой кислоты статистически значимо увеличилось на 9,8%, в то же время наблюдалась тенденция к снижению содержания линолевой кислоты (на 5,5%), DBI повысился на 2,5%, а отношение $\Sigma_{USFA}/\Sigma_{SFA}$ – на 3%. Полученные данные свидетельствуют о том, что обработка семян озимой пшеницы тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» уже в контрольных условиях приводит к увеличению степени ненасыщенности жирных кислот, характерному для низкотемпературной адаптации злаков.

Холодовое закаливание контрольных проростков озимой пшеницы из необработанных семян не приводило к существенным различиям качественного состава жирных кислот (Таблица 1). У закалённых растений увеличивалось содержание α -линоленовой кислоты (на 8,6%), вероятно, частично обусловленное снижением содержания линолевой кислоты (на 8,8%). Также наблюдали значительное увеличение содержания бегеновой кислоты (на 94%) в закалённых проростках в сравнении с контрольными.

Жирнокислотный состав закалённых проростков озимой пшеницы, выращенных из семян, обработанных протравителем «Бункер», качественно соответствовал жирнокислотному составу контрольных проростков, но существенно отличался от них по количественному содержанию жирных кислот. В закалённых растениях из обработанных семян наблюдали снижение содержания НЖК и увеличение содержания ПНЖК, что выражалось в статистически значимом снижении содержания пальмитиновой

кислоты и увеличении содержания α -линоленовой кислоты. Наряду с этим наблюдалась тенденция к снижению содержания линолевой кислоты. Увеличение показателей DBI и отношения $\Sigma_{USFA}/\Sigma_{SFA}$ (Таблица 1) превышало таковое у контрольных незакалённых проростков, контрольных закалённых проростков и незакалённых проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер». Таким образом, нами установлено, что обработка семян озимой пшеницы препаратом «Бункер» сопровождается увеличением содержания α -линоленовой кислоты в побегах проростков, выращенных из этих семян как в незакалённом состоянии, так и после закаливания. Увеличение содержания ПНЖК в растениях наблюдали и при обработке семян другими регуляторами роста (Zhigacheva *et al.*, 2011). Повышение содержания ПНЖК, особенно α -линоленовой кислоты, рассматривается как адаптивное изменение клеток растений к действию низких температур (Vereshchagin, 2007).

Холодозакалённые проростки озимой пшеницы, выращенные из обработанных препаратом «Бункер» семян, были более устойчивы к действию отрицательных температур, чем контрольные растения. Так, после промораживания озимой пшеницы в течение 24 ч при температуре $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ выживаемость проростков из обработанных препаратом семян превысила выживаемость контрольных растений в 1,6 раза (Рисунок 1).

Таким образом, обработка семян тебуконазол-

содержащим протравителем «Бункер» приводит к повышению ненасыщенности жирных кислот в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы. Повышение ненасыщенности, главным образом, связано с увеличением содержания α -линоленовой кислоты и особенно выражено в условиях холодого закаливания. Увеличение числа двойных связей в жирных кислотах, как известно, снижает температуру фазового перехода и способствует нормальному функционированию мембран в области пониженных температур (Khochachka and Somero, 1988; Vereshchagin, 2007). Обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом и холодое закаливание ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 суток) сопряжены с изменениями в жирнокислотном составе побегов проростков, что приводит к повышению устойчивости растений к действию низких температур.

В литературе имеются данные об АБК-индуцируемой десатурации НЖК мембранных липидов. Так, обработка листьев нута экзогенной АБК с последующим низкотемпературным закаливанием или без него приводит к усилению ацил-липидной десатурации (Bakht *et al.*, 2006). Принимая во внимание тот факт, что производные триазола вызывают увеличение содержания эндогенной АБК (Prusakova and Chizhova, 1998; Chizhova *et al.*, 2005), можно предположить, что увеличение степени ненасыщенности жирных кислот у злаков из обработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» семян (как до, так и после закаливания), вероятно, является АБК-зависимым.

Table 1. Жирнокислотный состав (вес. %) побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных из необработанных (Контроль) и обработанных препаратом «Бункер» семян

Жирная кислота	До закаливания		Холодовое закаливание	
	Контроль (n=4)	«Бункер» (n=3)	Контроль (n=3)	«Бункер» (n=3)
C14:0 миристиновая	0,63 [0,15;0,72]	0,74 [0,18;0,90]	0,50 [0,45;0,67]	0,52 [0,32;0,64]
C15:0 пентадециловая	0,13 [0,00;0,29]	0,23 [0,05;0,32]	0,39 [0,08;0,60]	0,32 [0,23;0,33]
C16:0 пальмитиновая	27,47 [26,55;28,67]	27,02 [25,38;29,36]	28,99^a [25,21;30,75]	24,51^a [22,29;25,87]
C16:1 [*]	0,53 [0,13;0,98]	0,31 [0,04;0,62]	0,86 [0,73;1,13]	0,77 [0,55;0,89]
C17:0 маргариновая	0,10 [0,00;0,22]	0,00 [0,00;0,20]	0,00 [0,00;0,18]	0,15 [0,00;0,17]
C18:0 стеариновая	1,00 [0,89;1,88]	0,86 [0,78;1,36]	1,47 [1,11;1,91]	1,09 [0,93;1,33]
C18:1(n-9) олеиновая	8,24^{b,c} [7,92;8,58]	8,01^e [7,78;8,42]	6,57^{b,c} [5,54;7,47]	7,22^e [6,71;8,11]
C18:1(n-7) цис-вакценовая	0,92 ^b [0,75;1,05]	1,09 ^{f,e} [0,99;1,27]	0,78 [0,58;0,81]	0,62 ^{b,f,e} [0,48;0,90]
C18:2(n-6) линолевая	32,58 [31,01;33,31]	30,79 [30,05;32,35]	29,70 [27,46;32,33]	27,02 [25,64;28,16]
C18:3(n-3) α-линоленовая	26,69^{a,b} [26,48;27,64]	29,33^{a,r} [26,29;30,62]	28,99^{b,d} [25,64;31,72]	35,33^{b,r,d} [29,89;37,40]
C20:0 арахиновая	0,13 ^b [0,03;0,14]	0,00 ^{f,e} [0,00;0,09]	0,32 ^{b,d,e} [0,30;0,40]	0,18 ^{f,d} [0,00;0,27]
C20:1(n-11) гондоиновая	0,54 [0,12;0,60]	0,52 [0,44;0,62]	0,48 [0,43;0,59]	0,51 [0,36;0,57]
C20:2(n-9)	0,00 ^b [0,00;0,23]	—	—	0,30 ^b [0,00;0,33]
C22:0 бегеновая	0,84^{b,c} [0,67;1,20]	0,90^{f,e} [0,81;1,16]	1,63^{b,c} [1,32;1,94]	1,71^{b,r} [1,53;1,91]
DBI	1,56^{a,b} [1,55;1,57]	1,60^{a,r} [1,51;1,65]	1,53^a [1,47;1,67]	1,70^{b,r,d} [1,52;1,78]
Σ_{SFA}	30,62 [30,05;31,03]	29,93 [27,71;32,69]	33,95 [28,97;35,30]	28,32 [25,89;34,07]
Σ_{USFA}	69,38 [68,98;69,95]	69,98 [67,31;72,24]	66,06 [64,70;71,03]	71,68 [65,93;74,12]
Σ_{USFA}/Σ_{SFA}	2,27^{a,b} [2,22;2,33]	2,34^{a,r} [2,06;2,61]	1,95^a [1,83;2,47]	2,53^{b,r,d} [1,94;2,86]

Примечание: C16:1^{*} – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; DBI (Double Bond Index) – индекс двойной связи; Σ_{SFA} – сумма насыщенных жирных кислот; Σ_{USFA} – сумма ненасыщенных жирных кислот; Σ_{USFA}/Σ_{SFA} – отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот. n=3-4. Ме [25%;75%]. Статистическую значимость отличий (p≤0,05) определяли, используя H-критерий Краскела-Уоллиса. ^a – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» до закаливания статистически значимы; ^b – различия между вариантами контроль до закаливания и контроль закаливание статистически значимы; ^c – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^d – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^e – различия между вариантами контроль закаливание и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^f – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и контроль закаливание статистически значимы.

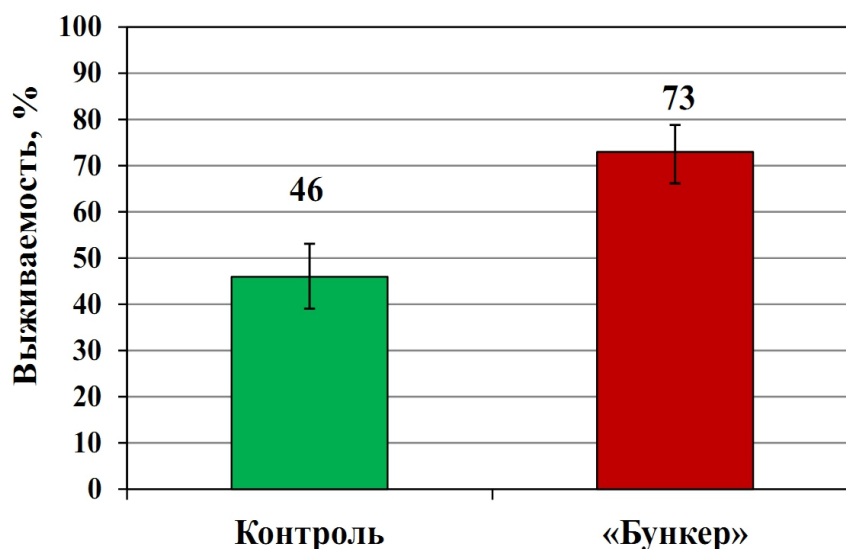


Figure 1. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на выживаемость проростков озимой пшеницы после действия отрицательной температуры -8°C (24 ч).

Обозначения: Контроль – холодозакалённые проростки, выращенные из необработанных семян, «Бункер» – холодозакалённые проростки, выращенные из обработанных семян. Барями указан доверительный интервал (95% рассчитанный по методу Уилсона). Различия между вариантами статистически значимы $z=6,422$, $p\leq 0,001$ (Z-тест для сравнения пропорций).

CONCLUSION

Учитывая ранее проведённые исследования (Korsukova et al., 2015) можно заключить, что обработка тебуконазол-содержащим препаратом оказывает комплексное влияние на клеточный метаболизм озимых злаков и происходящие изменения в содержании стрессовых белков и жирнокислотном составе направлены на повышение морозоустойчивости растений.

REFERENCES

- Bakht J., Bano A., Dominy P. (2006) The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. *J. Exp. Bot.*, **57**, 14, 3707–3715.
- Chizhova S.I., Pavlova V.V., Prusakova L.D. (2005) Soderzhanie abstsizovoi kisloty i rost rastenii yarovogo yachmenya pod deistviem triazolov. *Fiziologiya rastenii* [In Russian], **52**, 108–114.
- Grabel'nykh O.I., Kirichenko K.A., Pobezhimova T.P., Borovik O.A., Pavlovskaya N.S., Lyubushkina I.V., Koroleva N.A., Voinikov V.K. (2014) Vliyanie kholodovogo shoka na zhirkokislotnyi sostav i funktsional'noe sostoyanie mitokhondrii zakalennykh i nezakalennykh prorstkov ozimoi pshenitsy. *Biol. membrany* [In Russian], **31**, 3, 204–217.
- Keits M. (1975) Tekhnika lipidologii. Vydelenie, analiz i identifikatsiya lipidov. M.: Mir [In Russian], 233 s.
- Khochachka P. and Somero Dzh. (1988) Biokhimicheskaya adaptatsiya. M.: Mir [In Russian],

- 568 s.
- Korsukova A.V., Borovik O.A., Grabelnykh O.I., Voinikov V.K. (2015) The tebuconazole-based protectant of seeds "Bunker" induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* [In Russian], **11**, **4**, 118–127.
- Los' D.A. (2014) Desaturazy zhirnykh kislot. M.: Nauchnyi mir [In Russian], 372 s.
- Lyons J.M., Wheaton T.A., Pratt H.K. (1964) Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.*, **39**, **2**, 262–268.
- Makarenko S.P., Dudareva L.V., Katyshev A.I., Konenkina T.A., Nazarova A.V., Rudikovskaya E.G., Sokolova N.A., Chernikova V.V., Konstantinov Yu.M. (2010) Vliyaniye nizkikh temperatur na zhirnokislotnyi sostav kontrastnykh po kholodoustoichivosti vidov zlakov. *Biol. membrany* [In Russian], **27**, **6**, 482–488.
- Prusakova L.D. and Chizhova S.I. (1998) Primeneniye proizvodnykh triazola v rastenievodstve (obzor). *Agrohimija* [In Russian], **10**, 37–44.
- Trunova T.I. (2007) Rasteniye i nizkotemperaturnyy stress. M.: Nauka [In Russian], 54 s.
- Vereshchagin A.G. (2007) Lipidy v zhizni rastenii. M.: Nauka [In Russian], 76 s.
- Zhigacheva I.V., Misharina T.A., Terenina M.B., Krikunova N.N., Burlakova E.B., Generozova I.P., Shugaev A.G., Fattakhov S.G., Konovalov A.I. (2011) Zhirnokislotnyi sostav membran mitokhondrii prorstkov gorokha v usloviyakh nedostatka uvlazhneniya i umerennogo okhlazhdeniya. *Doklady Akademii nauk* [In Russian], **437**, **4**, 558–560.