

УДК 581.1.036.2:577.13

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПРОЛИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ И ФОРМИРОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ

А.А. ВАЙНЕР, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, А.И. ОБОЗНЫЙ

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
62483 Харьков, п/о «Коммунист-1»  
e-mail: plant\_biology@mail.ru

Исследовали влияние экзогенного пролина на теплоустойчивость проростков пшеницы и динамику содержания в них пероксида водорода. Обработка проростков 1 мМ раствором пролина угнетала развитие индуцированной теплоустойчивости, вызываемое одноминутным воздействием закалывающей температуры (42 °С), но не влияла на базовую теплоустойчивость. При этом пролин устранял вызываемое закалыванием транзиторное повышение содержания пероксида водорода в корнях и побегах проростков. Экзогенный валин, используемый для оценки специфичности действия пролина, не влиял на содержание пероксида водорода в проростках и формирование их теплоустойчивости после закалывания. Сделано заключение, что снижение эффекта теплового закалывания проростков пшеницы при обработке пролином связано с его влиянием на содержание активных форм кислорода, задействованных в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости.

*Ключевые слова:* *Triticum aestivum* L., пролин, пероксид водорода, тепловое закалывание.

Пролин является полифункциональным стрессовым метаболитом растений. Его накопление в растениях зарегистрировано при действии неблагоприятных факторов различной природы: засоления, засухи, тяжелых металлов, УФ-излучения [10, 22, 23]. Осмопротекторная функция пролина общеизвестна. Он также проявляет свойства биорегулятора и молекулярного шаперона, стабилизируя клеточные структуры [5, 11, 23]. Эта аминокислота обладает и антиоксидантной активностью. Так, экзогенный пролин, снижая содержание активных форм кислорода (АФК), предотвращал программируемую гибель мутантного грибного патогена люцерны *Colletotrichum trifolii* с нарушенным образованием АФК [9]. Показано защитное влияние пролина на растения в условиях окислительного стресса, вызываемого паракватом [3] и пероксидом водорода [4].

В то же время имеются сведения и о прооксидантном действии пролина [15]. Трансформанты арабидопсиса со сверхэкспрессией гена ключевого энзима синтеза пролина  $\Delta^1$ -пирролин-5-карбоксилатсинтазы отличались сниженной устойчивостью к окислительному стрессу и гипертермии [14]. При усилении окисления пролина, катализируемого пролиндегидрогеназой, возможно образование АФК и даже индукция клеточной гибели [8].

© А.А. ВАЙНЕР, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, А.И. ОБОЗНЫЙ, 2014

Ранее нами было показано участие АФК в индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы кратковременным действием высоких температур [12]. В связи с известным фактом накопления пролина в растениях при действии стрессоров различной природы, а также сведениями о его про- и антиоксидантных эффектах представляло интерес изучение влияния экзогенного пролина на индуцированную теплоустойчивость растений и содержание в них пероксида водорода, который считается основной сигнальной АФК [19]. Для оценки специфичности эффектов пролина изучали также влияние валина на указанные показатели.

### Методика

Объектами исследования были трехсуточные (на момент начала экспериментов) этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, выращенные при температуре 23 °С. На растворы пролина или валина проростки помещали за сутки до теплового закаливания. Растения контрольного варианта инкубировали на очищенной водопроводной воде.

Тепловое закаливание проростков осуществляли путем их погружения в ванну водяного ультратермостата с температурой 42 °С на 1 мин. После этого в течение суток проростки продолжали инкубировать на растворах указанных аминокислот, контрольные образцы выдерживали на воде.

Через сутки после закаливания проростки подвергали тепловому повреждающему воздействию — прогреву в водяном ультратермостате в течение 10 мин при температуре 46 °С. Режимы закаливающего и повреждающего тепловых воздействий были выбраны на основании экспериментов, проведенных ранее [1, 12]. Через 3 сут после повреждающего высокотемпературного воздействия оценивали относительное количество выживших проростков.

После предобработки проростков растворами аминокислот и через определенное время после закаливающего высокотемпературного воздействия отбирали пробы растительного материала для анализа биохимических показателей.

Содержание пероксида водорода устанавливали, экстрагируя его из растертого на холоде растительного материала 5 %-й ТХУ. Пробы центрифугировали (8000 g, 10 мин) при температуре не выше 4 °С и в надосадочной жидкости определяли концентрацию  $H_2O_2$  с использованием соли Мора и тиоцианата аммония [20]. Содержание пролина определяли по методу Бейтса и соавт. [7].

Антиоксидантную активность исследуемых аминокислот определяли с использованием свободного стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ) [16]. В реакционные пробирки вносили по 0,25 мл спиртовых растворов аминокислот в соответствующих концентрациях, 1,75 мл 80 %-го этанола и 2 мл 200 мкМ ДФПГ. В контрольную пробу вместо растворов аминокислот вносили эквивалентный объем 80 %-го этанола. Пробирки встряхивали и оставляли в темноте на 30 мин, после чего определяли оптическую плотность растворов при длине волны 517 нм.

Эксперименты повторяли независимо 3–4 раза, биологическая повторность каждого опыта была трехкратной. На рисунках и в таблице приведены средние значения и их стандартные погрешности.

## Результаты и обсуждение

Экзогенный пролин концентрацией 1 мМ немного повышал базовую теплоустойчивость проростков пшеницы, но существенно угнетал развитие индуцированной теплоустойчивости, вызываемое закаливающим прогревом (рис. 1). При более низких концентрациях влияние пролина на закаливание было менее заметным, а высокие его концентрации (20 мМ) снижали не только индуцированную, но и базовую теплоустойчивость, что могло быть обусловлено неспецифическими токсическими эффектами экзогенной аминокислоты. В связи с этим в экспериментах использовали пролин концентрацией 1 мМ.

Чтобы определить, насколько специфичным был выявленный эффект пролина, его действие сравнивали с влиянием экзогенного валина. Обработка проростков этой аминокислотой не влияла на их базовую теплоустойчивость и не препятствовала развитию резистентности после закаливающего прогрева (см. рис. 1).

Закаливающий прогрев вызывал транзиторное повышение содержания пероксида водорода в корнях и побегах проростков, которое наблюдалось через 15 мин после теплового воздействия (рис. 2). Через 1 ч после закаливания содержание пероксида водорода в органах контрольных и закаленных проростков не отличалось. Обработка пролином вызывала небольшое снижение содержания пероксида водорода в корнях в конце эксперимента (24 ч наблюдений) и не влияла на его количество в побегах. При этом под действием пролина нивелировалось вызываемое закаливанием повышение содержания АФК в корнях и побегах.

Валин не оказывал существенного влияния на содержание пероксида водорода в органах закаленных и незакаленных проростков (см. рис. 2).

При обработке экзогенным пролином его содержание в корнях повышалось приблизительно в 2 раза (таблица). Закаливающий прогрев не вызывал достоверных изменений содержания пролина. В то же время в варианте с сочетанием обработки пролином и воздействием закаливания

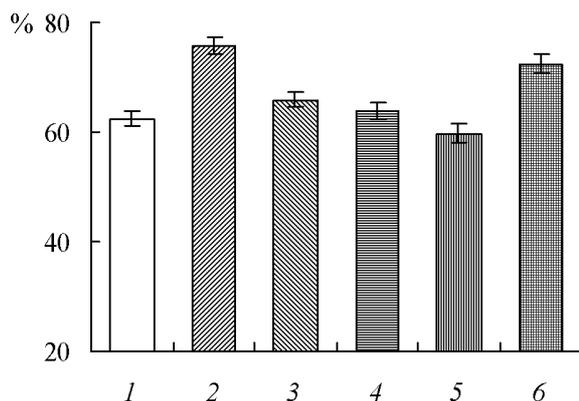


Рис. 1. Влияние 1 мМ растворов аминокислот на выживание (%) незакаленных и закаленных проростков пшеницы после 10 мин прогрева при температуре 46 °С. Здесь и на рис. 2:

1 — контроль; 2 — закаливание; 3 — пролин; 4 — закаливание + пролин; 5 — валин; 6 — закаливание + валин

содержание этой аминокислоты превышало показатели не только варианта с закаливанием, но и варианта с обработкой пролином без закаливающего воздействия. Такой эффект мог быть связан с повышением проницаемости мембран для экзогенного пролина после действия гипертермии. В варианте с сочетанием закаливания и обработки валином содержание пролина в корнях проростков было несущественно выше, чем в варианте с закаливанием.

В целом обработка растений экзогенными

аминокислотами вызывала умеренные изменения содержания пролина в тканях корней, что дает основание говорить об адекватности такого экспериментального приема его регуляции. При этом умеренные изменения содержания эндогенного пролина влияли на проявление физиологических эффектов теплового закаливания. Действие пролина нивелировало вызываемое закаливанием повышение содержания пероксида водорода в органах проростков и развитие их теплоустойчивости. Можно полагать, что пролин, снижая содержание АФК, препятствует формированию сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы. Ранее на этой же модели мы показали снятие эффекта закаливания действием антиоксидантов ионола [12] или диметилтиомочевины [1]. Таким образом, влияние пролина было сходным с эффектами антиоксидантов.

Механизмы снижения содержания пероксида водорода и возможно других АФК в клетках растений под влиянием пролина объяснить довольно сложно. Его структурные особенности дают основание рассматривать возможность прямой инактивации радикальных форм кислорода.

Содержание пролина (мкмоль/г сырого вещества) в корнях проростков пшеницы

Вариант опыта	До закаливания или через 24 ч инкубации проростков на растворах аминокислот	Через 24 ч после закаливания или через 48 ч инкубации проростков на растворах аминокислот
Контроль	1,36±0,04	1,21±0,06
Закаливание	—	1,35±0,03
Пролин (1 мМ)	2,63±0,06	2,57±0,05
Закаливание + пролин (1 мМ)	—	3,19±0,07
Валин (1 мМ)	1,36±0,05	1,36±0,04
Закаливание + валин (1 мМ)	—	1,57±0,07

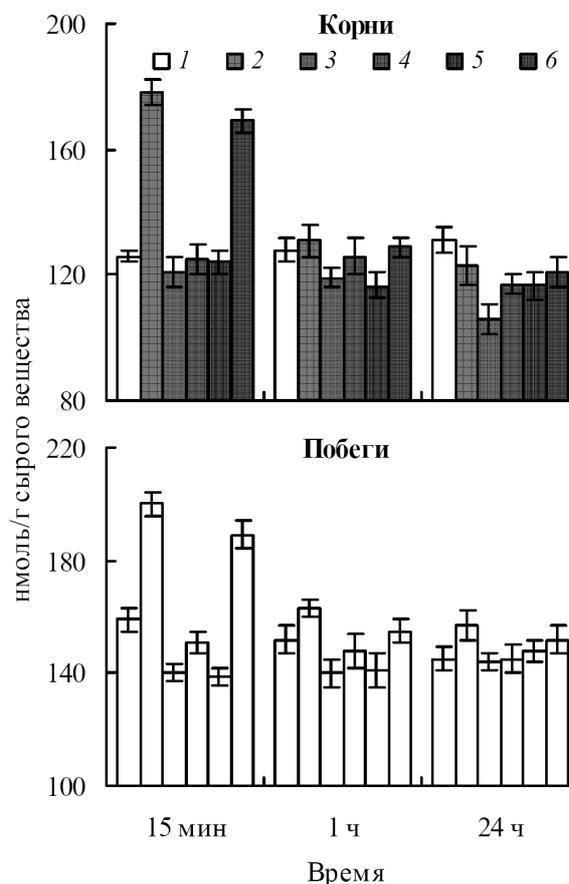


Рис. 2. Содержание пероксида водорода (нмоль/г сырого вещества) в органах проростков пшеницы после одномоментного закаливания при температуре 42 °С

Так, пролин может образовывать устойчивый радикал, поскольку содержит третичный углеродный атом. Такой радикал приводит к «тушению» или обрыву каскада свободнорадикальных реакций, запускаемых супероксид-, пероксид- или гидроксил-радикалом [3].

В системе *in vitro* мы сравнили антиоксидантную активность пролина и валина по реакции с ДФПГ. Было выявлено, что пролин в отличие от валина обладает антиоксидантной активностью (рис. 3). Подобные результаты по прямому антиоксидантному действию пролина приведены в работе [17]. Естественно, что в искусственной системе антиоксидантные эффекты пролина могут отличаться от его действия *in vivo*. Известно, что пролин локализован в растительных клетках преимущественно в цитозоле, но может активно транспортироваться в митохондрии [23]. Однако исследования по оценке точной концентрации пролина в отдельных компартментах растительных клеток не проводились. Тем не менее концентрации, при которых зарегистрированы антиоксидантные эффекты пролина, сопоставимы с его содержанием в растительном материале (см. таблицу), что дает основание говорить о вероятности прямого антиоксидантного действия этой аминокислоты.

Таким образом, пролин обладает способностью изменять про-/антиоксидантное равновесие в растительных клетках. Это проявлялось в снижении содержания пероксида водорода в корнях и побегах проростков сразу после закалывающего прогрева (см. рис. 2). В других работах сообщалось о снижении содержания продукта пероксидного окисления липидов малонового диальдегида в растительных тканях в стрессовых условиях под влиянием пролина [6, 21].

Обсуждая полученные результаты, отметим, что имеются сведения и о противоположном — прооксидантном — действии пролина на клетки живых организмов [4, 14]. Такой эффект пролина может быть связан с его окислением пролиндегидрогеназой и прямым включением электрона и протона от пролина в дыхательную цепь митохондрий [15]. В то же время в наших экспериментах, по-видимому, не было условий для развития подобных процессов. Содержание эндогенного пролина повышалось не столь значительно, чтобы вызвать окислительный стресс (см.

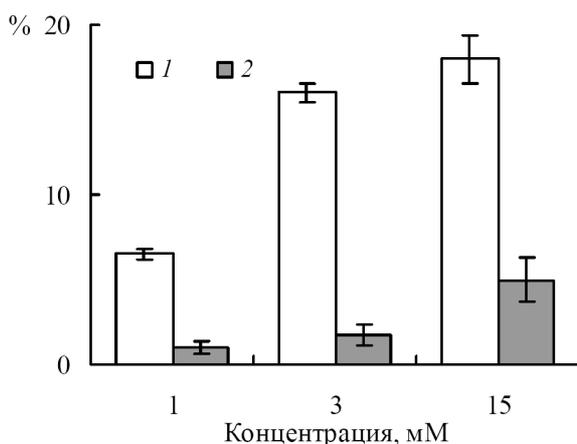


Рис. 3. Антиоксидантная активность аминокислот пролина (1) и валина (2) (по реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом, %)

таблицу). Наоборот, пролин проявлял антиоксидантный эффект и, снижая содержание АФК, вероятно препятствовал АФК-индуцированному развитию теплоустойчивости проростков после теплового закалывания.

Недавно были получены сведения о способности пролина модифицировать дифференциальную экспрессию генов супероксиддисмутазы (СОД) у шалфея [2]. Имеются и разрозненные данные как о повышении, так и снижении активности неко-

торых антиоксидантных энзимов у растений под влиянием пролина [9, 13, 18]. Для выяснения вопроса о возможности подобных эффектов пролина в рамках использованной нами экспериментальной модели необходимы специальные эксперименты. В целом же проведенные исследования указывают на возможность вовлечения пролина в сложную модификацию АФК-зависимых процессов. При этом в зависимости от условий эксперимента результат такой модификации может быть различным и проявляться как в повышении резистентности растений к стресс-факторам [3], так и в снижении индуцированной устойчивости, зарегистрированной в настоящей работе.

1. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы // Физиология растений. — 2013. — **60**, № 2. — С. 221—229.
2. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Макарова С.С., Кузнецов В.В. Экзогенный пролин модифицирует дифференциальную экспрессию генов супероксиддисмутазы в растениях шалфея при UV-B облучении // Там же. — 2011. — **58**, № 1. — С. 49—57.
3. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // Там же. — 2008. — **55**, № 5. — С. 721—730.
4. Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salziginea* при окислительном стрессе // Там же. — 2013. — **60**, № 1. — С. 47—60.
5. Тищенко Е.Н. Генетическая инженерия с использованием генов метаболизма L-пролина для повышения осмотолерантности растений // Физиология растений и генетика. — 2013. — **45**, № 6. — С. 488—500.
6. Alia, Saradhi P.P., Mohanty P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage // J. Photochem. Photobiol. — 1997. — **38**. — P. 253—257.
7. Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. — 1973. — **39**. — P. 205—210.
8. Cecchini N.M., Monteoliva M.I., Alvares M.E. Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms // Plant Signal. Behav. — 2011. — **6**, N 8. — P. 1195—1197.
9. Chen C., Dickman M.B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — **102**. — P. 3459—3464.
10. Islam M.M., Hoque M.A., Okuma E. et al. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells // J. Plant Physiol. — 2009. — **166**. — P. 1587—1597.
11. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Wahid A.A.A. et al. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // J. Exp. Bot. — 2003. — **54**. — P. 2553—2562.
12. Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu. V., Kosakivska I.V. The importance of reactive oxygen species in the induction of plant resistance to heat stress // Gen. Appl. Plant Physiol. — 2008. — **34**, N 3—4. — P. 251—266.
13. Lutts S., Guerrier G. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity tolerance as affected by proline and NaCl // Biol. Plant. — 1995. — **37**, Is. 4. — P. 577—586.
14. Lv W.-T., Lin B., Zhang M., Hua X.-J. Proline accumulation is inhibitory to *Arabidopsis* seedlings during heat stress // Plant Physiol. — 2011. — **156**. — P. 1921—1933.
15. Miller G., Honig A., Stein H. et al. Unraveling  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes // J. Biol. Chem. — 2010. — **284**. — P. 26482—26492.
16. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity songklanakarin // J. Sci. Technol. — 2004. — **26**. — P. 211—219.
17. Okuma E., Murakami Y., Shimoishi Y. et al. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions // Soil Sci. Plant Nutr. — 2004. — **50**. — P. 1301—1305.
18. Ozturk L., Demir Y. In vivo and in vitro protective role of proline // Plant Grow. Regul. — 2002. — **38**. — P. 259—264.
19. Petrov V.D., Breusegem F.V. Hydrogen peroxide — a central hub for information flow in plant cells // AoB Plants. — 2012: pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014.

20. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* — 1976. — **57**. — P. 308—309.
21. *Sairam R.K., Srivastava G.C.* Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes // *Biol. Plant.* — 2000. — **43**. — P. 381—386.
22. *Saradhi P.P., Alia, Arora S., Prasad K.V.S.K.* Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 1995. — **209**. — P. 1—5.
23. *Szabados L., Savoure A.* Proline: a multifunctional amino acid // *Trends Plant Sci.* — 2009. — **15**, N 2. — P. 89—97.

Получено 10.01.2014

#### ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО ПРОЛІНУ НА ВМІСТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ І ФОРМУВАННЯ ІНДУКОВАНОЇ ТЕПЛОСТІЙКОСТІ

*А.О. Вайнер, Ю.Є. Колупаєв, О.І. Обозний*

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Досліджували вплив екзогенного проліну на теплостійкість проростків пшениці і динаміку вмісту в них пероксиду водню. Обробка проростків 1 мМ розчином проліну пригнічувала розвиток індукованої теплостійкості, спричинюваний однохвилинною дією загартувальної температури (42 °C), але не впливала на базову теплостійкість. При цьому пролін усував транзиторне підвищення вмісту пероксиду водню в коренях і пагонах проростків, спричинюване загартуванням. Екзогенний валін, що використовувався для оцінювання специфічності дії проліну, не впливав на вміст пероксиду водню в проростках і формування їх теплостійкості після загартування. Зроблено висновок, що зниження ефекту теплового загартування проростків пшениці за обробки проліном пов'язане з його впливом на вміст активних форм кисню, задіяних у формуванні сигналу, що індукує розвиток теплостійкості.

#### THE INFLUENCE OF EXOGENOUS PROLINE ON THE CONTENT OF HYDROGEN PEROXIDE AND THE FORMATION OF INDUCED THERMORESISTANCE IN WHEAT SEEDLINGS

*A.O. Vayner, Yu.E. Kolupaev, O.I. Oboznyi*

V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University  
p/o «Communist-1», Kharkiv, 62483, Ukraine

The influence of exogenous proline on the thermoresistance of wheat seedlings and the dynamics of their hydrogen peroxide content were investigated. The treatment of seedlings with 1 mM solution of proline inhibited the development of induced thermoresistance caused by 1-min action of hardening temperature (42 °C) but didn't influence the basic heat resistance. At the same time proline eliminated the transient increasing of hydrogen peroxide content in shoots and roots of seedlings. Exogenous valine that was used for the estimation of the specificity of proline action didn't influence hydrogen peroxide content and the formation of thermoresistance after hardening in seedlings. It was concluded that the decrease in the effect of heat hardening of wheat seedlings after the treatment with proline is related to its influence on the content of reactive oxygen species that participate in the formation of the signal that induced the heat resistance development.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., proline, hydrogen peroxide, heat hardening.