



Ю.Є. КОЛУПАЄВ

Харківський національний аграрний університет
ім. В.В. Докучаєва
п/в Докучаєве, Харків, 62483, Україна
plant_biology@agrouniver.kharkov.com

**МОЖЛИВА РОЛЬ
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ
У САЛЦИЛАТІНДУКОВАНОМУ
НАГРОМАДЖЕННІ ПЕРОКСИДІВ
У КОЛЕОПТИЛЯХ *TRITICUM AESTIVUM* L.**

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *колеоптилі*, *саліцилова кислота*, *супероксиддисмутаза*, *каталаза*, *пероксиди*, *теплостійкість*

Останніми роками вивченню ролі саліцилової кислоти (СК) у реакції рослин на біотичні та абіотичні стресори приділяється значна увага [5, 14]. Ефекти підвищення стійкості рослин, спричинені СК, пов'язують передусім з її здатністю індукувати нагромадження в рослинах активних форм кисню (АФК). Одержано відомості щодо сигнальних функцій АФК у рослинному організмі [15, 18]. Є думка, що особливу сигнальну роль відіграє пероксид водню як стабільна АФК, здатна дифундувати у внутрішньоклітинному середовищі [9]. СК може ініціювати нагромадження H_2O_2 у рослинних клітинах [12]. H_2O_2 є інтермедіатом у пов'язаному з СК сигнальному каскаді для індукції експресії генів, що забезпечують стійкість до патогенів [5] та, ймовірно, до деяких абіотичних стресорів [17].

Однією з основних причин збільшення вмісту H_2O_2 у клітинах під впливом СК вважають інгібування каталази [12]. Цей фермент розглядається як рецептор СК

і основний посередник її впливу на стійкість рослин до патогенів [13] та абіотичних стресорів, в т.ч. температурних [17].

Водночас далеко не всі нині відомі результати впливу СК на стійкість рослин дають змогу розглядати каталазу як основну мішень дії СК. Наприклад, показано, що для інгібування каталази потрібні досить високі, часто вищі за фізіологічні концентрації СК [19]. Припускають наявність інших механізмів нагромадження АФК під впливом СК. Так, помітну роль у продукуванні супероксидного радикалу і пероксиду водню відіграє гваяколпероксидаза, синтез якої може посилюватися під впливом СК [2]. Іншим ключовим ферментом окиснювального спалаху, індукованого СК, може бути НАДФН-оксидаза [11, 16]. Нарешті, ще один шлях посилення генерації пероксиду водню може бути пов'язаний з активацією супероксиддисмутази (СОД) [19]. Проте відомостей про вплив СК на активність СОД значно менше порівняно з іншими ферментами, що беруть участь в утворенні та елімінації АФК. На прикладі відокремлених листків *Arabidopsis thaliana* показано підвищення активності СОД під дією високих (мілімолярних) концентрацій СК. Цей ефект супроводжувався окиснювальним пошкодженням тканин [19]. Інші результати одержано у дослідях із сіянцями *Fraxinus mandshurica* [22]: обробка екзогенною СК знижувала в них активність СОД.

У зв'язку з викладеним вище ми поставили за мету дослідити на рослинній моделі, чутливій до дії саліцилату (колеоптилі *Triticum aestivum* L.), вплив СК у концентраціях, близьких до фізіологічних, на нагромадження пероксидів й активність ферментів, причетних до утворення та елімінації H_2O_2 — СОД і каталази. Крім того, зважаючи на здатність СК спричинювати помітне підвищення теплостійкості відрізків колеоптилів [2] та інтактних проростків *T. aestivum* [3], було цікаво дослідити зміни активності цих ферментів і вмісту пероксидів після дії на колеоптилі ушкоджувального нагрівання.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження були відрізки 4-добових колеоптилів озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48. Умови пророщування насіння та підготовки рослинного матеріалу ми описали раніше [2]. Колеоптилі інкубували протягом 2 год у 10 мкМ розчині СК, який готували на 2 %-й сахарозі, контроль — інкубація на 2 %-й сахарозі. Після цього частину колеоптилів піддавали ушкоджувальному нагріванню у водяному ультратермостаті (43 °С протягом 10 хв) й інкубували на 2 %-й сахарозі до закінчення експерименту. Після обробки СК, а також через 1 і 24 год по нагріванні проводили відповідні біохімічні аналізи. У ті ж самі часові інтервали аналізували й зразки, що не нагрівали.

Вміст білка в колеоптилях визначали за Бредфордом [10], кількість пероксидів — феротіоціанатним методом, екстрагуючи їх з рослинного матеріалу 5 %-м розчином трихлороцтової кислоти [20]. Концентрацію пероксидів обчислювали за калібрувальним графіком, побудованим на основі H_2O_2 .

Для визначення активності СОД (КФ 1.15.1.1) тканини колеоптилів гомогенізували в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,8) з додаванням детергенту тритону Х-100 (кінцева концентрація — 0,2 %). Аналізували супернатант після центрифугування гомогенату (7000 г, 15 хв). Загальну активність СОД вимірювали, використовуючи метод, заснований на здатності ферменту конкурувати за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату [6].

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за методом, описаним Королюком зі співавт. [4]. Для екстракції використовували 0,1 М трис-НСІ буфер (рН 7,4). Біологічна повторність дослідів трикратна. На рисунках наведені середні результати і їхні стандартні відхилення.

Результати досліджень та їх обговорення

Вміст білка в контрольних колеоптилях (без нагрівання) упродовж експерименту залишався стабільним (рис. 1), що свідчить про відсутність інтенсивного старіння ізольованих тканин та/або посилення деградаційних процесів, котрі передують апоптозу тканин колеоптилів [7]. Обробка СК сама по собі істотно не впливала на вміст у них білка. Нагрівання дещо зменшувало концентрацію білка в контрольних колеоптилях: достовірним ефект був через 24 год після нагрівання. Водночас у колеоптилях, оброблених СК перед нагріванням, вміст білка знижувався несуттєво (рис. 1), що узгоджується з показаним нами ефектом підвищення теплостійкості колеоптилів під впливом СК [2].

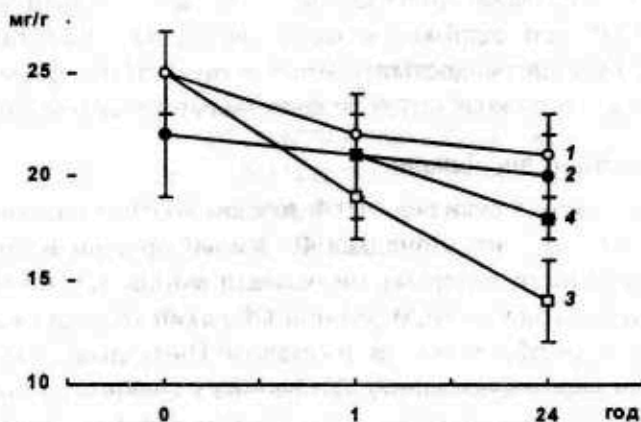


Рис. 1. Вміст білка (мг/г маси сухої речовини) у колеоптилях без стресу (1, 2) та після ушкоджувального нагрівання (3, 4). Тут і на рисунках 2–4: 1, 3 — контроль (2 %-на сахароза); 2, 4 — 2 %-на сахароза + 10 мкМ СК. Нульовою точкою позначений момент припинення обробки колеоптилів СК, впливу на них ушкоджувального нагрівання та перенесення на розчин сахарози без добавок

Fig. 1. A content of protein (mg/g of dry mass) in coleoptiles without stress (1, 2) and after damaging heating (3, 4): Here and on the fig. 2–4: 1, 3 — the control (2 % sucrose); 2, 4 — 2 % sucrose + 10 μmol SA. The zero point designates the moment of the terminal of coleoptiles treatment with SA, influences on them of damaging heating and transferring on sucrose solution without additives

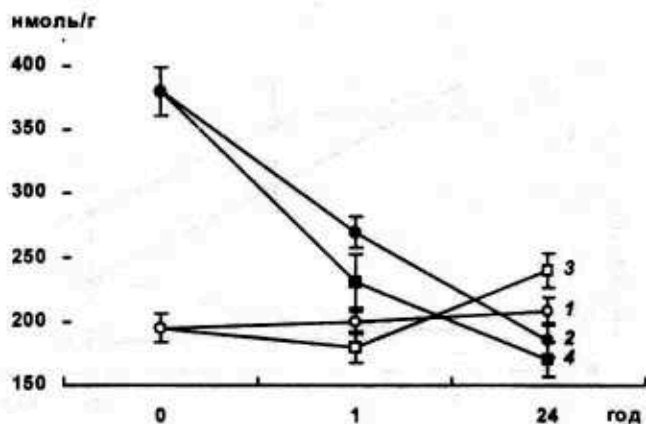


Рис. 2. Вміст пероксидів (нмоль/г сух. речовини) у колеоптилях пшениці без стресу (1, 2) та після ушкоджувального нагрівання (3, 4)

Fig. 2. A content of peroxide compounds (nmol/g of dry mass) in wheat coleoptiles without stress (1, 2) and after damaging heating (3, 4)

Концентрація пероксидів у колеоптилях, що не зазнавали нагрівання і дії СК, протягом доби експерименту практично не змінювалася (рис. 2). Обробка колеоптилів СК спричинювала двократне підвищення в них вмісту пероксидів. Внаслідок перенесення колеоптилів на розчин сахарози без додавання СК концентрація пероксидів зменшувалася до рівня контролю. Через 24 год після нагрівання відбувалося її підвищення в контрольних колеоптилях. У колеоптилях, оброблених СК, кількість пероксидів після нагрівання зменшувалася і через 24 год була суттєво нижчою від контролю (рис. 2).

Спричинюване СК підвищення вмісту пероксидів супроводжувалося одночасним істотним зростанням активності СОД (рис. 3). Після перенесення колеоптилів на розчин сахарози без додавання СК активність ферменту знижувалася, але при цьому все ж перевищувала відповідні величини контрольного варіанта. Внаслідок нагрівання активність СОД у контрольних колеоптилях зростала, що було особливо помітним через 24 год при розрахунку активності на мг білка. Значною мірою це пов'язане зі зменшенням вмісту білка у зразках даного варіанта (рисунки 1 і 3). У колеоптилях, оброблених СК, активність СОД після нагрівання дещо знижувалася, але цей ефект був недостовірним. У результаті розрахунку на білок через 24 год після нагрівання активність ферменту в контролі і варіанті з СК не відрізнялася, але з розрахунку на грам сухої маси була вищою у колеоптилях, оброблених СК, порівняно з відповідним контролем (рис. 3).

На тлі підвищення активності СОД під впливом СК у колеоптилях зменшувалася активність каталази (рис. 4). Одразу після обробки зразків СК цей ефект був незначним, особливо в розрахунку на мг білка. У разі перенесення колеоптилів, які не нагрівали, на розчин сахарози без додавання СК активність ферменту впродовж 24 год поступово підвищувалася до рівня кон-

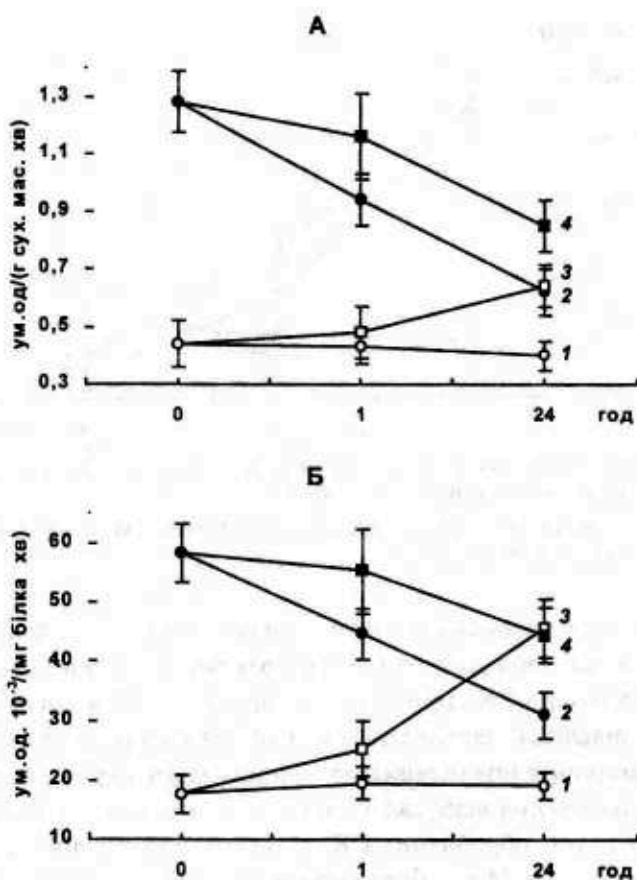


Рис. 3. Активність СОД у колеоптилях пшениці без стресу (1, 2) та після ушкоджувального нагрівання (3, 4): А — активність в ум. од./г сух. речовини · хв), Б — активність в ум. од. · 10⁻³/(мг білка · хв)

Fig. 3. Activity of SOD in wheat coleoptiles without stress (1, 2) and after damaging heating (3, 4): A — activity in rel. units/(g of dry mass · min), Б — activity in rel. units · 10⁻³/(mg of protein · min)

тролю (рис. 4). Через 1 год після нагрівання активність каталази в контролі істотно не змінювалася у розрахунку на грам сухої речовини і зростала у розрахунку на мг білка, що пов'язане зі зменшенням його вмісту. У варіанті з СК активність каталази за 1 год після дії високої температури дещо зменшувалася, тому різниця між варіантами ставала помітнішою і була достовірною як у розрахунку активності на суху речовину, так і на мг білка (рис. 4). Інша картина спостерігалася через 24 год після нагрівання: у розрахунку на грам сухої маси в контролі активність каталази знижувалася, а у відрізках, оброблених СК, — зростала. При цьому абсолютні значення активності ферменту у варіанті з СК достовірно перевищували відповідні величини контролю. У розрахунку на білок через 24 год після нагрівання спостерігалася певне підвищення активності каталази як у разі обробки колеоптилів

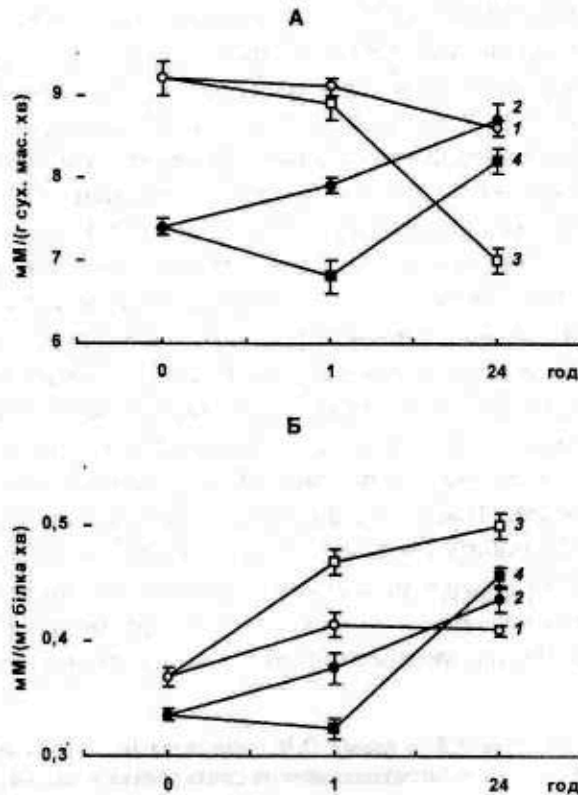


Рис. 4. Активність каталази у колеоптилях пшениці без стресу (1, 2) та після ушкоджувального нагрівання (3, 4): А — активність у мМ Н₂О₂/(г сух. речовини · хв), Б — активність у мМ Н₂О₂/(мг білка · хв)

Fig. 4. Activity of catalase in wheat coleoptiles without stress (1, 2) and after damaging heating (3, 4): А — activity in mmol of H₂O₂/(g of dry mass · min), Б — activity in mmol of H₂O₂/(mg of protein · min)

СК, так і у контрольному варіанті. Такі відмінності при вираженні активності в розрахунку на грам маси та на мг білка пов'язані з помітно вищим вмістом білка у колеоптилях, оброблених СК.

Висновки

Таким чином, обробка колеоптилів СК спричинювала окиснювальний стрес, внаслідок якого істотно підвищувався вміст пероксидів (див. рис. 2). Цей ефект спостерігався на тлі кількарязового підвищення активності СОД (рис. 3). Активність каталази під впливом СК знижувалася, проте лише на 20–30 %. У першу годину після нагрівання зменшувався вміст пероксидів у колеоптилях, оброблених СК (рис. 2). Цікаво, що цей ефект виявлявся на тлі зниженої активності каталази (рис. 4). Не виключено, що в даному разі пероксиди могли елімінуватися під впливом різних пероксидаз — гваякол-, аскорбат-, глутатіонпероксидази [2, 3, 8], активність яких може зростати як за обробки рослинних тканин СК, так і за дії різноманітних стресорів. Різниця

в активності СОД у контрольних і оброблених СК колеоптилях після нагрівання поступово нівелювалася. Через 24 год по нагріванні у зразках, оброблених СК, вміст пероксидів зменшувався (рис. 2), при цьому активність каталази зростала (рис. 4). У контролі, навпаки, кількість пероксидів збільшувалася, а активність каталази знижувалася. Цей ефект, ймовірно, є свідченням початку розвитку теплових ушкоджень контрольних колеоптилів, теплостійкість яких нижча порівняно з обробленими СК [2].

Отже, можна припускати, що спричинюваний екзогенною СК окиснювальний стрес пов'язаний не лише з інгібуванням каталази (цей шлях більшість авторів вважає основним [12, 13]), а й з підвищенням активності СОД, що призводить до нагромадження H_2O_2 — стабільної АФК. Звичайно, при цьому потрібно враховувати і роль різних пероксидаз у балансі пероксидів. Нагромадження пероксидів, насамперед H_2O_2 , напевне, є важливим для реалізації впливу екзогенної СК на стійкість рослин, зокрема їх терморезистентність. Ймовірно, що саме помірний окиснювальний стрес, спричинений СК, робить рослинні клітини «компетентними» до наступного ушкоджувального нагрівання, активуючи різноманітні захисні механізми, у т.ч. підвищення активності антиоксидантних ферментів [8], синтез білків теплового шоку [1], нагромадження низькомолекулярних протекторів [21].

1. Бурханова Э.А., Федина А.Б., Кулаева О.Н. Сравнительное изучение влияния салициловой кислоты и (2',5')-олигоаденилатов на синтез белка в листьях табака при тепловом стрессе // Физиол. раст. — 1999. — 46, № 1. — С. 16—22.
2. Колупаев Ю.С., Карпець Ю.В., Акініна Г.Е. Вплив саліцилової кислоти на активність каталази і гваяколпероксидази колеоптилів пшениці за умов теплового стресу // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2006. — 38, № 4. — С. 317—323.
3. Колупаев Ю.С., Карпець Ю.В. Индуцирование салициловой кислотой тепло- и солестойкости проростков *Triticum aestivum* L. у зв'язку зі змінами прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // Укр. ботан. журн. — 2006. — 63, № 4. — С. 558—565.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16—19.
5. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
6. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. — 1985. — № 11. — С. 678—681.
7. Шоринг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы // Биохимия. — 2000. — 65, № 12. — С. 1612—1618.
8. Ananieva E. A., Popova L. P. Regulatory role of salicylic acid in paraquat-induced oxidative damage in barley plants // Докл. Българ. АН. — 2002. — 55, № 7. — Р. 65—68.
9. Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants // Current Sci. — 2005. — 89. — Р. 1113—1121.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72, N 1, 2. — Р. 248.
11. Bolwell G.P., Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of oxygen species in plant defence — a broad perspective // Physiol. Mol. Plant Pathol. — 1997. — 51. — Р. 347—366.

12. Chen Z., Silva H., Klessing D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // *Science*. — 1993. — 262, № 12. — P. 1883—1886.
13. Conrath U., Chen Z., Ricigliano J.R., Klessing D.F. Two inducers of plant defence responses 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — 92. — P. 7143—7147.
14. Dat J.F., Delgado H.L., Foger C.H., Scott I.M. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // *Plant Physiol.* — 1998. — 116. — P. 1351—1357.
15. Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2000. — 57. — P. 779—795.
16. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment // *Plant Sci.* — 2002. — 162, N 3. — P. 653—660.
17. Horvath E., Janda T., Szalai G., Paldi E. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance // *Plant Sci.* — 2002. — 163, N 6. — P. 1129—1135.
18. Neill S.T., Desikan R., Clarke A. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // *J. Exp. Bot.* — 2002. — 53. — P. 1237—1247.
19. Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P. et al. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes // *Plant Physiol.* — 1997. — 115. — P. 137—149.
20. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *populus gelrica* // *Plant Physiol.* — 1976. — 57. — P. 308—309.
21. Sakhbuidinova A.R., Fatkhutdinova D.R., Bezrukova M.V. Shakirova F.M. Salicylic acid presents the damaging action of stress factors on wheat plants // *Bulg. J. Plant Physiol. — Spec. Issue.* — 2003. — P. 314—319.
22. Wu C., Wang Z. Influence of exogenous salicylic acid on activity of antioxidative enzymes in leaves of seedlings *Fraxinus mandshurica* in freezing conditions // *Sci. Silv. Sin.* — 2002. — 38, № 5. — P. 84—89.

Рекомендує до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 08.12.2006

Ю.Е. Колупаев

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В САЛИЦИЛАТИНДУЦИРУЕМОМ НАКОПЛЕНИИ ПЕРОКСИДОВ В КОЛЕОПТИЛЯХ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Обработка отрезков coleoptилей пшеницы 10 мкМ раствором салициловой кислоты (СК) повышала их теплоустойчивость, существенно увеличивала активность супероксиддисмутазы (СОД) и незначительно снижала — каталазы. Сделан вывод о том, что индуцируемое СК накопление перекисей в тканях в значительной степени обусловлено повышением активности СОД. Предполагается, что индуцируемый СК окислительный стресс активирует защитные системы растительных клеток, что необходимо для адекватного ответа на последующий повреждающий нагрев.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, coleoptили, салициловая кислота, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксиды, теплоустойчивость

Yu. Ye. Kolupaev

V.V. Dokuchayev Kharkov National Agrarian University

PROBABLE ROLE OF A SUPEROXIDEDISMUTASE
OF WHEAT COLEOPTILES IN THE ACCUMULATION
OF PEROXIDE COMPOUNDS INDUCED BY EXOGENOUS SALICYLIC ACID

The treatment of wheat coleoptiles segments with 10 μ M solution of salicylic acid (SA) raised their heat resistance, caused essential increase of superoxidizedismutase (SOD) activity and insignificant decrease of catalase activity. The conclusion has been made, that accumulation of peroxides induced by SA in tissues substantially is caused by SOD activity rising. It is supposed, that the oxidative stress induced by SA causes an activation of protective systems of the plant cells, necessary for the adequate response to the subsequent damaging heating.

Key words: *Triticum aestivum*, *coleoptiles*, *salicylic acid*, *superoxide dismutase*, *catalase*, *peroxide*, *heat resistance*