



УДК 581.13:577.15

© 2009

Ю. Є. Колупаєв, Ю. В. Карпець,
член-кореспондент НАН України Л. І. Мусатенко

Кальцієзалежний вплив саліцилової кислоти і пероксиду водню на активність супероксиддисмутази колеоптилів пшениці

Досліджували вплив екзогенних саліцилової кислоти (СК — 10 мкМ) і пероксиду водню (10 мМ) на активність супероксиддисмутази (СОД) колеоптилів пшениці та їх теплостійкість. СК і пероксид водню істотно підвищували активність СОД. Такі ефекти повністю нівелювалися передобробкою колеоптилів інгібітором біосинтезу білка циклогексимідом і блокатором кальцієвих каналів верапамілом. Зроблено висновок про кальцієзалежне посилення синтезу СОД під впливом СК і пероксиду водню. Підвищення теплостійкості рослинних об'єктів після обробки цими сполуками може бути пов'язане з попередньою активацією ними антиоксидантних ферментів.

Однією з причин пошкодження рослин за дії несприятливих чинників різної природи вважається дисбаланс між утворенням активних форм кисню (АФК) та їх детоксикацією антиоксидантною системою. Водночас кероване посилення утворення АФК може бути активатором ряду захисних реакцій, важливих для виживання рослин за дії стресорів різної природи [1, 2]. Одна з відносно стабільних АФК — пероксид водню — розглядається нині як важлива сигнальна молекула рослинних клітин [3]. Іншим компонентом сигнальної мережі рослинних клітин є саліцилова кислота (СК), яку називають “стресовим фітогормоном” [4]. Існують дані про наявність як прямих, так і зворотних зв'язків між стресіндукованим нагромадженням у рослинах H_2O_2 і СК [5]. При цьому як СК, так і H_2O_2 здатні модифікувати активність про-/антиоксидантних ферментів.

Одним з ферментів, активність якого може змінюватися під впливом H_2O_2 і СК, є супероксиддисмутаза (СОД) [6]. Саме цей антиоксидантний фермент називають “первинною лінією захисту” від окиснювальних пошкоджень, адже він знешкоджує супероксидний аніон-радикал, який є джерелом утворення інших АФК, у тому числі гідроксильних та гідропероксидних радикалів, синглетного кисню, проти яких не існує специфічних ферментів-дезактиваторів.

Дані щодо впливу H_2O_2 на активність СОД суперечливі. Відомо, що одна з основних форм СОД рослин — Cu/Zn -СОД — *in vitro* інактивується H_2O_2 [7]. Водночас в експериментах *in vivo* із введенням екзогенного H_2O_2 в рослинні тканини встановлено підвищення в них активності СОД. Такі ефекти виявлено у ізольованих листків кукурудзи [8] та колеоптилів пшениці [2].

Неоднозначними є і відомості щодо дії СК на активність СОД. Показано зниження активності цього ферменту під впливом екзогенної СК у рослин *Fraxinus mandshurica* [9]. Проте в листках винограду та колеоптилях пшениці, оброблених СК, активність цього ферменту істотно підвищувалася [4, 10]. При цьому нез'ясованими залишаються характер і механізми зміни активності СОД у рослинах під впливом СК і H_2O_2 . Нещодавно показано, що в листках кукурудзи зростання активності ферменту, спричинюване екзогенним H_2O_2 , усувалося антагоністами кальцію [8]. З іншого боку, екзогенний кальцій інгібував активність СОД у рослин тютюну за обробки їх H_2O_2 , а під впливом блокатора кальцієвих каналів відзначалося відновлення активності цього ферменту [11]. Прямих свідчень залежності ефектів екзогенної СК на активність СОД від кальцієвого статусу рослинних клітин у доступній нам літературі знайти не вдалося. Водночас відомо, що не всі ефекти СК реалізуються з участю кальцію. Так, показано, що активація СК 48 кДа протеїнази в суспензійних клітинах тютюну у відповідь на осмотичний стрес відбувалася незалежно від кальцію як внутрішньоклітинного месенджера [12].

У зв'язку з викладеним нами було проведено порівняння дії екзогенних СК і H_2O_2 на активність СОД колеоптилів пшениці, а також досліджено вплив інгібітора біосинтезу білка циклогексиміду і блокатора кальцієвих каналів верапамілу на прояв ефектів СК і H_2O_2 . Зважаючи на здатність цих сполук підвищувати стійкість рослин до різноманітних абіотичних стресів, зокрема теплового [2, 13], ми також оцінювали їх вплив на теплостійкість відрізків колеоптилів та активність СОД після дії гіпертермії.

Об'єктом дослідження були відрізки колеоптилів, відокремлені від 4-добових етіюльованих проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48. Умови підготовки рослинного матеріалу описані раніше [2, 13]. Ізольовані колеоптилі витримували 14–18 год у 2% розчині сахарози. Після цього протягом 2 год проводили обробку зразків СК і H_2O_2 , додаючи ці речовини до основного середовища інкубації колеоптилів (2% розчину сахарози). У варіантах з комбінованою дією інгібітора біосинтезу білка і СК (або H_2O_2) циклогексимід додавали в середовище інкубації колеоптилів за 4 год до внесення у ці розчини СК або H_2O_2 . Антагоніст кальцію верапаміл у відповідних серіях дослідів вводили в середовище інкубації колеоптилів за 2 год до внесення СК або H_2O_2 . Концентрації досліджуваних речовин і час обробки ними колеоптилів були встановлені в попередніх дослідях. Після завершення інкубації колеоптилів у відповідних розчинах частину зразків піддавали ушкодjuвальному нагріванню протягом 10 хв при 43 °С у водному ультратермостаті [13]. Надалі протягом двох діб (до моменту оцінки виживаності) колеоптилі всіх варіантів інкубували у 2% розчині сахарози.

Активність СОД визначали як описано раніше [2].

На графіках наведені середні значення чотирьох незалежних експериментів та їх стандартні відхилення.

Обробка колеоптилів СК і H_2O_2 викликала істотне (приблизно на 80%) підвищення активності СОД (рис. 1). Інгібітор біосинтезу білка циклогексимід сам по собі істотно не змінював активність ферменту, але повністю усував її підвищення, спричинюване дією як СК, так і H_2O_2 . Це свідчить про підвищення активності СОД шляхом посилення синте-

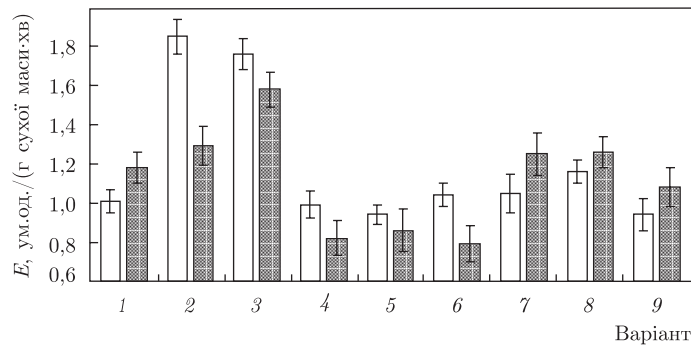


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази (E) у колеоптилях пшениці.

Світлі стовпчики — до нагрівання, темні — через 1 год після нагрівання ($43\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 хв)

Тут і на рис. 2: 1 — контроль; 2 — СК (10 мкМ); 3 — H_2O_2 (10 мМ); 4 — циклогексимід (4 мкМ); 5 — СК (10 мкМ) + циклогексимід (4 мкМ); 6 — H_2O_2 (10 мМ) + циклогексимід (4 мкМ); 7 — верапаміл (250 мкМ); 8 — СК (10 мкМ) + верапаміл (250 мкМ); 9 — H_2O_2 (10 мМ) + верапаміл (250 мкМ)

зу ферменту, а не модифікації існуючих його молекул. Дані щодо зростання активності СОД під впливом H_2O_2 певною мірою суперечать уявленням про інгібування основної форми цього ферменту високими концентраціями H_2O_2 [7]. Відсутність такого ефекту в наших експериментах може бути пов'язана з тим, що після двогодинної обробки колеоптилів 10 мМ екзогенним H_2O_2 його вміст у тканинах колеоптилів залишався в межах фізіологічних концентрацій [2].

Якщо СК і H_2O_2 як сигнальні молекули впливають на синтез СОД, то можна припустити, що передача їх сигналу в геном відбувається за участю кальцію як універсального внутрішньоклітинного месенджера. Наші експериментальні дані підтвердили це припущення. Підвищення активності СОД, спричинюване СК і H_2O_2 , практично повністю усувалося блокатором потенціалзалежних кальцієвих каналів верапамілом (див. рис. 1). При цьому сам по собі антагоніст кальцію в концентраціях, що використовувалися, не виявляв помітного впливу на активність ферменту.

Після ушкоджувального нагрівання активність СОД у колеоптилях контрольного варіанта (без обробки ефекторами) виявляла тенденцію до незначного підвищення. У варіанті з СК після дії гіпертермії відзначалося деяке зниження активності ферменту. В усіх інших варіантах зміни активності СОД під впливом високої температури були недостовірними (див. рис. 1).

Передобробка колеоптилів H_2O_2 і особливо СК підвищувала їх теплостійкість, яку оцінювали за виживаністю зразків після потенційно летального нагрівання (рис. 2). Циклогексимід незначною мірою, а верапаміл достовірно знижували теплостійкість колеоптилів. При цьому обидві сполуки не впливали на життєздатність колеоптилів, які не піддавалися ушкоджувальному нагріванню (результати не наводяться), а отже, не виявляли видимих токсичних ефектів. Інгібітор біосинтезу білка і блокатор кальцієвих каналів знімали ефекти підвищення теплостійкості колеоптилів, спричинювані СК і H_2O_2 . Більше того, у варіантах з поєднанням дії СК або H_2O_2 з обробкою циклогексимідом чи верапамілом відзначалося зниження виживаності колеоптилів порівняно з варіантами, в яких колеоптилі оброблялися лише циклогексимідом або верапамілом (див. рис. 2). Такі ефекти, напевно, можна пояснити тим, що як екзогенний H_2O_2 , так і СК спричиняють в рослинних тканинах окиснювальний стрес (H_2O_2 як АФК безпосередньо, а СК через зниження активності каталази [13]). Оче-

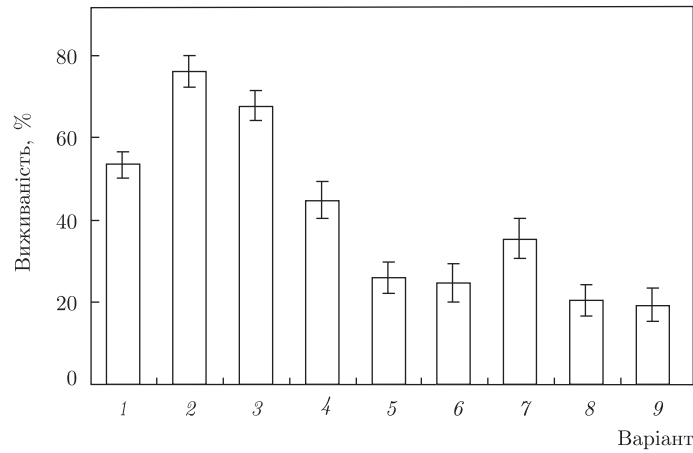


Рис. 2. Вживаність колеоптилів пшениці після ушкоджувального нагрівання (43 °С, 10 хв)

видно, за умови блокування біосинтезу білка чи кальціезалежної передачі сигналу в геном адекватної реакції-відповіді на окиснювальний стрес (підвищення активності антиоксидантних ферментів та синтезу низькомолекулярних антиоксидантів) не відбувається, через що має місце порушення про-/антиоксидантного балансу і зниження теплостійкості рослинних об'єктів.

Таким чином, нами виявлено підвищення активності СОД в колеоптилях пшениці під впливом екзогенних СК і H_2O_2 . Вперше на одній експериментальній моделі показано, що такий ефект обох сполук, напевно, пов'язаний з кальціезалежним посиленням синтезу ферменту. Адже зміни активності СОД, спричинювані СК і H_2O_2 , усувалися як інгібітором біосинтезу білка, так і антагоністом кальцію. Цей феномен узгоджується з даними про здатність екзогенного H_2O_2 викликати тимчасове підвищення концентрації цитозольного кальцію в рослинних клітинах [14]. Дія СК також, імовірно, пов'язана зі змінами кальцієвого статусу клітин. СК може спричинювати первинний ефект зростання вмісту H_2O_2 в рослинних клітинах за рахунок інгібування каталази та підвищення активності іонно-зв'язаної пероксидази, яка розглядається як продуцент супероксидного радикала [13], далі зміна вмісту АФК, можливо, обумовлює відкриття кальцієвих каналів і активації кальціезалежних сигнальних шляхів [15].

Модифікації активності СОД та інших антиоксидантних ферментів [2, 13] під впливом екзогенних СК і H_2O_2 зумовлюють зростання теплостійкості рослинних об'єктів. При цьому СК і H_2O_2 , очевидно, діють як агенти окиснювального стресу, попередньо "готуючи" антиоксидантну систему рослинних клітин до адекватної відповіді на дію потенційно летального стресора.

1. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* – 2006. – **126**. – P. 45–51.
2. Колутаєв Ю. Є., Карпець Ю. В. Активність супероксиддисмутази і каталази у колеоптилях пшениці за дії пероксиду водню і нагрівання // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2007. – **39**, № 4. – С. 319–325.
3. Slesak I., Libik M., Karpinska B. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses // *Acta biochim. pol.* – 2007. – **54**, No 1. – P. 39–50.
4. Wang L.-J., Li S.-H. Thermotolerance and related antioxidant enzyme activities induced by heat acclimation and salicylic acid in grape (*Vitis vinifera* L.) leaves // *Plant Growth Regul.* – 2006. – **48**. – P. 137–144.
5. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. – Москва: Наука, 2002. – 294 с.

6. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. – 2006. – **48**, № 6. – С. 465–474.
7. Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress plants // J. Exp. Bot. – 2002. – **53**, No 372. – P. 1331–1341.
8. Hu X., Jiang M., Zhang J. et al. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O production in leaves of maize (*Zea mays*) plants // New Phytologist. – 2007. – **173**. – P. 27–38.
9. 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**, No 5. – P. 84–89.
10. Колупаєв Ю. Є. Можлива роль супероксиддисмутази у саліцилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. – 2007. – **64**, № 2. – С. 270–278.
11. Price A., Taylor A., Ripley A. et al. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium // Plant Cell. – 1994. – **6**. – P. 1301–1310.
12. Hoyos M., Zhang S. Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress // Plant Physiol. – 2000. – **122**. – P. 1355–1363.
13. Колупаєв Ю. Є., Акініна Г. Є. Вплив саліцилової кислоти на теплостійкість колеоптилів пшениці у зв'язку зі змінами окиснювального метаболізму // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – **37**, № 6. – С. 524–529.
14. Demidchik V., Shabala S. N., Davies J. M. Spatial variation in H₂O response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels // Plant J. – 2007. – **49**. – P. 377–386.
15. Kawano T., Muto S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // J. Exp. Bot. – 2000. – **51**, No 345. – P. 685–693.

Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 12.02.2009

Yu. Ye. Kolupaev, Yu. V. Karpets,

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **L. I. Musatenko**

Calcium-dependent influence of salicylic acid and hydrogen peroxide on the superoxide dismutase activity of wheat coleoptiles

The influence of exogenous salicylic acid (SA – 10 μM) and hydrogen peroxide (10 mM) on the superoxide dismutase (SOD) activity of wheat coleoptiles and their heat resistance have been studied. SA and hydrogen peroxide essentially increased the SOD activity. Such effects were completely levelled by the pretreatment of coleoptiles with the inhibitor of protein biosynthesis, cycloheximide, and the blocker of calcium channels, verapamil. It is drawn the conclusion about the calcium-dependent intensifying of SOD synthesis under the influence of SA and hydrogen peroxide. The increase of heat resistance of plant objects after the treatment with these compounds can be related to the preliminary activation of antioxidative enzymes by them.