

Ю. Є. Колупаєв, Т. О. Ястреб,
член-кореспондент НАН України Л. І. Мусатенко

Порівняння впливу саліцилової та янтарної кислот на активність супероксиддисмутази й каталази і теплостійкість проростків проса (*Panicum miliaceum* L.)

*Вивчали вплив обробки насіння розчинами саліцилової та янтарної кислот (СК і ЯК) на теплостійкість проростків проса та активність в них супероксиддисмутази (СОД) і каталази. За дії СК і ЯК збільшувалась активність обох ферментів у 4–5-добових проростках і підвищувалась їх теплостійкість. В умовах *in vitro* (при додаванні до екстракту ферментів) СК і ЯК збільшували активність СОД та незначною мірою інгібували каталазу. Висловлюється припущення, що індукція теплостійкості попередньо оброблених проростків СК і ЯК може бути пов'язана зі змінами в окислювальному метаболізмі, зокрема, з підвищенням активності СОД.*

Застосування саліцилової та янтарної кислот (СК і ЯК) у практиці рослинництва показало, що передпосівна обробка насіння або обприскування різних видів рослин цими сполуками спричиняють підвищення їх урожайності і стійкості до абіотичних і біотичних стресорів [1–3]. Водночас механізми стрес-протекторної дії СК і, особливо, ЯК залишаються мало вивченими, що обмежує можливості їх практичного використання. Дані сполуки є природними метаболітами рослин, а детальне дослідження їх дії може бути корисним також для розуміння фундаментальних механізмів індукції стійкості рослин до стресорів.

Здатність екзогенної СК підвищувати стійкість рослин до абіотичних і біотичних стресових чинників пов'язують передусім з інгібуванням нею каталази, що призводить до накопичення пероксиду водню [4]. Наслідком цього може бути як активація процесів, спрямованих на знищення патогенів (окислювальний вибух, синтез РР-білків тощо [3, 5]), так і підвищення активності антиоксидантних ферментів [6, 7], накопичення універсальних низькомолекулярних протекторів [8], що важливо для формування стійкості рослин до абіотичних стресорів.

ЯК розглядається деякими дослідниками як міметик СК [1]. Доведено здатність обох кислот індукувати синтез одних і тих самих поліпептидів у рослин гороху [1], а також в умовах *in vitro* істотно пригнічувати активність каталази тваринного походження [1] і виділеної з бульб картоплі [9]. Водночас відомо, що молекулярні форми каталази різних органів рослин можуть мати неоднакову чутливість до СК [10]. У багатьох випадках інгібування ферменту спричиняють досить високі (нефізіологічні) концентрації СК [11]. Більше того, показано, що в умовах *in vivo* обробка рослин кукурудзи СК індукувала експресію генів каталази і підвищення її активності в листках [12].

На окремих видах рослин [11] виявлена здатність СК активувати супероксиддисмутазу (СОД), що, поряд з інгібуванням каталази, може бути однією з імовірних причин збільшення вмісту пероксиду водню в рослинних тканинах за дії СК [13].

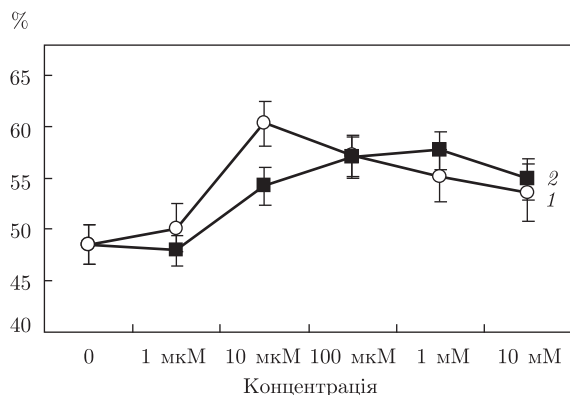


Рис. 1. Вживаність (%) проростків проса (*Panicum miliaceum* L.) після нагрівання (47 °С, 10 хв). 1 — СК; 2 — ЯК. Нульова точка на осі абсцис відповідає вживаності проростків контрольного варіанта (без обробок)

До початку нашої роботи були відсутні дослідження, в яких би порівнювався вплив СК і ЯК в умовах *in vitro* та *in vivo* на активність двох ключових ферментів, причетних до регуляції вмісту активних форм кисню в клітинах — СОД і каталази — у зв'язку з індукуванням стійкості рослин до абіотичних стресорів. Це і визначило нашу мету — дослідити вплив обробки насіння проса (*Panicum miliaceum* L.) розчинами СК і ЯК на теплостійкість проростків та активність СОД і каталази.

Насіння проса сорту Костянтинівське замочували на 10–15 хв у розчинах СК або ЯК у концентраціях 10^{-6} – 10^{-2} М (контроль — обробка дистильованою водою), після чого висушували протягом доби до початку його набубнявіння. Надалі насіння всіх варіантів пророщували в темряві при (23 ± 1) °С протягом 4 діб у чашках Петрі на дистильованій воді з розрахунку 4 мл на 200 зернівок. Потім частину проростків прогрівали протягом 10 хв у водному термостаті при $(47,0 \pm 0,2)$ °С (ушкоджувальний вплив). Через добу проростки виставляли на розсіяне світло (3000 лк), а ще через 5 діб оцінювали їх вживаність.

Активність СОД (КФ 1.15.1.1) і каталази (КФ 1.11.1.6) визначали в проростках до впливу гіпертермії та через 1 і 24 год після нагрівання. У цей час ще не спостерігалось видимих проявів пошкодження рослин. Паралельно визначали активність ферментів у проростках такого ж віку, які не зазнавали нагрівання.

При дослідженні впливу СК і ЯК на активність СОД і каталази *in vitro* кислоти у відповідних концентраціях додавали до неочищених екстрактів ферментів, отриманих з контрольних проростків проса, інкубували 40 хв при 23 °С, після чого визначали активність ферментів. Активність СОД оцінювали за інгібуванням відновлення нітротетразолію синього в суміші, що містила НАДН і феназинметасульфат, активність каталази — за розкладанням пероксиду водню [13]. Експерименти повторювали 4–7 разів. На рисунках наведені середні значення та їх стандартні відхилення.

Обробка насіння СК у концентраціях 10 і 100 мкМ спричиняла достовірне підвищення вживаності проростків проса після ушкоджувального нагрівання (рис. 1). ЯК виявляла максимальний захисний ефект у дещо вищих концентраціях: 100 мкМ — 1 мМ.

Додавання СК до екстракту СОД призводило до підвищення її активності (рис. 2, а), максимальний ефект спостерігався за дії концентрації 10 мкМ, висока концентрація (1 мМ) СК не виявляла достовірного активуючого ефекту. Активуючий вплив на СОД в умовах *in vitro* чинила і ЯК у досить широкому діапазоні концентрацій (див. рис. 2, а).

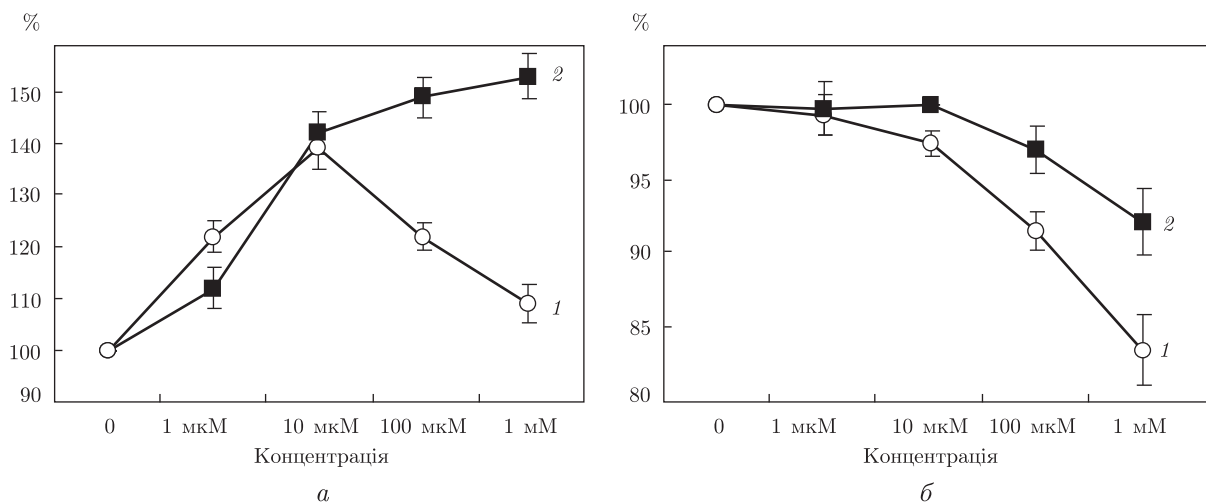


Рис. 2. Вплив СК і ЯК на активність (% до контролю) СОД (а) і каталази (б) проростків проса в умовах *in vitro*.
1 — СК; 2 — ЯК

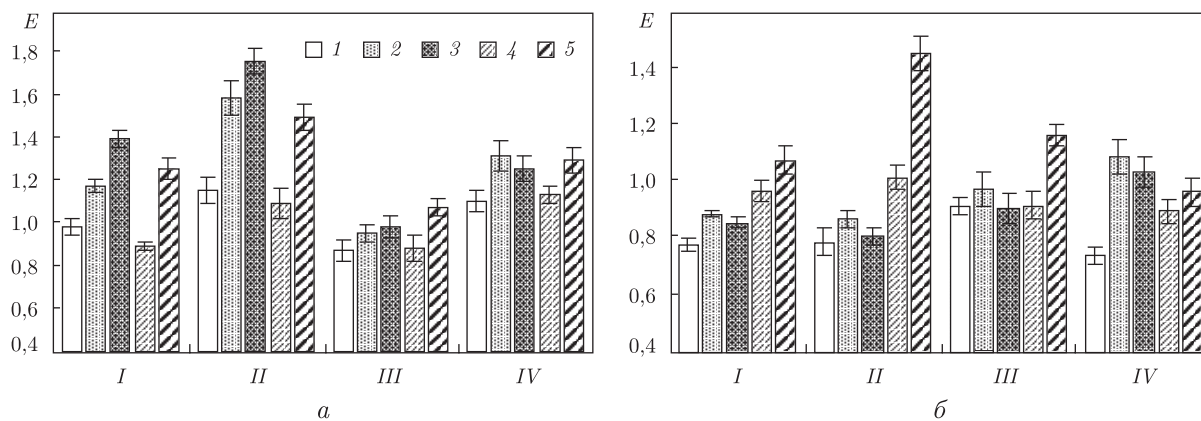


Рис. 3. Активність (E , ум. од./ $(г \cdot хв)$) СОД (а) і каталази (б) в проростках проса.
1 — контроль; 2 — СК, 10 мкМ; 3 — СК, 1 мМ; 4 — ЯК, 10 мкМ; 5 — ЯК, 1 мМ. I — до нагрівання; II, III — відповідно через 1 і 24 год після нагрівання; IV — через 24 год інкубації проростків, що не зазнавали нагрівання

СК і ЯК в умовах *in vitro* пригнічували активність каталази, хоча цей ефект був незначним і спостерігався лише за досить високих концентрацій кислот (див. рис. 2, б). При цьому інгібуєчий вплив СК був більш істотним.

У подальших експериментах оцінювали вплив передпосівної обробки насіння розчинами СК і ЯК на активність СОД і каталази в проростках проса до і після нагрівання.

У проростках, вирощених з насіння, обробленого СК в концентраціях 10 мкМ і 1 мМ, встановлено достовірне підвищення активності СОД (рис. 3, а, I). ЯК виявляла активуючий вплив на СОД лише за обробки нею насіння у вищій концентрації (1 мМ).

У контрольних проростках (без обробки кислотами) через 1 год після нагрівання спостерігалось невелике підвищення активності СОД (див. рис. 3, а, II), проте через 24 год після дії гіпертермії активність ферменту в проростках, які зазнавали ушкоджувального нагрівання, була нижчою порівняно з варіантом без стресу (див. рис. 3, а, III, IV).

У проростках, вирощених з насіння, обробленого СК в обох концентраціях, через 1 год після впливу гіпертермії мало місце додаткове підвищення активності СОД, а через 24 год активність ферменту знижувалася і мало відрізнялася від відповідних величин контрольного варіанта. У проростках, які не зазнавали стресового впливу, у варіанті з СК у концентрації 10 мкМ активність СОД була вищою від контролю (див. рис. 3, а, IV).

У зразках, оброблених ЯК, також відзначалося деяке підвищення активності СОД через 1 год після впливу гіпертермії (див. рис. 3, а, II). Значення активності в проростках, оброблених ЯК у концентрації 1 мМ, було на цій стадії експерименту достовірно вищим від контролю. Надалі (через 24 год після нагрівання проростків) активність ферменту в проростках всіх варіантів знижувалася. При цьому, однак, за дії концентрації ЯК 1 мМ вона була вищою, ніж у відповідному контролі (див. рис. 3, а, III). У проростках з насіння, обробленого ЯК в концентрації 1 мМ, через 24 год з моменту спостережень у варіанті без теплового стресу активність СОД також була дещо вищою порівняно з відповідним контролем (див. рис. 3, а, IV).

Характер впливу СК і ЯК на активність каталази в умовах *in vivo* (обробка насіння) відрізнявся від ефектів, що спостерігалися *in vitro*: обидві кислоти в концентраціях 10 мкМ і 1 мМ не знижували, а підвищували активність ферменту (див. рис. 3, б, I).

Активність каталази у проростках контрольного варіанта (з насіння, не обробленого кислотами) через 1 год після нагрівання істотно не змінювалася, а до 24 год дещо зростала (рис. 3, б, II, III). Таким самим був після нагрівання і характер змін активності каталази в проростках, вирощених з насіння, обробленого СК. При цьому у варіантах з СК активність ферменту мало відрізнялася від контрольних значень, що відповідали тим самим проміжкам часу (див. рис. 3, б, II, III). Водночас у варіанті з обробкою насіння ЯК в концентрації 1 мМ спостерігалось зростання активності ферменту через 1 год після нагрівання і наступне її зниження через 24 год. При цьому, однак, абсолютна величина активності ферменту у варіанті з ЯК (1 мМ) через 24 год після нагрівання була вищою, ніж у відповідному контролі. У зразках, які не зазнавали стресового впливу, через 24 год від початку спостережень у варіантах з СК і ЯК в обох концентраціях активність каталази перевищувала відповідні значення контрольного варіанта (див. рис. 3, б, IV).

Обговорюючи отримані дані, необхідно наголосити, що СК та ЯК в умовах *in vitro* підвищували активність СОД (див. рис. 2). Імовірно, це можна пояснити прямою дією обох кислот на молекули ферменту. Водночас активуючий ефект на СОД проростків проса чинила і передобробка насіння цими кислотами (див. рис. 3). Варто зауважити, що раніше на іншому об'єкті — ізольованих колеоптилях пшениці — нами було показано зняття ефектів екзогенної СК на активність СОД під дією інгібітора біосинтезу білка циклогексиміду і блокатора кальцієвих каналів верапамілу [14]. Це розглядається як свідчення індукування синтезу СОД під дією СК. У рослин арабідопсису за дії екзогенної СК змінювався електрофоретичний спектр СОД [11], що також може свідчити про вплив СК на синтез ферменту. У даній роботі показана можливість активації ферменту під дією СК в умовах *in vitro*. При цьому, однак, істотний ефект чинили концентрації СК, що перевищують фізіологічні. Вміст СК у рослинних тканинах зазвичай становить близько 10 нмоль/г, хоча й дещо підвищується за умов дії стресорів [6]. Тому більш ймовірною причиною підвищення активності СОД за обробки рослинного матеріалу СК або її міметиком ЯК може бути посилення синтезу ферменту. Водночас не можна повністю виключити і прямого впливу даних кислот на молекули СОД.

Характер впливу досліджуваних кислот на активність каталази в умовах *in vitro* та *in vivo* відрізнявся. СК та ЯК знижували активність каталази при додаванні їх до екстракту ферменту проса, але передобробка насіння розчинами цих кислот стимулювала активність цього ензиму (див. рис. 2, 3), що може бути пов'язано з посиленням його синтезу.

Таким чином, у даній роботі вперше показано ідентичний активуючий вплив СК і ЯК на ключовий антиоксидантний фермент СОД і підтверджено інгібування каталази обома кислотами в умовах *in vitro* та продемонстровано її активацію в експериментах *in vivo*. Водночас необхідно зауважити, що інгібуючий вплив СК на активність каталази проростків проса *in vitro* у наших експериментах був невеликим і спостерігався лише за дії концентрацій, що явно перевищують фізіологічні. Ще менш помітним був вплив на каталазу ЯК, котра деякими дослідниками розглядається як міметик СК [1]. Наші дані відрізняються від отриманих раніше на прикладі бульб картоплі [9]. Це дає підставу сумніватися в тому, що каталаза є основною мішенню дії СК і особливо ЯК, принаймні у рослин проса. Ймовірно, вплив СК і ЯК на окиснювальний метаболізм пов'язаний зі зміною активності інших ферментів, зокрема, досліджуваної нами СОД. Її активація може призводити до накопичення пероксиду водню, а отже, й до запуску механізмів передачі в ядро сигналу “окислювального стресу” і формування відповідних адаптивних реакцій [13], зокрема активації антиоксидантної системи. Ефект підвищення теплостійкості проростків проса після обробки їх СК і ЯК у концентраціях, що активували СОД (див. рис. 1), є одним зі свідчень на користь такого припущення, яке, однак, потребує спеціальних експериментальних перевірок.

1. Тарчевский И. А., Максютова Н. Н., Яковлева В. Г., Гречкин А. Н. Янтарная кислота – миметик салициловой кислоты // Физиология растений. – 1999. – **46**, № 1. – С. 23–28.
2. Senaratna T., Touchell D., Bunn E., Dixon K. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants // Plant Growth Regul. – 2000. – **30**. – P. 157–161.
3. Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
4. Janda T., Szalai G., Tari I., Paldi E. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants // Planta. – 1999. – **208**. – P. 175–180.
5. Wendehenne D., Durner J., Chen Z., Klessing D. E. Benzothiadiazole, an inducer of plant defences, inhibits catalase and ascorbate peroxidase // Phytochemistry. – 1998. – **47**. – P. 651–657.
6. Liu H.-T., Liu Y.-Y., Pan Q.-H. et al. Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP₂-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves // J. Exp. Bot. – 2006. – **57**. – P. 3337–3347.
7. 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.
8. Колупаев Ю. Є., Карпець Ю. В., Мусатенко Л. І. Участь активних форм кисню в індукованні со-лестійкості проростків пшениці салициловою кислотою // Доп. НАН України. – 2007. – № 6. – С. 154–158.
9. Панина Я. С., Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л. Ингибирование активности каталазы клубней картофеля салициловой и янтарной кислотами // Докл. АН. – 2004. – **397**, № 1. – С. 131–133.
10. Chen Z., Iyer S., Capitan A. et al. Differential accumulation of salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues // Plant Physiol. – 1997. – **114**. – P. 193–201.
11. Rao M. V., Paliyaht 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.
12. Guan L. M., Scandalios J. G. Developmentally related responses of maize catalase gene to salicylic acid // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – **92**. – P. 5930–5954.
13. Колупаев Ю. Є. Можлива роль супероксиддисмутази у салицилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. – 2007. – **64**, № 2. – С. 270–278.

14. Колупаев Ю. С., Карпец Ю. В., Мусатенко Л. І. Кальцієзалежний вплив саліцилової кислоти і пероксида водню на активність супероксиддисмутази колеоптилів пшениці // Доп. НАН України. – 2009. – № 9. – С. 165–169.

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

Надійшло до редакції 15.01.2010

Yu. Ye. Kolupaev, T. O. Yastreb,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **L. I. Musatenko**

Comparison of the influences of salicylic and succinic acids on the activity of superoxide dismutase and catalase and heat resistance of *Panicum miliaceum* L. plantlets

*The influence of seeds treatment with solutions of salicylic and succinic acids (SaA and SuA) on the heat resistance of *Panicum miliaceum* L. plantlets and the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase in them has been studied. Under the action of SaA and SuA, an increase of the activity of both enzymes in 4–5-days plantlets and their heat resistance are registered. In vitro conditions (addition to enzyme extracts), SaA and SuA increased the SOD activity and negligibly inhibited catalase. It is supposed that the induction of a heat resistance of plantlets by the pretreatment with SaA and SuA can be related to changes in the oxidative metabolism, in particular, to an increase of the SOD activity.*