

УДК 577.15:581.1.036.2

УЧАСТИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ЖАСМОНОВОЙ И САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

А.А. ЛУГОВАЯ, Ю.Е. КОЛУПАЕВ, Ю.В. КАРПЕЦ

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

Исследовали возможную роль ферментных систем, задействованных в продуцировании активных форм кислорода (АФК), при реализации физиологических эффектов жасмоновой (ЖАК) и салициловой (СК) кислот. Обработка колеоптилей пшеницы 1 мкМ растворами ЖАК и СК вызывала транзиторное усиление генерации супероксидных анион-радикалов. Этот эффект нивелировался действием имидазола (ингибитора НАДФН-оксидазы) и бутанола-1 (антагониста зависящего от фосфолипазы D образования фосфатидной кислоты), но не его неактивного аналога бутанола-2. Указанные ингибиторы также угнетали вызываемые ЖАК и СК эффекты повышения активности супероксиддисмутазы в колеоптилях пшеницы и их теплоустойчивости. Сделано предположение, что стресс-протекторное действие ЖАК и СК опосредовано усилением генерации АФК, связанным с активацией НАДФН-оксидазы. При этом посредником регуляции ее активности может быть фосфатидная кислота, образующаяся с участием фосфолипазы D.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., жасмоновая кислота, салициловая кислота, активные формы кислорода, НАДФН-оксидаза, фосфатидная кислота, теплоустойчивость.

Жасмоновая и салициловая кислоты являются фитогормонами, участвующими в реакциях растений на действие биотических и абиотических стрессоров [6, 20]. Показано повышение устойчивости растений к различным стресс-факторам под действием экзогенных ЖАК [7, 15] и СК [1, 4]. Стресс-протекторные эффекты этих фитогормонов обусловлены их влиянием на экспрессию многих защитных генов. Более изучено действие ЖАК и СК на устойчивость растений к патогенам. Установлено, что способность ЖАК индуцировать системную устойчивость растений в значительной степени связана с активацией экспрессии генов ингибиторов протеаз и фенилаланинаммонийлиазы [17, 20]. СК также вызывает усиление синтеза ингибиторов протеаз. Кроме того, под ее влиянием происходит активация экспрессии генов хитиназ, глюканаз и других PR-(pathogenesis-related) белков [3].

Механизмы защитных эффектов ЖАК и СК при действии на растения абиотических стрессоров исследованы в меньшей степени. Показана способность обоих фитогормонов активировать антиоксидантную систему растений [1, 11, 13], что может быть важно для формирования их устойчивости к неблагоприятным факторам различной природы.

Получены сведения, указывающие на роль АФК как сигнальных посредников при действии и ЖАК, и СК [8, 16]. Сделано предположение, что некоторые эффекты ЖАК, в частности способность индуцировать закрытие устьиц [19], старение листьев [10], связаны с активацией НАДФН-оксидазы. Этот фермент, генерирующий супероксидные анион-радикалы, задействован и в реализации физиологических эффектов СК. Так, показано, что индуцируемое СК закрытие устьиц подавляется ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодонумом [12]. В то же время установлено, что в активации НАДФН-оксидазы может принимать участие фосфатидная кислота [18]. Выявлена способность экзогенных ЖАК [5] и СК [12] повышать активность фосфолипазы D (ФЛD) и тем самым вызывать накопление фосфатидной кислоты в растениях. Причинно-следственная связь между вызываемыми ЖАК и СК повышением содержания фосфатидной кислоты и усилением генерации АФК, зависящим от НАДФН-оксидазы, до сих пор исследована слабо. На растениях арабидопсиса показано участие ФЛD в процессах активации НАДФН-оксидазы, индуцировании накопления АФК и закрытии устьиц под действием СК [12]. Однако вопрос о роли фосфатидной кислоты в активации АФК-генерирующих ферментных систем при действии ЖАК остается открытым.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение ингибиторным методом возможного участия НАДФН-оксидазы и фосфатидной кислоты как одного из ее регуляторов в реализации стресс-протекторного действия экзогенных ЖАК и СК на колеоптиля пшеницы.

Методика

Исследования проводили на отрезках колеоптилей пшеницы, которые чувствительны к действию обоих экзогенных фитогормонов [2]. Колеоптиля отделяли от 4-суточных этиолированных проростков *Triticum aestivum* L. сорта Элегия и инкубировали на простерилизованном 2 %-м растворе сахарозы с добавлением пенициллина (натриевая соль, 100 000 ед/л) (контроль).

В соответствующих вариантах в среду инкубации колеоптилей добавляли ЖАК или СК в конечной концентрации 1 мкМ [2]. ЖАК предварительно растворяли в небольшом объеме этанола, а СК — в небольшом объеме воды при нагревании. В вариантах без ЖАК в инкубационную среду вносили эквивалентное количество этанола. Продолжительность инкубации колеоптилей на среде с добавлением ЖАК или СК — 24 ч.

В соответствующих вариантах опыта колеоптиля обрабатывали в течение 26 ч ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом [10] концентрацией 1 мкМ или ингибитором ФЛD-зависимого образования фосфатидной кислоты 0,2 %-м бутанолом-1 либо его неактивным аналогом бутанолом-2 такой же концентрации [14]. В вариантах с комбинированной обработкой колеоптилей фитогормонами и имидазолом или ЖАК и бутанолом-1 (бутанолом-2) соответствующие эффекторы добавляли в среду инкубации колеоптилей за 2 ч до внесения в нее ЖАК или СК. Концентрации эффекторов были выбраны на основании результатов предварительных опытов.

После окончания времени инкубации колеоптилей на растворах исследуемых соединений часть отрезков каждого варианта опытов под-

вергали потенциально летальному прогреву в водяном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при температуре $43 \pm 0,1$ °С в течение 10 мин. Затем колеоптилы помещали в чашки Петри с простерилизованным 2 %-м раствором сахарозы с добавлением пенициллина. Через 2 сут после прогрева оценивали их повреждения по появлению специфического оттенка и потере тургора.

Выделение супероксидных анион-радикалов из отрезков колеоптилей во внешний раствор определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) до формазана, как описано ранее [1]. Оптическую плотность измеряли при 530 нм. Для проверки специфичности определяемой генерации $O_2^{\bullet-}$ в специальных опытах в пробы добавляли супероксиддисмутазу (СОД) — 50 ед/мл. СОД угнетала образование формазана не менее чем на 90 %. В связи с этим считали, что количество восстановленного НСТ определяется генерацией $O_2^{\bullet-}$. Супероксид-продуцирующую активность оценивали как изменение светопоглощения реакционной смеси за единицу времени инкубации в расчете на один отрезок колеоптиля. За 100 % принимали величину в контрольном варианте в первой временной точке наблюдений.

Для определения активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) навеску растительного материала гомогенизировали при температуре 4 °С в 0,15 М К₂Na-фосфатном буфере (рН 7,6) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ), дитиотреитола (1 мМ), фенилметилсульфонилфторида (0,5 мМ) и детергента Тритона X-100 (конечная концентрация 0,1 %) [1]. Для анализа использовали надосадочную жидкость после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С. Активность СОД определяли методом, основанным на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анион-радикалы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата. Оптическую плотность определяли при 540 нм.

Опыты проводили в трехкратной биологической повторности и каждый воспроизводили независимо три раза. В таблицах приведены средние величины и их стандартные отклонения. Кроме случаев, оговоренных отдельно, обсуждены различия, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как было установлено ранее, под действием экзогенных 1 мкМ растворов ЖАК и СК усиление генерации супероксидных анион-радикалов колеоптилями пшеницы было транзиторным и происходило в течение первых 2 ч после начала обработки [2]. Именно в этом временном отрезке определяли интенсивность образования $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями пшеницы в настоящей работе. Генерация супероксидных анион-радикалов во внешний раствор усиливалась уже через 15 мин от начала обработки ЖАК (табл. 1). Эффект СК был менее выраженным. Через 2 ч действие ЖАК на образование $O_2^{\bullet-}$ ослабевало, а влияние СК, наоборот, немного усиливалось.

Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол сам по себе немного снижал генерацию $O_2^{\bullet-}$ колеоптилями и при этом почти полностью снимал усиление образования супероксидных анион-радикалов, вызываемое ЖАК и СК (см. табл. 1).

Бутанол-1 — ингибитор ФЛД-зависимого образования фосфатидной кислоты — снижал генерацию $O_2^{\bullet-}$ и в значительной степени угне-

УЧАСТИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

ТАБЛИЦА 1. Генерация супероксидных анион-радикалов колеоптилями пшеницы через 15 мин и через 2 ч после начала их обработки эффекторами

Вариант опыта	Генерация супероксидных анион-радикалов, % контроля	
	15 мин	2 ч
Контроль	100,0±2,8	99,1±3,3
ЖАК (1 мкМ)	130,8±3,9	118,7±3,6
СК (1 мкМ)	113,7±3,1	119,6±2,8
Имидазол (1 мкМ)	93,7±4,1	92,4±4,4
ЖАК (1 мкМ) + имидазол (1 мкМ)	107,1±4,4	100,4±3,9
СК (1 мкМ) + имидазол (1 мкМ)	104,3±3,8	107,0±3,3
Бутанол-1 (0,2 %)	87,2±4,6	84,3±5,1
ЖАК (1 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %)	97,9±4,3	105,5±4,2
СК (1 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %)	100,0±2,9	96,1±3,8
Бутанол-2 (0,2 %)	102,1±3,7	97,0±3,2
ЖАК (1 мкМ) + бутанол-2 (0,2 %)	125,4±3,6	113,3±4,0
СК (1 мкМ) + бутанол-2 (0,2 %)	109,3±3,0	120,1±3,2

тал эффект усиления продукции супероксида, вызываемый как ЖАК, так и СК (см. табл. 1). В то же время бутанол-2 (неактивный аналог бутанола-1) не оказывал существенного влияния на образование этой АФК.

Таким образом, можно полагать, что одним из ферментативных источников АФК, задействованных в реализации физиологических эффектов ЖАК и СК, является НАДФН-оксидаза, а ее активация, по-видимому, происходит при посредничестве фосфатидной кислоты, образующейся с участием ФЛД.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние ингибиторов НАДФН-оксидазы и ФЛД, а также их комбинаций с ЖАК или СК на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы. Обработка колеоптилей 1 мкМ растворами ЖАК или СК приблизительно в одинаковой степени повышала теплоустойчивость (табл. 2). Имидазол сам по себе не оказывал существенного влияния на теплоустойчивость колеоптилей, но при этом нивелировал положительное действие обоих исследуемых фитогормонов. Обработка колеоптилей бутанолом-1 вызывала тенденцию к небольшому снижению их выживания и практически полностью снимала положительное влияние ЖАК и СК на теплоустойчивость колеоптилей. Бутанол-2 в отдельности не оказывал влияния на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы и не модифицировал эффекты ЖАК и СК (см. табл. 2).

Повышение экзогенными ЖАК и СК устойчивости растительных клеток к гипертермии и другим абиотическим стрессорам может быть обусловлено АФК-зависимой активацией ряда стресс-протекторных систем, среди которых особое значение имеет антиоксидантная [9]. Мы исследовали влияние ЖАК, СК и использованных эффекторов на активность ключевого фермента антиоксидантной защиты СОД. Как показано ранее, существенное повышение активности СОД происходило через 2 ч после начала действия ЖАК или СК [2]. Таким же был характер вли-

ТАБЛИЦА 2. Выживание coleoptiles пшеницы после повреждающего прогрева и активность супероксиддисмутазы через 2 и через 24 ч после начала их обработки эффекторами

Вариант опыта	Выживание, %	Активность СОД, усл.ед/ (г сухого вещества · мин)	
		2 ч	24 ч
Контроль	53,6±1,9	25,7±0,7	24,9±0,6
ЖАК (1 мкМ)	70,3±2,7	29,8±0,9	30,1±0,9
СК (1 мкМ)	69,7±3,1	29,2±0,7	27,0±0,8
Имидазол (1 мкМ)	49,3±2,9	24,3±0,8	25,1±0,8
ЖАК (1 мкМ) + имидазол (1 мкМ)	58,0±3,2	27,6±0,7	26,8±0,7
СК (1 мкМ) + имидазол (1 мкМ)	56,7±3,4	26,8±0,6	22,9±1,1
Бутанол-1 (0,2 %)	46,5±2,9	26,3±0,8	26,5±0,8
ЖАК (1 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %)	50,3±2,6	26,4±1,0	27,1±1,0
СК (1 мкМ) + бутанол-1 (0,2 %)	49,6±3,2	26,3±0,7	25,7±0,8
Бутанол-2 (0,2 %)	54,0±2,2	26,9±0,8	25,9±0,8
ЖАК (1 мкМ) + бутанол-2 (0,2 %)	66,4±3,1	28,7±0,9	30,4±0,9
СК (1 мкМ) + бутанол-2 (0,2 %)	65,3±3,3	27,9±0,7	26,1±0,7

яния ЖАК и СК на активность СОД coleoptiles и в настоящем исследовании (см. табл. 2). Через 24 ч инкубации положительное влияние ЖАК на активность СОД сохранялось, а эффект СК несколько уменьшился.

Под влиянием ингибитора НАДФН-оксидазы имидазола активность СОД существенно не изменялась. В то же время имидазол частично снимал активирующее действие ЖАК и (в большей степени) СК на этот фермент. Антагонист фосфатидной кислоты бутанол-1 сам по себе существенно не влиял на активность СОД. При этом он в значительной степени угнетал проявление положительного влияния ЖАК и СК на активность СОД (см. табл. 2). Обработка coleoptiles бутанолом-2 достоверно не влияла на активность СОД и не препятствовала проявлению активирующего действия ЖАК и СК на этот фермент.

Таким образом, имеются основания полагать, что положительное влияние экзогенных ЖАК и СК на теплоустойчивость coleoptiles пшеницы реализуется с участием АФК, образуемых НАДФН-оксидазой. Под действием ЖАК и СК она может активироваться вследствие усиления образования фосфатидной кислоты в реакциях, катализируемых ФЛД. Предположение об усилении образования фосфатидной кислоты под влиянием ЖАК и СК согласуется с данными, полученными при непосредственном определении активности ФЛД и содержания фосфатидной кислоты в растительных клетках [5, 12]. При этом с определенной долей условности в рамках использованной нами модели можно говорить о сходстве не только влияния ЖАК и СК на генерацию АФК и активность антиоксидантной системы, но и механизмов действия этих стрессовых фитогормонов, обуславливающих развитие устойчивости растительных объектов. В частности, общими мишенями действия ЖАК и СК могут быть НАДФН-оксидаза и ФЛД, локализованные в плазматической мембране.

1. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Швиденко Н.В., Карпец Ю.В. Индукция теплоустойчивости coleoptилей пшеницы салициловой и янтарной кислотами: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // Прикл. биохимия и микробиология. — 2012. — **48**, № 5. — С. 550—556.
2. Луговая А.А., Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Карпец Ю.В. Эффект антагонизма при влиянии жасмоновой и салициловой кислот на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы и компоненты их про-/антиоксидантной системы // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2013. — Вип. 2 (29). — С. 39—46.
3. Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М. Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений // Прикл. биохимия и микробиология. — 2010. — **46**, № 3. — С. 263—275.
4. Agarwal S., Sairam R.K., Srivastava G.C., Meena R.C. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes // Biol. Plant. — 2005. — **49**. — P. 541—550.
5. Altuzar-Molina A.R., Munoz-Sanchez J.A., Vazquez-Flota F. et al. Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cells // Plant Physiol. Biochem. — 2011. — **49**. — P. 151—158.
6. An C., Mou Z. Salicylic acid and its function in plant immunity // J. Integr. Plant Biol. — 2011. — **53**. — P. 412—428.
7. Ckarke S.M., Cristescu S.M., Miersch O. et al. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* // New Phytol. — 2009. — **182**. — P. 175—187.
8. Dat J.F., Lopez-Delgado H.L., Foyer 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.
9. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // Antioxid. Redox Signal. — 2009. — **11**. — P. 861—906.
10. Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // Physiol. plant. — 2006. — **127**. — P. 293—303.
11. Kadioglu A., Saruhan N., Saglam A. et al. Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system // Plant Growth Regul. — 2010. — **64**. — P. 27—37.
12. Kalachova T., Iakovenko O., Kretinin S., Kravets V. Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade // Plant Physiol. Biochem. — 2013. — **66**. — P. 127—133.
13. Kumari G.J., Reddy A.M., Naik S.T. et al. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings // Biol. Plant. — 2006. — **50**. — P. 219—226.
14. Lanteri M.L., Laxalt A.M., Lamattina L. Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in cucumber // Plant Physiol. — 2008. — **147**. — P. 188—198.
15. Liu X., Chi H., Yue M. et al. The regulation of exogenous jasmonic acid on UV-B stress tolerance in wheat // Plant Growth Regul. — 2012. — **31**. — P. 436—447.
16. Ozawa R., Berteaux C.M., Foti M. et al. Exogenous polyamines elicit herbivore-induced volatiles in *Lima bean* leaves: involvement of calcium, H₂O₂ and jasmonic acid // Plant Cell Physiol. — 2009. — **50**. — P. 2183—2199.
17. Pauwels L., Inze D., Goossens A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? // Trends Plant Sci. — 2009. — **14**. — P. 87—91.
18. Sang Y., Cui D., Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2001. — **126**. — P. 1449—1458.
19. Suhita D., Raghavendra A.S., Kwak J.M., Vavasseur A. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure // Ibid. — 2004. — **134**. — P. 1536—1545.
20. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development // Ann. Bot. — 2007. — **100**. — P. 681—697.

Получено 07.08.2013

УЧАСТЬ СИГНАЛЬНИХ ПОСЕРЕДНИКІВ У РЕАЛІЗАЦІЇ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ЖАСМОНОВОЇ І САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТ НА РОСЛИННІ КЛІТИНИ

Г.А. Лугова, Ю.Є. Колупаєв, Ю.В. Карпець

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва

Досліджували можливу роль ферментних систем, задіяних у продукуванні активних форм кисню (АФК), за реалізації фізіологічних ефектів жасмонової (ЖАК) і саліцилової (СК) кислот. Обробка колеоптилів пшениці 1 мкМ розчинами ЖАК і СК викликала транзиторне посилення генерування супероксидних аніон-радикалів. Цей ефект нівелювався дією імідазолу (інгібітора НАДФН-оксидази) і бутанолу-1 (антагоніста залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти), але не його неактивного аналога бутанолу-2. Вказані інгібітори також пригнічували спричинювані ЖАК і СК ефекти підвищення активності супероксиддисмутази в колеоптилях пшениці та їх теплостійкості. Зроблено припущення, що стрес-протекторна дія ЖАК і СК опосередкована посиленням генерування АФК, пов'язаним з активацією НАДФН-оксидази. При цьому посередником регулювання її активності може бути фосфатидна кислота, що утворюється за участю фосфоліпази D.

PARTICIPATION OF SIGNAL MEDIATORS IN REALIZATION OF STRESS-PROTECTIVE INFLUENCE OF EXOGENOUS JASMONIC AND SALICYLIC ACIDS ON PLANT CELLS

G.A. Lugova, Yu.E. Kolupaev, Yu.V. Karpets

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

Possible role of enzymatic systems, involved in the generation of reactive oxygen species (ROS), in realization of physiological effects of jasmonic (JA) and salicylic (SA) acids has been investigated. Treatment of wheat coleoptiles with 1 μ M solutions of JA and SA caused the transitional intensifying of generation of superoxide anion-radicals. This effect was leveled under the influence of imidazole (NADPH-oxidase inhibitor) and butanol-1 (antagonist of phospholipase D dependent phosphatidic acid formation), but not its inactive analogue butanol-2. Indicated inhibitors suppressed also the effects of increase of superoxide dismutase activity in wheat coleoptiles and raise of their heat resistance, invoked by JA and SA. It is supposed that the stress-protective influence of JA and SA is mediated by the intensifying of ROS generation, bound to the NADPH-oxidase activation. Thus phosphatidic acid, which is generated with the participation of phospholipase D, can be the mediator, involved in the regulation of NADPH oxidase activity.

Key words: *Triticum aestivum* L., jasmonic acid, salicylic acid, reactive oxygen species, NADPH oxidase, phosphatidic acid, heat resistance.