

Ю.Є. КОЛУПАЄВ, Ю.В. КАРПЕЦЬ

Харківський національний аграрний університет ім.

В.В. Докучаєва

п/в Докучаєве, Харків, 62483, Україна

plant_biology@agrouniver.kharkov.com

**ІНДУКУВАННЯ САЛІЦИЛОВОЮ
КИСЛОТОЮ ТЕПЛО- І СОЛЕСТІЙКОСТІ
ПРОРОСТКІВ *TRITICUM AESTIVUM* L.
У ЗВ'ЯЗКУ ЗІ ЗМІНАМИ
ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ
РІВНОВАГИ**

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *теплостійкість*, *солестійкість*, *саліцилова кислота*, *пероксидаза*, *каталаза*, *пероксиди*

За останні десятиліття накопичено чимало відомостей про роль саліцилової кислоти (СК) як природного регулятора низки функцій рослинного організму. Особлива увага приділяється значенню СК в індукції системної набутої стійкості рослин до патогенів [2, 20]. Один з механізмів впливу СК на стійкість рослин до інфекцій може бути пов'язаний з її здатністю спричинювати так званий «окиснювальний спалах» — різке підвищення вмісту активних форм кисню (АФК) у клітинах і позаклітинному середовищі. АФК виконують сигнальні функції [3], беруть безпосередню участь у захисті рослин від патогенів [11, 19]. Нагромадження АФК під дією СК пов'язують з інгібуванням каталази [8] та підвищенням активності фенолпероксидаз [13]. Останнім часом з'явилися відомості про здатність СК підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресів — низьких [15] і високих [9] температур, засолення середовища [18], впливу важких металів [14].

Зауважимо, що ефекти СК вивчалися переважно на дводольних [9, 20]. Лише у поодиноких дослідженнях робилися спроби встановити залежність між нагромадженням АФК та індукуванням стійкості до абіотичних стресів, зокрема теплового [9] та холодого [10]. Дію СК частіше вивчають на культурах клітин [21] або ізольованих органах [4], які є зручними моделями для таких досліджень. Але їхня фізіологічна відповідь може відрізнитися від реакції інтактних рослин. Практично відсутні роботи, в яких на одному об'єкті порівнювався вплив СК на стійкість рослин до двох абіотичних стресів різної природи. Саме тому метою нашої роботи було вивчення впливу екзогенної СК на стійкість проростків озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) до теплового і сольового стресів та сумарний вміст пероксидів й активність каталази та пероксидази, які використовують пероксиди як субстрат.

© Ю.Є. КОЛУПАЄВ, Ю.В. КАРПЕЦЬ, 2006

Матеріали і методи досліджень

Насіння *Triticum aestivum* L. (сорт Донецька 48) пророщували на дистильованій воді при 18 °С. Чотиридобові етіоловані проростки дослідних варіантів протягом 24 год обробляли 1 мкМ СК (надходження через корені). Концентрація СК, що спричинювала захисний ефект, була підібрана у попередніх дослідах. Ушкоджуюче нагрівання здійснювали зануренням проростків у ванну водного ультратермостату (експозиція 10 хв при 44 °С). Короткочасний сольовий стрес створювали зануренням кореневої системи проростків у 4 %-й NaCl протягом 4 год [6]. Після впливу стресових чинників проростки всіх варіантів переносили на дистильовану воду. Через 4 доби відростання оцінювали виживання проростків (%).

Біохімічні аналізи коренів та етіолованих пагонів проводили перед початком їхньої обробки СК, через 1, 4, 24 год після неї та через 4, 24 год після дії стресових чинників. Сумарний вміст пероксидів визначали феротіоціанатним методом [17]. Активність каталази визначали за розщепленням пероксиду водню [4], гваяколпероксидази — за окисненням гваяколу [16].

Повторність незалежних дослідів була 3—4-кратною. На рисунках наведені середні результати та їх квадратичні відхилення.

Результати досліджень та їх обговорення

СК помітно підвищувала виживання проростків *T. aestivum* після теплового і сольового стресів (рис. 1).

Сумарний вміст пероксидів упродовж перших 24 год дослідів у коренях та етіолованих пагонах контрольного варіанта був відносно стабільним, як виняток лише дещо підвищувалася концентрація пероксидів у коренях через 4 год від початку спостережень (рис. 2). У коренях і пагонах проростків, що інкубувалися на 1 мкМ СК, вміст пероксидів підвищувався на 13—24 % через 4 і 24 год від початку обробки СК.

Надалі, через 24—48 год від початку спостережень, вміст пероксидів у коренях проростків контрольного варіанта істотно не змінювався, а в пагонах знижувалася кількість пероксидів. У варіанті з обробкою СК після перенесення зразків на дистильовану воду концентрація пероксидів знижувалася практично до рівня контрольного варіанта як у коренях, так і в пагонах.

Через 4 год після нагрівання вміст пероксидів у коренях контрольного варіанта істотно не змінювався, а в пагонах — дещо зменшувався. Водночас у варіанті з СК через 4 год після нагрівання значно знижувався вміст пероксидів як у коренях, так і в пагонах. Надалі (через 24 год після стресу) вміст пероксидів у коренях підвищувався в обох варіантах дослідів, хоча абсолютні значення у разі обробки СК були нижчими. У пагонах, навпаки, вміст пероксидів знижувався через 24 год після нагрівання (48 год від початку дослідів). При цьому абсолютні його значення у варіанті з СК були меншими від контролю (рис. 2).

Після дії сольового стресу в коренях проростків контрольного варіанта підвищувався вміст пероксидів, а у разі обробки СК їхній вміст залишався

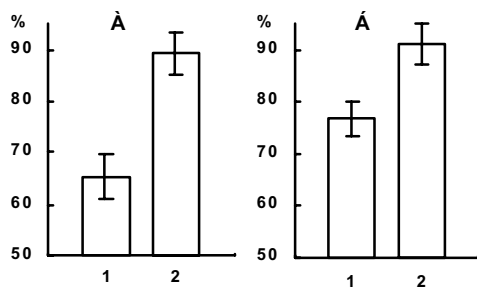


Рис. 1. Вплив саліцилової кислоти на виживання (%) проростків *Triticum aestivum* L. після теплового (А) і сольового (Б) стресів: 1 — контроль, 2 — 1 мкМ саліцилова к-та
 Fig. 1. Effect of salicylic acid on survival rate (%) of plantlets *Triticum aestivum* L. after the heat (A) and salt (B) stresses: 1 — the control, 2 — 1 mkM salicylic acid

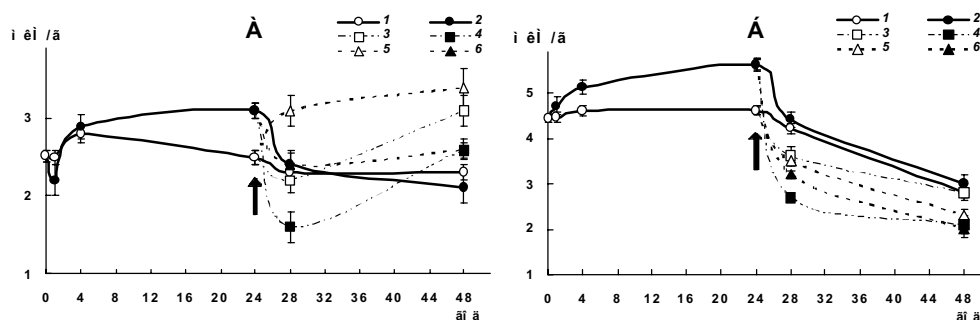


Рис. 2. Сумарний вміст пероксидів (мкМ/г сухої маси) в коренях (А) і пагонах (Б) проростків *T. aestivum*. Тут і на рисунках 3, 4: 1 — контроль (без стресу), 2 — 1 мкМ саліцилова к-та (без стресу), 3 — контроль (тепловий стрес), 4 — 1 мкМ саліцилова к-та (тепловий стрес), 5 — контроль (сольовий стрес), 6 — 1 мкМ саліцилова к-та (сольовий стрес). Стрілка вказує початок стресового впливу: тепловий стрес — 10 хв при 43 °С, сольовий стрес — 4-годинна інкубація на 4 %-му NaCl з подальшим перенесенням на дистильовану воду
 Fig. 2. The total content of peroxides (mkM/g of dry mass) in roots (A) and propagules (B) of plantlets *T. aestivum*. Here and on fig. 3, 4: 1 — the control (without stress), 2 — 1 mkM salicylic acid (without stress), 3 — the control (heat stress), 4 — 1 mkM salicylic acid (heat stress), 5 — the control (salt stress), 6 — 1 mkM salicylic acid (salt stress). By an arrow the beginning stress influence is shown: heat stress — 10 min at 43 °C, salt stress — a 4-hour incubation on 4 % NaCl with the further transference conduction on distilled water

майже незмінним. У пагонах як контрольного, так і дослідного варіантів, після дії сольового стресу концентрація пероксидів знижувалася (рис. 2).

Упродовж експерименту активність каталази в коренях проростків контрольного варіанта дещо зростала, що було особливо помітним через 24 год від початку спостережень (рис. 3). У пагонах вона була в 2,0—2,2 раза вищою, ніж у коренях і за час досліду змінювалася слабо. Лише наприкінці спостережень (48 год) знижувалася активність каталази.

Обробка СК призводила до зниження активності каталази як у коренях, так і в пагонах, причому в коренях цей ефект був помітним через 4—24 год, а в пагонах — лише через 24 год від початку обробки. Після перенесення проростків, які не піддавали дії стресу, з СК на дистильовану воду в їхніх коренях активність каталази дещо зростала, а в пагонах залишалася незмінною (рис. 3).

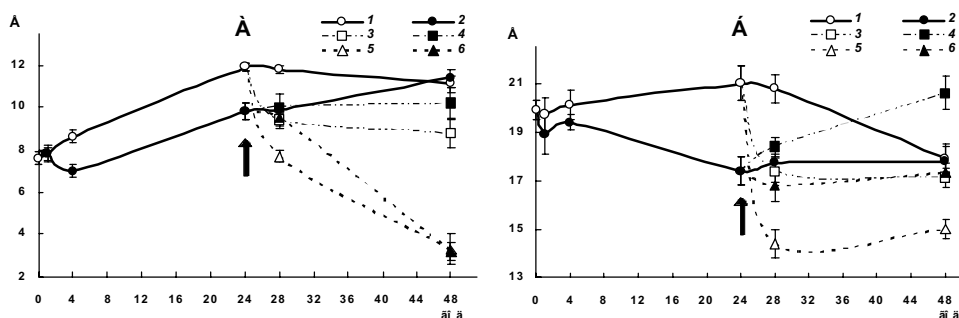


Рис. 3. Активність каталази (Е, ммоль / (г сухої маси • хв)) у коренях (А) і пагонах (Б) проростків *T. aestivum*

Fig. 3 Activity of catalase (E, mM / (g of dry mass • min)) in roots (A) and propagules (Б) of plantlets *T. aestivum*

Внаслідок ушкоджуючого нагрівання знижувалася активність каталази в коренях і пагонах контрольних проростків. Водночас у варіанті з СК активність ферменту після нагрівання в коренях істотно не змінювалася, а в пагонах зростала, що було особливо помітно через 24 год після стресу (рис. 3).

Після дії сольового стресу знижувалася активність каталази в коренях обох варіантів. У пагонах проростків контрольного варіанта також мало місце істотне зниження активності каталази. Проте у пагонах проростків, оброблених СК, активність каталази після сольового стресу не знижувалася (рис. 3).

Активність пероксидази в коренях проростків контрольного варіанта зазнавала деяких флуктуацій (рис. 4). Так, мало місце достовірне підвищення активності ферменту через 4 год від початку експерименту. Ймовірно, це спричинювалося перенесенням проростків на свіжу дистильовану воду. Флуктуації активності пероксидази коренів на заміну розчинів інкубації свіжими зареєстровані й іншими авторами [5]. Через 24–28 год інкубації на воді активність ферменту в коренях контрольного варіанта дещо знижувалась, а далі (до 48 год) — трохи підвищувалась. У пагонах контрольних проростків активність пероксидази упродовж дослідження достовірно не змінювалася. При цьому вона була більш як удвічі нижчою порівняно з активністю в коренях (рис. 4).

Внаслідок обробки СК через 1–4 год інкубації підвищувалася активність пероксидази в коренях. А надалі активність ферменту в коренях проростків дослідного і контрольного варіантів не відрізнялася. У пагонах проростків істотних змін активності ферменту під впливом СК упродовж дослідження не спостерігалося (рис. 4).

Тепловий стрес призводив до підвищення активності пероксидази в коренях як контрольного, так і дослідного (СК) варіантів. При цьому в коренях проростків, оброблених СК, активність ферменту була вищою, ніж у контролі, що достовірно виявлялося через 24 год після нагрівання. Водночас у пагонах дослідного і контрольного варіантів після теплового стресу активність пероксидази істотно не змінювалася (рис. 4).

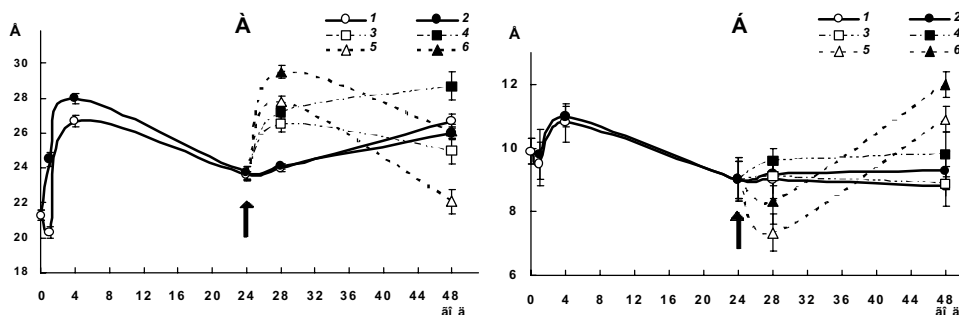


Рис. 4. Активність пероксидази (Е, ум. од. / (г сухої маси • хв)) у коренях (А) і пагонах (Б) проростків *T. aestivum*

Fig. 4. Activity of peroxidase (E, rel. units / (g of dry mass • min)) in roots (A) and propagules (B) of plantlets *T. aestivum*

Сольовий стрес спричинював підвищення активності пероксидази в коренях контрольних і дослідних проростків, але надалі вона знижувалася. При цьому абсолютні значення активності в коренях дослідних проростків були вищими порівняно з контролем. У пагонах контрольного і дослідного варіантів активність пероксидази спершу (одразу після дії NaCl) знижувалася, а надалі — через 48 год від початку експерименту — підвищувалася. Проте рівні активності ферменту в обох варіантах не відрізнялися достовірно, хоча у варіанті з СК були дещо більшими (рис. 4).

Обговорюючи отримані результати, необхідно зауважити, що встановлено певні залежності між впливом СК на тепло- і солестійкість проростків пшениці та станом системи, причетної до утворення/розпаду пероксидів. Так, СК, підвищуючи стійкість проростків до нагрівання та засолення середовища, зумовлювала прояв ознак «окиснювального спалаху». Це виявлялося у зниженні активності каталази і відповідному підвищенні сумарного вмісту пероксидів у коренях і пагонах дослідного варіанта (див. рисунки 2, 3). Різниця в активності пероксидази між варіантами в часовий період до дії стресових чинників виявлялася лише в коренях і тільки через 1 год після початку обробки СК. У даному випадку активність ферменту в дослідному варіанті тимчасово підвищувалася. Не виключено, що зростання активності пероксидази, як і подальше зниження активності каталази, могло бути причетним до нагромадження пероксидів. Так, відомо, що окремі ізоферменти пероксидази мають оксидазну активність і можуть генерувати H_2O_2 [19]. Отже, перед дією стресових чинників у коренях і пагонах спостерігався підвищений вміст пероксидів, а активність каталази була знижувалася.

Іншою була картина після дії стресових чинників (підвищеної температури або NaCl). Цього разу вміст пероксидів у коренях і пагонах у варіанті з СК був нижчим порівняно з контролем. Активність каталази після стресу, навпаки, у варіанті з СК була вищою, ніж у контролі, особливо у пагонах.

Активність пероксидази після теплового і сольового стресів у коренях проростків, оброблених СК, була вищою, ніж у контролі. Водночас у пагонах після дії стресорів вірогідних відмінностей в активності пероксидази між контролем і варіантом з обробкою СК не спостерігалось.

На підставі одержаних результатів можна припустити, що «окиснювальний сплеск», спричинюваний СК, активує в проростках пшениці захисні механізми, що забезпечують адекватну реакцію на інші стресові чинники — тепловий і сольовий. Однією з таких реакцій є активація антиоксидантних систем [12], що в нашому разі виявлялося у підвищенні активності каталази. Цілком можливо, що СК активує й інші захисні механізми, зокрема синтез стресових білків [1]. Подібні явища, ймовірно, малоспецифічні і можуть виявлятися за дії стресових чинників різної природи. Так, у літературі описані ефекти індукування крос-толерантності рослин до радіації і патогенів за допомогою агентів окиснювального стресу [7]. В наших дослідках СК індукувала стійкість проростків пшениці до теплового і сольового стресів.

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. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиол. раст. — 2003. — 50, № 3. — С. 465—474.
3. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Под ред. Е.Л. Кордюм. — Киев: Наук. думка, 2003. — 279 с.
4. Колупаев Ю.С., Акініна Г.С. Вплив саліцилової кислоти на теплостійкість колеоптилів пшениці у зв'язку зі змінами окиснювального метаболізму // Физиол. и биохим. культ. раст. — 2005. — 37, № 6. — С. 524—529.
5. Часов А.В., Колесников О.П., Минабаева Ф.В., Гордон Л.Х. Монецин и циклогексимид не ингибируют высвобождение пероксидазы и продукцию супероксид-иона в корнях пшеницы при раневом стрессе // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. — 2005. — Вип. 2(7). — С. 29—34.
6. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. — Уфа: Гилем, 2001. — 160 с.
7. Bowler C., Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance // Trends Plant Sci. — 2000. — 5. — P. 241—246.
8. Chen Z., Silva H., Klessing D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. — 1993. — 262, N 12. — P. 1883—1886.
9. 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.
10. 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.
11. Kauss H., Jeblick W. Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. Comparison of ergosterol with other elicitors // Plant Physiol. — 1996. — 111. — P. 755—763.
12. Larkindale J., Knight M.R. Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene and salicylic acid // Plant Physiol. — 2002. — 128. — P. 682—695.

13. Martinez C., Baccou J.-C., Bresson E. et al. Salicylic Acid Mediated by the Oxidative Burst is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of Cotton Challenged by an Avirulent Race of *Xantomonas campestris* pv *malvacearum* // Plant. Physiol. — 2000. — **122**. — P. 757–766.
14. Misha A., Choudhuri M. A. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice // Biol. Plant. — 1999. — **42**. — P. 409–415.
15. Rajasekaran L.R., Stiles A., Caldwell C.D. Stand establishment in processing carrots-effects of various temperature regimes on germination and the role of salicylates in promoting germination at low temperatures // Can. J. Plant Sci. — 2002. — **82**, N 2. — P. 443–450.
16. Ridge I., Osborne D. J. Hydroxyproline and peroxidases in cell wall of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // J. Exp. Bot. — 1970. — **45**. — P. 843–856.
17. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. — 1976. — **57**. — P. 308–309.
18. Sakhabutdinova 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.
19. Shannon L.M. Plant isoenzymes // Annu. Rev. Plant Physiol. — 1986. — **5**. — P. 187–204.
20. Shulaev V., Leon J., Raskin I. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? // Plant Cell. — 1995. — **7**, N 10. — P. 1691–1701.
21. Xie Z., Chen Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells // Plant Physiol. — 1999. — **120**. — P. 217–226.

Рекомендує до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 13.04.2006

Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

ИНДУЦИРОВАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ ТЕПЛО-
И СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ *TRITICUM AESTIVUM* L.
В СВЯЗИ С ИЗМЕНЕНИЯМИ ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ

Изучали влияние салициловой кислоты (СК) на тепло- и солеустойчивость проростков озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. Обработка этилированных проростков повышала их выживание после повреждающего нагрева и солевого (NaCl) стресса. Действие СК вызывало обратимое снижение активности каталазы, повышение активности пероксидазы и накопление пероксидов в корнях и побегах. После нагрева и солевого стресса содержание пероксидов в побегах и корнях проростков, обработанных СК, было ниже, а активность каталазы выше, чем в контроле. Активность пероксидазы после теплового и солевого стрессов в корнях проростков, обработанных СК, была более высокой, чем в контроле, в то время как в побегах таких различий не наблюдалось. Предполагается, что «окислительный всплеск», вызываемый СК, активирует в проростках защитные механизмы, обеспечивающие адекватную реакцию на последующие тепловой и солевой стрессы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Triticum aestivum*, *теплоустойчивость*, *солеустойчивость*, *салициловая кислота*, *пероксидаза*, *каталаза*, *пероксиды*

Yu. Ye. Kolupaev, Yu. V. Karpets

V.V. Dokuchayev Kharkov National Agrarian University

INDUCTION OF THE HEAT- AND SALT RESISTANCE OF *TRITICUM AESTIVUM* L. PLANTLETS BY SALICYLIC ACID IN VIEW OF CHANGES OF THE PROOXIDATIVE-ANTIOXIDATIVE BALANCE

The influence of salicylic acid (SA) on heat- and salt resistance of winter wheat (*Triticum aestivum*) plantlets has been studied. Treatment of bleached-out plantlets raised their surviving the after damage-heating and the influence of salt (NaCl) stress. The treatment by SA caused reversible decrease of catalase activity as activity of peroxidase and accumulation of peroxide compounds both in roots and propagules. After heating and salt stress, the contents of peroxide compounds in plantlets roots and propagules treated with SA was lower, and activity of catalase was higher than those in the control. Activity of peroxidase after heat and salt stresses in plantlets roots treated by SA was higher than in the control. At the same time, in the propagules after the action of stresses there was no difference in activity of peroxidase between the control and SA-processing variant. It is supposed that the «oxidative burst» caused by SA activates in the plantlets protective mechanisms, which provide proper response to the subsequent thermal and salt stresses.

Key words: *Triticum aestivum*, *heat resistance*, *salt resistance*, *salicylic acid*, *peroxidase*, *catalase*, *peroxide compounds*