

УДК 581.1

УЧАСТИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ОКСИДА АЗОТА В ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

© 2012 г. И. Р. Гильванова, А. Р. Еникеев, С. Ю. Степанов, З. Ф. Рахманкулова

Башкирский государственный университет, биологический факультет, Уфа, 450074

Тел.: (3472)272-67-12

e-mail: Zulfirar@mail.ru

Поступила в редакцию 11.01.2011 г.

Изучено влияние салициловой кислоты (СК) и оксида азота (NO) на растения пшеницы *Triticum aestivum* L., подвергнутых воздействию повышенной концентрации соединений меди и цинка. Показано, что тяжелые металлы (ТМ) вызывали снижение ростовых параметров в надземных и подземных частях растений, способствовали резкому ухудшению энергетического баланса и возникновению состояния окислительного стресса. СК и NO оказывали защитный эффект, который выражался в повышении способности к накоплению массы побега и корня растений, стабилизации энергетического баланса и уменьшении перекисного окисления липидов. Выявлено сходство в защитных реакциях растений пшеницы при действии СК и NO, которое проявилось в аналогичном изменении энергетического ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$) и альтернативное дыхание) и антиоксидантного (МДА) баланса исследуемых растений. Это сходство, возможно, свидетельствует об общем сигнальном пути для СК и NO при действии токсических концентраций ТМ.

В последнее время активно изучается действие салициловой кислоты (СК) и оксида азота (NO) на физиологические процессы в растениях. Установлено, что СК и NO – сигнальные молекулы широко распространены в растениях и принимают участие в процессах дыхания, движении устьиц, прорастании семян, росте корня и листьев, созревании плодов, старении. Кроме того, они являются посредниками в сигнальной трансдукции при ответе на биотический и абиотический стресс [1–4]. В случае защитной реакции от патогенов показано их кооперативное действие [2]. Также NO и СК совместно участвуют в регуляции образования этилена при реакции сверхчувствительности [5], движении устьиц [3]. Однако механизмы их взаимодействия в настоящее время не совсем ясны. Известно, что СК активирует синтез NO [6], является посредником между оксидом азота и геномом в NO-синтазной системе растений [7]. В свою очередь, NO вызывает многократное накопление салицилата [8].

Однако есть данные о том, что СК может быть антагонистом NO-сигнального пути [2], ингибитором активности и транскрипции NO-синтазы [9]. В растениях СК, подавляя дыхание и, таким образом, вызывая оксидативный стресс, может активировать NO-нечувствительную альтернативную оксидазу [10].

В клетках растений источником NO являются митохондрии, где одним из процессов его образования является восстановление нитрита цитохромоксидазой (ЦО) и альтернативной оксидазой (АО) [11].

В настоящее время приобретает все большую актуальность изучение последствий загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ). В условиях избытка солей ТМ в растениях возникает состояние окислительного стресса, сопровождающееся образованием активных форм кислорода (АФК) и перекисным окислением липидов (ПОЛ). Установлено, что NO может функционировать как антиоксидант, связывающий АФК, такой, как супероксид-анион радикал, тем самым снижая повреждение клеток [11, 12].

При стрессах разной природы возникает серьезный дисбаланс между процессами образования и ликвидации АФК [13]. Одним из способов «защиты» растений в состоянии окислительного стресса является активация альтернативной оксидазы. В качестве одной из универсальных физиологических функций АО может рассматриваться защита от повреждающего действия АФК

Сокращения: СК – салициловая кислота; ТМ – тяжелые металлы; NO – оксид азота; $\Phi_{\text{ист}}$ – истинный фотосинтез; $D_{\text{сум}}$ – суммарное темновое дыхание; ЦО – цитохромоксидаза; АО – альтернативная оксидаза; АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; H_2O_2 – пероксид водорода; СПУ – системная приобретенная устойчивость; МДА – малоновый диальдегид; НП-Na – нитропруссид натрия; СКГ – салицилгидроксамовая кислота; $\Delta W_{\text{сух}}$ – показатель изменения сухой массы растений пшеницы; $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ – доля дыхательных затрат от истинного фотосинтеза.

(H_2O_2 и $\cdot\text{O}_2$). Так, трансгенные растения табака с низкой экспрессией АО при действии стрессоров накапливали в клетках пероксид водорода и погибали. И, наоборот, гиперэкспрессия альтернативной оксидазы приводила к повышению устойчивости к действию стрессовых факторов и снижению уровня пероксида [14].

В ряде работ приводятся свидетельства протекторной роли салицилата при действии на растения некоторых форм абиотического стресса, в том числе тяжелых металлов [15]. В зависимости от концентрации H_2O_2 в среде СК может вызывать активацию антиоксидантных ферментов, таких, как каталаза [16] и пероксидаза [17], что позволяет говорить о наличии у СК свойства антиоксиданта, которое она, очевидно, реализует при избыточном возрастании уровня АФК. Также следует заметить, что салициловая кислота активирует фермент цианидрезистентного пути – альтернативную оксидазу (АО), которая препятствует накоплению АФК [18].

Таким образом, СК рассматривается в качестве индуктора системной приобретенной устойчивости (СПУ), стимулятора роста растений и модулятора про- и антиоксидантной системы.

В связи с этим изучение участия СК и NO в защитных реакциях растений при воздействии стрессовых факторов, в частности избытка ТМ, представляет большой интерес.

Цель работы – исследование и сравнительный анализ влияния салициловой кислоты и оксида азота на растения пшеницы, подвергнутые воздействию повышенной концентрации соединений тяжелых металлов (медь и цинк).

МЕТОДИКА

Объектом исследования были растения пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Казахстанская 10). Для изучения влияния 0.05 мМ раствора салициловой кислоты применяли предпосевную обработку семян в течение 3 ч. На 4 сут (с момента замачивания семян) в сосудах с растениями, предобработанными салициловой кислотой (опыт) и не подвергавшимися обработке препаратом (контроль), воду заменяли раствором Хогланда–Арнона (0.5 н.) [19]. Для изучения влияния NO в кюветы с растениями (часть растений из контрольного варианта), добавляли 0.5 мМ нитропруссид натрия (НП-Na), который служил источником оксида азота. Растения выращивали при освещении люминесцентными лампами ЛД-20 и лампами накаливания (“УЛЗ”, Россия), освещенность 120 Вт/м², светопериод 16 ч, средняя температура воздуха 24 ± 2°С.

Часть растений, обработанных (СК и NO) и необработанных, подвергалась воздействию повышенной концентрации солей меди и цинка.

Для создания условий высокого содержания меди использовали раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 мМ), а для создания высокого содержания цинка – раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 мМ).

В ходе опытов регистрировали изменение сырой и сухой массы (ΔW). Интенсивность суммарного дыхания ($D_{\text{сум}}$) определяли манометрическим методом на аппарате Варбурга и выражали в мкл O_2 /сут на растение [20]. Истинный фотосинтез ($\Phi_{\text{нет}}$) рассчитывали, как сумму: $\Delta W_{\text{сух.}} + D_{\text{сум}}$ [19].

Ингибиторный анализ проводили на 8–14-суточных растениях. Для подавления работы цитохромоксидазного пути дыхания использовали NaN_3 (2 мМ, pH 4.5). Ингибирование АО проводили с помощью салицилгидроксамовой кислоты (СГК, 15 мМ, pH 4.5). Растворы ингибиторов готовили в фосфатном буфере [21].

Содержание продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [22].

Измерения проводили в 4-кратной биологической и 3-6-кратной аналитической повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие избыточных концентраций ТМ в окружающей среде приводит к различным нарушениям метаболизма растений и, в конечном итоге, отражается на их ростовых характеристиках [23].

В наших экспериментах мы обнаружили, что использованные растворы $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 мМ) и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 мМ) приводят к угнетению роста растений. Так, сухая масса побегов и корней растений, выращенных в присутствии избыточного содержания ионов меди и цинка, снижалась, причем на меди это снижение было более существенным (рис. 1а, 1б).

Предпосевная обработка семян СК благотворно сказалась на накоплении сухой массы корней и побегов растений, выращенных при высоких концентрациях ТМ. Сухая масса корней и побегов возросла на 20.6 и 22.4% соответственно относительно растений, не подвергавшихся обработке СК, но выращенных на избытке ионов меди. Аналогичный эффект СК наблюдали и в случае обработки растений избыточным содержанием ионов цинка. Отмечено увеличение сухой массы корней и побегов на 11 и 9% соответственно относительно растений, не подвергавшихся обработке СК, но выращенных на избытке цинка (рис. 1а, 1б).

Таким образом, СК оказывает протекторное действие на растения пшеницы. Об этом свидетельствует наблюдаемая тенденция к повышению значений морфометрических показателей у растений, выращенных при избытке ТМ и предобработанных СК, по сравнению с растениями, кото-

рые были подвергнуты воздействию ТМ, но не были обработаны салициловой кислотой, что согласуется с данными литературы [15].

На рис. 1в, 1г представлены данные о влиянии оксида азота (источником NO служил нитропруссид натрия (НП-На) (0.5 мМ)) на изменение сухой массы растений пшеницы, выращенных в условиях негативного действия ТМ. Совместное воздействие меди и НП-На приводило к увеличению сухой массы исследуемых растений (побегов – на 36, корней – на 18%). Защитный эффект NO проявлялся также и при воздействии ионов Zn. Совместное действие цинка и НП-На приводило к увеличению сухой массы исследуемых растений (побегов – на 8.5, корней – на 24%) (рис. 1). Полученные нами результаты свидетельствуют о защитной роли NO при ответе растений на воздействие ТМ, что согласуется с данными других авторов, изучавших воздействие различных абиотических стрессоров [1].

Стимулирование ростовых процессов непосредственно связано с изменениями интенсивности фотосинтеза и дыхания. В ходе проведенных экспериментов мы исследовали влияние ТМ на энергетический баланс растения. Для этого были измерены интенсивность фотосинтеза и суммарного темнового дыхания. Полученные данные были использованы для расчета доли дыхательных затрат от истинного фотосинтеза ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$). Данный параметр является показателем физиологического состояния, сбалансированности основных физиологических процессов – фотосинтеза, дыхания, транспорта ассимилятов, роста и т.д. в растениях [24]. Показано, что при выращивании растения в оптимальных условиях данное соотношение достаточно консервативно и видонеспецифично [25]. Известно, что даже небольшое отклонение от стационарных условий выращивания влечет за собой изменение $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$, как правило, в сторону увеличения соотношения, в результате возникновения дополнительных дыхательных затрат на адаптацию растений, возрастания диссипационных процессов или снижения истинного фотосинтеза [24, 25]. В наших экспериментах под влиянием токсических концентраций ТМ мы наблюдали резкое ухудшение энергетического баланса исследуемых растений, которое выражалось в возрастании доли дыхательных затрат от истинного фотосинтеза ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$), на меди в среднем в 2.1 раза и на цинке – в 1.92 раза. Обработка СК и NO приводила к сходной ($r = 0.95$ при $p \leq 0.05$) стабилизации энергетического баланса за счет уменьшения соотношения $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ в среднем в 1.2 раза (рис. 2, таблица).

С чем связаны дополнительные энергетические затраты при воздействии ТМ? Чтобы ответить на этот вопрос мы исследовали с помощью

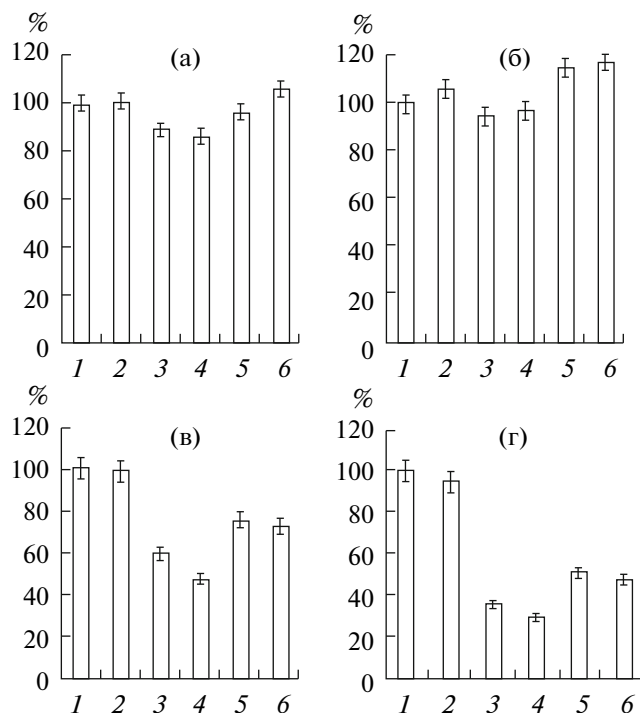


Рис. 1. Влияние СК (а, б) и оксида азота (NO) (в, г) на сухую массу (% от контроля) побегов (а, в) и корней (б, г) растений пшеницы при действии Cu и Zn. 1 – контроль; 2 – СК (а, б), НП-На (в, г); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а, б), Zn + НП-На (в, г); 6 – Cu + СК (а, б), Cu + НП-На (в, г).

ингибиторного анализа изменения в соотношении отдельных путей темнового дыхания: цитохромного, цианидрезистентного и остаточного, что, в свою очередь, позволяет косвенно судить об энергетической эффективности дыхания у обработанных и необработанных растений. Установили, что под воздействием высоких концентраций ТМ существенно возрастали (особенно в корнях) менее эффективные дыхательные затраты, связанные с альтернативным цианидрезистентным путем дыхания. Обработка СК и NO приводила к сходному эффекту – значительному снижению альтернативного дыхания в побегах и корнях растений пшеницы, в среднем на 33.1 и 33.7% соответственно. Исключение составляют побеги растений, выращенные на избытке цинка. В данном случае воздействие указанных соединений приводило к сходному (обработка СК и NO) повышению альтернативного дыхания в 2.1 раза (рис. 3, таблица). Таким образом, если в гетеротрофных тканях (корни) защитный эффект СК и NO проявлялся однотипно и на меди, и на цинке, то в автотрофных тканях (побеги) имели место принципиальные отличия – на меди происходило снижение, на цинке – возрастание альтерна-

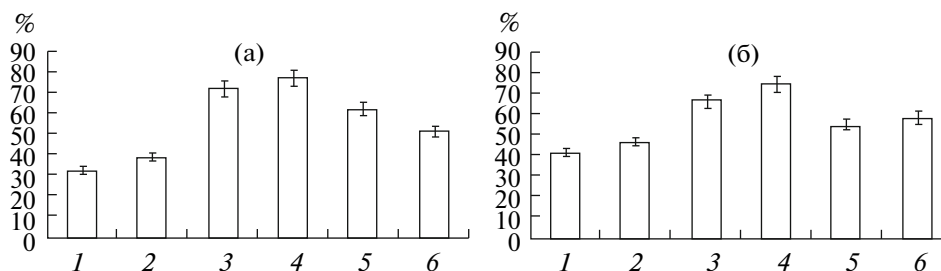


Рис. 2. Влияние СК (а) и оксида азота (NO) (б) на соотношения суммарного дыхания и истинного фотосинтеза у растений пшеницы при действии Cu и Zn.

1 – контроль; 2 – СК (а), НП-Na (б); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а), Zn + НП-Na (б); 6 – Cu + СК (а), Cu + НП-Na (б).

тивного дыхания. Можно предположить, что в данном случае мы имеем дело с разной стратегией в защитных механизмах. В варианте с медью главной целью снижения альтернативного пути в побегах было поддержание энергетического баланса, что приводило к существенному уменьшению соотношения $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ (таблица). В свою очередь, возрастание альтернативных путей дыхания в побегах растений, выращенных на соли цинка, сопровождалось заметным снижением уровня МДА (рис. 4), т.е. функционирование АО способствовало рассеиванию не востребованной энергии и проявляло антиоксидантную функцию [18].

Известно, что ТМ являются мощным индуктором окислительного стресса [26] и образования относительно стабильного продукта перекисного окисления липидов в клетке – малонового диальдегида. Во всех вариантах наших экспериментов в присутствии токсичных концентраций меди и цинка уровень МДА повышался, что связано с возникновением состояния окислительного стресса (рис. 4). СК и NO снижали уровень МДА, способствуя, тем самым, улучшению антиоксидантного баланса в клетках исследуемых растений и уменьшению в них процессов перекисного окисления липидов (таблица).

Сравнительная характеристика защитных реакций салициловой кислоты (СК) и оксида азота (NO) при воздействии избытка меди (Cu) и цинка (Zn)

Параметр	Вариант опыта						
		Cu/СК	Cu/NO	Наблюдаемый физиологический эффект	Zn/СК	Zn/NO	Наблюдаемый физиологический эффект
$D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$		↓ на 31.8%	↓ на 20.6%	Нормализация энергетического баланса	↓ на 12.4%	↓ на 17%	Нормализация энергетического баланса
$\Phi_{\text{ист}}$		не изменяется	↑ на 32.5%	Повышение интенсивности фотосинтеза	↑ на 21%	↑ на 13%	Повышение интенсивности фотосинтеза
АО	побеги	↓ на 33.3%	↓ на 33%	Понижение доли менее энергетически выгодного альтернативного пути дыхания	↑ в 2.75 раза	↑ в 2 раза	Повышение доли менее энергетически выгодного альтернативного пути дыхания
	корни	↓ на 26.3%	↓ на 45.5%		↓ на 30%	↓ на 33%	
МДА	побеги	↓ на 20.2%	↓ на 12%	Улучшение антиоксидантного баланса растений	↓ в 2.1 раза	↓ на 20.5%	Улучшение антиоксидантного баланса растений
	корни	↓ на 37.5%	↓ на 29%		↓ на 4.3%	↓ на 23.7%	

Примечание: ↓ – понижение; ↑ – повышение.

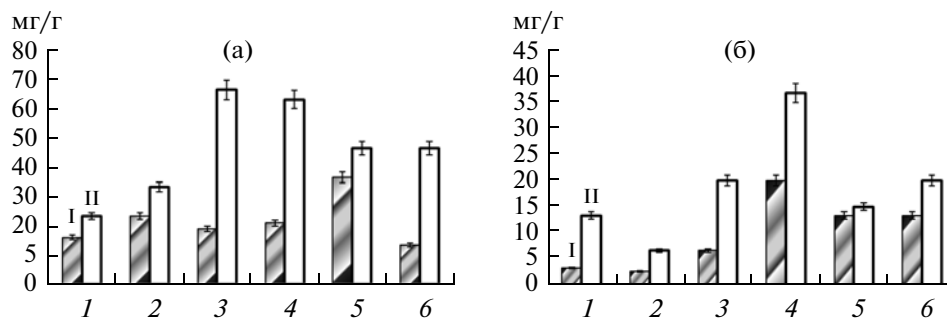


Рис. 3. Влияние СК (а) и оксида азота (NO) (б) на альтернативное цианидрезистентное дыхание (O_2 мг/г сырой массы) побегов (I) и корней (II) растений пшеницы при действии Cu и Zn.

1 – контроль; 2 – СК (а), НП-Na (б); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а), Zn + НП-Na (б); 6 – Cu + СК (а), Cu + НП-Na (б).

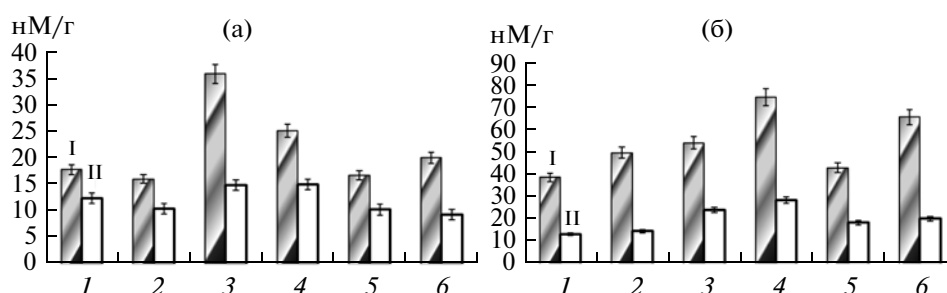


Рис. 4. Влияние СК (а) и оксида азота (NO) (б) на содержание малонового диальдегида (МДА, нМ/г сырой массы) в побегах (I) и корнях (II) растений пшеницы при действии Cu и Zn.

1 – контроль; 2 – СК (а), НП-Na (б); 3 – Zn; 4 – Cu; 5 – Zn + СК (а), Zn + НП-Na (б); 6 – Cu + СК (а), Cu + НП-Na (б).

Установлено, что характер изменения МДА в побегах и корнях растений при воздействии ТМ и в результате защитного действия как СК, так и NO, подобен изменениям $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ ($r = 0.73$ при $p \leq 0.05$). Вероятно, это связано, с одной стороны, с тем, что $D_{\text{сум}}$ и $\Phi_{\text{ист}}$ являются основными продуцентами АФК [11], а при стрессовом нарушении энергетического баланса процесс образования активных свободных радикалов усиливается, и, с другой – возрастание $D_{\text{сум}}$ в целом растении при воздействии ТМ связано с рассеиванием невосстановленной энергии, сопровождающейся образованием АФК. Отсюда следует, что соотношение $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$ (энергетический баланс) косвенно характеризует состояние про- и антиоксидантного баланса.

Итак, выявлено сходство в защитных реакциях растений пшеницы при действии СК и NO, которое проявилось в аналогичном изменении энергетического баланса ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$) ($r = 0.95$ при $p \leq 0.05$), альтернативного дыхания, особенно в корнях ($r = 0.7$ при $p \leq 0.05$) и антиоксидантного баланса (снижение уровня МДА) ($r = 0.6$ при $p \leq 0.05$) исследуемых растений. Это сходство, возможно, свидетельствует об общем сигнальном

пути для СК и NO при действии токсических концентраций данных ТМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Magalhaes J.R., Pedrosa M.C., Durzan D.J. // *Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 5. 1999. P. 115–125.
2. Klessing D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J.M., Shan J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 97. № 16. P. 8849–8855.
3. Liu X., Zhang S., Lou C. // *Chinese Sci. Bull.* 2003. V. 48. № 5. P. 449–452.
4. Janda T., Horvath E., Szalai G., Paldi E. // *Salicylic Acid – a Plant Hormone* / Eds. S. Hayat, A. Ahmad. Dordrecht: Springer, 2007. P. 91–150.
5. Mur L.A.J., Laarhoven L.J.J., Harren F.J.M., Hall M.A., Smith A.R. // *Plant Physiology Preview.* 2008. V. 148. № 3. P. 1537–1546.
6. Zottini M., Costa A., Michele R., Ruzzene M., Carimi F., Schiavo F. // *J. Exp. Botany.* 2007. V. 58. № 6. P. 1397–1405.
7. Kumar D., Klessing D.F. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000. V. 13. № 3. P. 347–351.
8. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

9. Farivar R.S., Brecher P. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 49. P. 31585–31592.
10. Millar A.H., Day D.A. // Trends Plant Sci. 1997. V. 2. № 8. P. 289–290.
11. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие. М.: КДУ, 2007. 140 с.
12. Delledone M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 23. P. 13454–13459.
13. Foyer C.H., Noctor G. // Plant Cell. 2005. V. 17. № 7. P. 1866–1875.
14. Robson C.A., Vanlerberghe G.C. // Plant Physiol. 2002. V. 129. № 4. P. 1908–1920.
15. Mishra A., Choudhuri M.A. // Biol. Plant. 1999. V. 42. № 3. P. 409–415.
16. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. // Science. 1993. V. 262. № 12. P. 1883–1886.
17. Janda T., Szalai G., Tari I. // Planta. 1999. V. 208. № 2. P. 175–180.
18. Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 14. P. 8271–8276.
19. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 595 с.
20. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. // Большой практикум по физиологии растений / Ред. Б.А. Рубин. М.: Высшая школа, 1975. С. 251.
21. Головки Т.К. // Ботан. журн. 1983. Т. 68. № 6. С. 779–788.
22. Heath R.L., Packer L. // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. № 1. P. 189–198.
23. Демидчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М. // Усп. соврем. биол. 2001. Т. 121. № 5. С. 511–525.
24. Рахманкулова З.Ф. // Ж. общ. биол. 2002. Т. 63. № 3. С. 239–248.
25. Hurry V., Igamberdiev A.U., Keerbergh J., Parnik T., Atkin O., Zaragoza-Castells J., Gardstrom P. // Plant Respiration / Eds. H. Lambers, M. Ribas-Carbo. Berlin: Springer-Verlag, 2005. P. 43–61.
26. Foyer C.H., Noctor G. // Antioxidants and Redox Signaling / Eds. B. Buchanan, K.-J. Dietz, T. Pfannschmidt. 2009. V. 11. № 4. P. 851–890.

Involvement of Salicylic Acid and Nitric Oxide in Protective Reactions of Wheat under the Influence of Heavy Metals

I. R. Gil'vanova, A. R. Enikeev, S. Yu. Stepanov, and Z. F. Rakhmankulova

Department of Biology, Bashkir State University, Ufa, 450074 Russia

Tel: (3472) 272-67-12

e-mail: Zulfirar@mail.ru

Received January 11, 2011

Abstract—This article studies the effect of salicylic acid (SA) and nitric oxide (NO) on *Triticum aestivum* L. wheat plants exposed to the influence of high concentrations of copper and zinc compounds. It is shown that heavy metals (HMs) caused a decrease in the growth parameters in the overground and underground plant parts and contributed to a sharp deterioration in the energy balance and the situation regarding oxidative stress. SA and NO exerted a protective effect, which was expressed in the increased ability to accumulate shoot and root mass, stabilize the energy balance, and reduced lipid peroxidation.