

УДК 577.15:581.1

ИНДУКЦИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ САЛИЦИЛОВОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТАМИ: СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ С ОБРАЗОВАНИЕМ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2012 г. Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястреб, Н. В. Швиденко, Ю. В. Карпец

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков 62483, Украина

e-mail: plant_biology@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2011 г.

Изучено влияние салициловой и янтарной кислот (**СК** и **ЯК**) на генерацию активных форм кислорода (**АФК**) колеоптилями пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их устойчивость к повреждающему нагреву. Обработка колеоптилей **СК** и **ЯК** в концентрации 10 мкМ приводила к усилению образования супероксидного анион-радикала и накоплению в них пероксида водорода. Данный эффект частично подавлялся как ингибитором НАДФ-Н-оксидазы α -нафтолом, так и ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой. Под влиянием **СК** и **ЯК** повышались активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и растворимой пероксидазы, а также и теплоустойчивость колеоптилей. Антиоксидант ионол, ингибиторы НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы существенно снижали положительное влияние **СК** и **ЯК** на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы. Сделано заключение, что посредниками в индуцировании теплоустойчивости при обработке колеоптилей **СК** и **ЯК** являются **АФК**, усиление образования которых может быть обусловлено повышением активности НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы.

Салициловая кислота (**СК**) в настоящее время рассматривается как один из стрессовых фитогормонов, участвующих в формировании защитных реакций растений. Особенно детально исследуется роль **СК** в развитии иммунитета растений при действии патогенов [1, 2]. Показано участие **СК** и в бобово-ризобиальном симбиозе [3]. Увеличение содержания эндогенной **СК** у растений зарегистрировано также в ответ на действие абиотических стрессоров – гипертермии [4], ультрафиолета [5], тяжелых металлов [6]. В пользу представлений об участии **СК** в формировании устойчивости растений к абиотическим факторам свидетельствуют и данные об индуцировании их резистентности под влиянием экзогенной **СК** [7–9].

Считается, что, по крайней мере, часть физиологических эффектов **СК** связана с ее способностью вызывать усиление генерации активных форм кислорода (**АФК**), в частности пероксида водорода [3, 10]. Следствием транзиторного увеличения содержания H_2O_2 , выполняющего роль сигнальной молекулы, может быть как активация процессов, направленных на уничтожение патогенов (окислительный взрыв, синтез PR-белков и др.) [11], так и повышение активности антиоксидантных ферментов, накопление полифункциональных низкомолекулярных протекторов, что важно для формирования устойчивости растений к абиотическим стрессорам [9, 12].

Одной из основных причин накопления пероксида водорода в растительных тканях под влиянием **СК** считается ингибирование каталазы (**КФ** 1.11.1.6) [13]. В то же время для многих видов растений характерно лишь незначительное угнетение этого фермента **СК** в физиологических концентрациях [14, 15]. Увеличение содержания пероксида водорода в растительных тканях под влиянием **СК** может быть и следствием повышения активности супероксиддисмутазы (**СОД**, **КФ** 1.15.1.1) [14]. Также усилению образования H_2O_2 под действием **СК** может способствовать генерация супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), обусловленная увеличением активности НАДФ-Н-оксидазы (**КФ** 1.6.3.1) [16] и отдельных форм пероксидазы (**КФ** 1.11.1.7) [17].

Некоторые физиологические реакции, характерные для **СК** (например, усиление генерации супероксидного анион-радикала и синтеза ряда белков), могут быть вызваны и действием на растения кислот цикла Кребса, в частности янтарной кислоты (**ЯК**) [18, 19]. Последняя обладает способностью повышать устойчивость растений к ряду неблагоприятных факторов [20] и рассматривается некоторыми авторами как миметик **СК** [18]. Так, показано сходное (ингибирующее) влияние **СК** и **ЯК** на каталазу клубней картофеля в системе *in vitro* [21]. В то же время исследований, в которых бы на одном и том же объекте сравни-

валось действие СК и ЯК на конкретные ферментные системы, участвующие в генерации и обезвреживании АФК, пока недостаточно.

Несмотря на применение обеих кислот в практике растениеводства, механизмы их влияния на устойчивость растений к абиотическим стрессорам изучены недостаточно полно. Менее исследованы в этом отношении реакции, индуцируемые экзогенной ЯК.

Цель работы – сравнение влияния СК и ЯК на генерацию растительными клетками $O_2^{\cdot-}$ и пероксида водорода, установление ферментных систем, участвующих в увеличении количества АФК, а также выяснение возможной связи между способностью изучаемых кислот вызывать окислительный стресс и индуцированием ими устойчивости растений к абиотическому стрессу (гипертермии).

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили отрезки колеоптилей, отделенные от четырехсуточных этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, которые являются модельным объектом, чувствительным к действию экзогенных фитогормонов и гормоноподобных соединений, в т. ч. СК. Как было установлено нами ранее, колеоптиль пшеницы реагировала на обработку экзогенной СК быстрым увеличением активности СОД и содержания пероксида водорода, а также повышением теплоустойчивости [22].

Подготовка растительного материала описана в предыдущих работах [9, 22]. После отделения от проростков колеоптиль инкубировали в чашках Петри на 2%-ном растворе сахарозы в течение 14–16 ч, затем отрезки опытных вариантов выдерживали в течение 2 ч в растворах СК (10 мкМ), ЯК (10 мкМ) или их комбинации. Для выяснения механизмов действия СК и ЯК колеоптиль соответствующих вариантов обрабатывали антиоксидантом ионолом (5 мкМ), ингибиторами НАДФ-Н-оксидазы – α -нафтолом (1 мкМ) [23] и пероксидазы – салицилгидроксамовой кислотой (СГК, 500 мкМ) [24]. Концентрации эффекторов выбирали на основании предварительных опытов. В вариантах с комбинированной обработкой указанные соединения добавляли в основную среду инкубации колеоптилей (2%-ный простерилизованный раствор сахарозы) за 1 ч до введения в нее СК или ЯК. Колеоптиль контрольных вариантов инкубировали в 2%-ной сахарозе.

После окончания инкубации колеоптилей в растворах исследуемых эффекторов часть отрезков из каждого варианта подвергали потенциально летальному нагреву в водном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при температуре $43 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, а затем поме-

щали в чашки Петри с 2%-ным раствором сахарозы. Через 3 сут после нагрева оценивали повреждения колеоптилей по появлению специфического буроватого оттенка и потере тургора. В это же время оценивали состояние колеоптилей, которые не подвергались нагреву. Во всех вариантах опытов, независимо от природы добавляемых в среду эффекторов, выживание не подвергнутых нагреву колеоптилей составляло не менее 95%.

После окончания обработки колеоптилей исследуемыми соединениями определяли интенсивность генерации супероксидного анион-радикала, содержание пероксида водорода, активность пероксидазы, СОД и каталазы. Активность антиоксидантных ферментов также анализировали через 1 и 24 ч после нагрева колеоптилей.

Генерацию супероксидных анион-радикалов интактными отрезками колеоптилей во внешний раствор определяли по восстановлению нитротетразолия синего [25]. По 15 колеоптилей помещали в пробирки с 5 мл 0.1 М К,Na-фосфатного буфера (рН 7.6), содержащего 0.05% нитротетразолия синего, 10 мкМ ЭДТА, 0.1% тритона X-100. Пробы выдерживали на шейкере-качалке при 120 об/мин в течение 1 ч, после чего оптическую плотность инкубационного раствора измеряли при длине волны 530 нм. Для проверки специфичности генерации $O_2^{\cdot-}$ в специальных опытах в пробы добавляли СОД (50 ед./мл), которая ингибировала генерацию супероксидного анион-радикала не менее чем на 90%. В связи с этим считали, что количество восстановленного нитротетразолия синего определяется содержанием $O_2^{\cdot-}$.

Содержание пероксида водорода определяли по образованию комплекса с ксиленоловым оранжевым [26]. Перед анализом реактив готовили смешиванием 1 мл 25 мМ раствора соли Мора в 2.5 М серной кислоте со 100 мл 125 мМ раствора ксиленолового оранжевого в 100 мМ сорбитоле. Для определения содержания H_2O_2 навеску колеоптилей растирали на льду в 0.025 мМ Na-фосфатном буфере, рН 6.2, гомогенат центрифугировали 10 мин при 8000 g, супернатант добавляли к 10-кратному объему указанного реактива и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После центрифугирования при 8000 g в течение 10 мин определяли оптическую плотность раствора при длине волны 560 нм.

Активность растворимой пероксидазы определяли по методу [27] с незначительными модификациями. Колеоптиль гомогенизировали на холоде в 0.06 М К,Na-фосфатном буфере, рН 6.2, гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g и в супернатанте определяли активность фермента. В качестве субстрата использовали пероксид водорода, а в качестве донора водорода – гваякол.

Образование активных форм кислорода в колеоптилях пшеницы после обработки эффекторами, выживание после повреждающего нагрева (43°C, 10 мин)

Вариант опыта	Генерация супероксидного анион-радикала, % к контролю	Содержание пероксида водорода, мкмоль/г сухого вещества	Выживаемость, %
Контроль	100.0 ± 4.1	0.70 ± 0.02	47.6 ± 1.9
Салициловая кислота (10 мкМ)	134.3 ± 5.4	0.99 ± 0.04	71.6 ± 2.7
Янтарная кислота (10 мкМ)	130.8 ± 4.9	0.95 ± 0.04	67.2 ± 3.3
Салициловая кислота (10 мкМ) + янтарная кислота (10 мкМ)	136.3 ± 4.4	1.02 ± 0.04	65.4 ± 3.7
Ионол (5 мкМ)	87.6 ± 3.7	0.58 ± 0.03	42.6 ± 2.9
Салициловая кислота (10 мкМ) + ионол (5 мкМ)	89.2 ± 4.1	0.54 ± 0.06	46.6 ± 3.0
Янтарная кислота (10 мкМ) + ионол (5 мкМ)	86.4 ± 4.7	0.68 ± 0.07	47.7 ± 2.8
α-нафтол (1 мкМ)	95.6 ± 3.9	0.72 ± 0.05	43.7 ± 3.1
Салициловая кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ)	108.7 ± 3.6	0.74 ± 0.04	60.5 ± 2.6
Янтарная кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ)	111.3 ± 3.8	0.77 ± 0.06	58.1 ± 2.8
Салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	92.6 ± 2.8	0.66 ± 0.03	46.1 ± 2.3
Салициловая кислота (10 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	113.5 ± 6.2	0.69 ± 0.05	55.2 ± 3.5
Янтарная кислота (10 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	108.4 ± 4.8	0.74 ± 0.04	49.4 ± 3.3
α-нафтол (1 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	83.2 ± 5.1	0.51 ± 0.06	37.9 ± 3.8
Салициловая кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	91.1 ± 6.9	0.52 ± 0.08	37.2 ± 5.0
Янтарная кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	100.6 ± 5.6	0.59 ± 0.06	41.4 ± 3.7

Активность внеклеточной пероксидазы определяли в инкубационном растворе после 1 ч выдерживания на шейкере-качалке при 120 об./мин 10 отрезков колеоптилей в пробирках с 5 мл 0.1 М К₂Na-фосфатного буфера, pH 6.2, с добавлением 0.1%-ного тритона X-100, также используя в качестве субстрата H₂O₂, а восстановителя гваякол.

Для определения активности СОД ткани колеоптилей гомогенизировали на холоде в 0.15 М К₂Na-фосфатном буфере, pH 7.6, с добавлением детергента тритона X-100 (конечная концентрация 0.1%). Для анализа использовали надосадочную жидкость после центрифугирования гомогената при 8000 g. Активность СОД определяли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитротетразолием синим за супероксидные анионы, образующиеся

вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата [22].

Активность каталазы определяли по количеству разложившегося пероксида водорода, экстрагируя фермент 0.1 М трис-HCl буфером, pH 7.4 [22].

Биологические эксперименты проводили в трех- или четырехкратной повторности и воспроизводили независимо не менее трех раз. На рисунках и в таблице представлены средние значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка колеоптилей пшеницы растворами СК и ЯК существенно повышала их выживаемость после повреждающего нагревания (таблица), т.е. вызывала эффект преадаптации к тепло-

вому стрессу. В то же время при совместной обработке колеоптилей СК и ЯК их выживание после теплового стресса достоверно не отличалось от значений, наблюдавшихся в вариантах с использованием каждой кислоты в отдельности. Иными словами, заметных эффектов синергизма, аддитивности либо антагонизма при совместном действии СК и ЯК на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы не проявлялось.

После двухчасового воздействия на колеоптили обеих органических кислот отмечалось усиление генерации ими супероксидного анион-радикала и увеличение содержания в них пероксида водорода (таблица). При этом совместное действие двух кислот на колеоптили существенно не отличалось от эффектов, вызываемых каждой кислотой в отдельности.

Для установления возможного значения АФК в индуцировании теплоустойчивости колеоптилей под действием СК и ЯК, а также ферментных источников образования O_2^- и H_2O_2 исследовали комбинированное действие органических кислот с антиоксидантом ионолом и ингибитором НАДФ-Н-оксидазы (α -нафтолом) и пероксидазы (СГК). В использованных концентрациях указанные соединения сами по себе либо не оказывали существенного влияния на образование O_2^- и содержание пероксида водорода в колеоптилях пшеницы, либо вызывали их снижение (таблица).

Предобработка колеоптилей антиоксидантом ионолом полностью снимала усиление образования АФК, вызываемое действием СК и ЯК. Предварительное воздействие α -нафтола и СГК также значительно уменьшало эффект увеличения генерации супероксидного радикала и содержания пероксида водорода, обусловленный действием на колеоптили органических кислот. При этом ингибирующее влияние СГК на накопление H_2O_2 было более существенным по сравнению с действием α -нафтола (таблица).

При совместном действии двух ингибиторов прооксидантных ферментов (α -нафтола и СГК) их эффекты, по крайней мере частично, суммировались и усиление образования супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в колеоптилях, вызываемое СК и ЯК, подавлялось полностью (таблица).

Если допустить, что действие используемых ингибиторов ферментов в условиях наших экспериментов достаточно специфично (α -нафтол ингибирует НАДФ-Н-оксидазу, а СГК пероксидазу), то можно предположить, что СК и ЯК усиливают генерацию АФК в колеоптилях, влияя на оба их ферментных источника.

В пользу предположения об участии пероксидазы в генерации АФК, индуцированной дей-

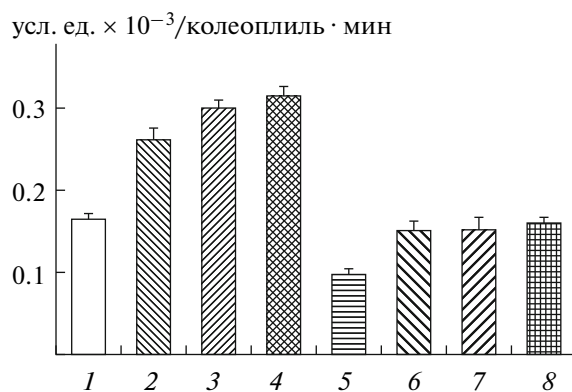


Рис. 1. Активность внеклеточной пероксидазы колеоптилей пшеницы.

1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – ЯК (10 мкМ); 4 – СК (10 мкМ) + ЯК (10 мкМ); 5 – СГК (500 мкМ); 6 – СК (10 мкМ) + СГК (500 мкМ); 7 – ЯК (10 мкМ) + СГК (500 мкМ); 8 – α -нафтол (1 мкМ).

ствием на колеоптили СК и ЯК, свидетельствуют и результаты непосредственного определения активности апопластной формы этого фермента. СК и ЯК вызывали увеличение активности внеклеточной пероксидазы колеоптилей (рис. 1). При совместном действии обеих кислот на колеоптили суммирования их влияния на активность внеклеточной пероксидазы не наблюдалось. Обработка колеоптилей СГК приводила к снижению активности апопластной пероксидазы почти в два раза и снятию эффекта повышения активности этой формы фермента под действием СК и ЯК. В то же время α -нафтол, используемый нами как ингибитор НАДФ-Н-оксидазы, не оказывал заметного влияния на активность пероксидазы (рис. 1). В связи с этим частичное снятие α -нафтолом эффекта усиления генерации АФК колеоптилями пшеницы, вызываемого их обработкой СК и ЯК, можно рассматривать как аргумент в пользу предположения об участии НАДФ-Н-оксидазы в данном процессе.

Как уже отмечалось, увеличение содержания АФК в клетках колеоптилей, происходящее под влиянием СК и ЯК, может быть обусловлено не только повышением активности АФК-генерирующих ферментов (НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы), но и модификацией активности антиоксидантных ферментов, в т.ч. СОД и каталазы [13, 14].

В наших экспериментах предобработка колеоптилей СК вызывала увеличение активности СОД в колеоптилях более чем в 1.5 раза (рис. 2). Эффект ЯК был не столь существенным, но вполне достоверным. В то же время активность каталазы в физиологически нормальных условиях (до воздействия гипертермии) под влиянием СК и ЯК в колеоптилях пшеницы существенно не изменялась (рис. 2). Следует отметить, что ранее в

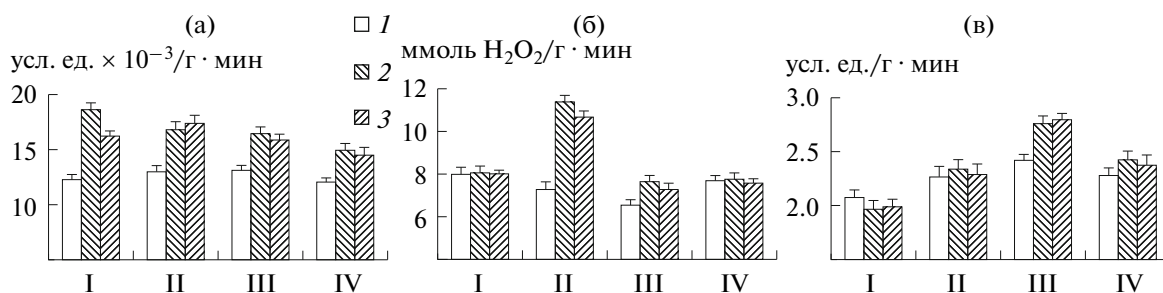


Рис. 2. Влияние обработки колеоптилей пшеницы СК и ЯК на активность СОД (а), каталазы (б) и пероксидазы (в). I – сразу после двухчасовой обработки СК или ЯК; II и III – через 1 и 24 ч после повреждающего нагрева соответственно; IV – через 24 ч после обработки СК и ЯК без последующего повреждающего нагрева. 1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – ЯК (10 мкМ).

опытах с колеоптилями пшеницы другого сорта (Донецкая 48) нами было выявлено заметное повышение активности СОД и относительно небольшое ингибирование каталазы (приблизительно на 20%) под действием СК [22]. По-видимому, ингибирование каталазы действием СК и, возможно, ЯК зависит от изоферментного состава и, следовательно, может быть сортоспецифичным. Сортоспецифичное действие СК на каталазу показано другими авторами на примере растений кукурузы [28]. В целом же можно полагать, что каталаза колеоптилей пшеницы менее чувствительна к действию СК и ЯК по сравнению каталазой ряда других видов растений [21, 28].

Активность внутриклеточной растворимой формы пероксидазы, которая рассматривается как антиоксидантный фермент [29], до воздействия повреждающего нагрева в вариантах с обработкой колеоптилей СК и ЯК не изменялась (рис. 2).

Обработка колеоптилей α -нафтолом и СГК не оказывала достоверного влияния на активность СОД и каталазы (результаты не приводятся), что позволяет говорить, по крайней мере, об относительной специфичности этих ингибиторов ферментов. Более того, СГК, используемая нами как ингибитор пероксидазы, как уже упоминалось, существенно угнетала апопластную форму фермента (рис. 1), но при этом снижала активность растворимой (внутриклеточной) пероксидазы не более чем на 10% (результаты не приводятся).

Таким образом, увеличение генерации АФК колеоптилями пшеницы под влиянием СК и ЯК может быть связано с повышением активности супероксид-генерирующих ферментов, локализованных в апопласте и (или) плазмалемме – НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы. К наблюдаемому в наших экспериментах увеличению содержания пероксида водорода в колеоптилях под влиянием СК и ЯК также, по-видимому, причастна СОД, активность которой заметно повышалась (рис. 2).

Если предположить, что АФК (O_2^- и H_2O_2) являются посредниками в индуцировании СК и ЯК

защитных реакций, обуславливающих рост теплоустойчивости колеоптилей, то угнетение их образования должно отразиться на этом показателе. Ионол, нейтрализующий радикальные АФК, сам по себе достоверно не влиял на теплоустойчивость колеоптилей, но полностью снимал эффект ее повышения, обусловленный действием СК и ЯК (таблица). СГК и α -нафтол, нивелирующие эффект увеличения генерации АФК, вызываемый СК и ЯК, частично снимали и повышение теплоустойчивости колеоптилей, индуцируемое этими органическими кислотами. Наименьшую устойчивость к нагреву имели колеоптили, обработанные одновременно двумя ингибиторами ферментов, являющихся источниками АФК. При комбинированном действии ингибиторов НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы как с СК, так и с ЯК, выживание колеоптилей после нагрева также было низким.

Одной из защитных реакций, индуцируемых СК и ЯК при посредничестве АФК, может быть повышение активности антиоксидантных ферментов в колеоптилях пшеницы. Как уже отмечалось, обработка колеоптилей обеими органическими кислотами не влияла на активность каталазы и растворимых форм пероксидазы, но вызывала существенное повышение активности СОД. Через 1 ч после стрессового воздействия (повреждающего нагрева) активность СОД и каталазы в колеоптилях, предобработанных СК и ЯК, была достоверно выше, чем в соответствующих контрольных (рис. 2). Более высокий по сравнению с контролем уровень активности этих ферментов в колеоптилях опытных вариантов отмечался и через 24 ч после нагрева. Кроме того, через 24 ч после нагрева происходило повышение активности растворимой пероксидазы в колеоптилях, при этом в опытных вариантах оно было более существенным. В колеоптилях, которые не подвергались нагреву, различия в активности СОД и каталазы на этой фазе эксперимента были незначительными, а активность растворимой пероксидазы в колеоптилях, обработанных

СК и ЯК, превышала значения соответствующего контроля (рис. 2).

Таким образом, в настоящей работе показано повышение теплоустойчивости колеоптилей пшеницы под воздействием экзогенных СК и ЯК. Важными посредниками в реализации физиологических эффектов этих органических кислот, по-видимому, являются АФК.

Следует заметить, что в литературе на основании данных, полученных на различных растительных объектах, обсуждается вклад ряда ферментов в усиление генерации АФК, наблюдавшееся под влиянием СК. На культуре клеток проса показан значительный вклад НАДФ·Н-оксидазы в генерацию супероксида и пероксида водорода и меньшая роль пероксидаз [16]. В то же время на изолированных корнях пшеницы [19] получены данные о преимущественном вкладе супероксид-генерирующих форм пероксидазы в реализацию эффектов СК. У растений арабидопсиса зарегистрировано значительное СК-индуцируемое увеличение содержания пероксида водорода на фоне повышения активности СОД [14].

На основании результатов ингибиторного анализа можно полагать, что в колеоптилях пшеницы ферментативными источниками образования АФК, стимулируемого СК и ЯК, являются НАДФ·Н-оксидаза и апопластная пероксидаза, поскольку ингибиторы этих ферментов (α -нафтол и СГК) частично нивелировали усиление образования АФК и повышение теплоустойчивости колеоптилей (таблица). Одной из причин увеличения продукции супероксидного анион-радикала с участием пероксидазы может быть активация выхода отдельных молекулярных форм этого фермента в апопласт [30]. Наблюдаемое в наших экспериментах повышение содержания пероксида водорода в колеоптилях, обработанных СК и ЯК, в какой-то степени может быть обусловлено и увеличением активности СОД (рис. 2). В целом же, для выяснения механизмов влияния исследуемых органических кислот на активность ферментов, продуцирующих АФК, необходимы специальные исследования.

Следует также отметить, что исследуемые в нашей работе физиологические эффекты СК и ЯК на колеоптили пшеницы были очень похожими, что в целом согласуется с гипотезой о действии ЯК как миметика СК, обусловленном сходным расположением гидроксильных групп по отношению к гидрофобному блоку у молекул обеих кислот [18]. Косвенно на сходство механизмов действия СК и ЯК на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы указывает отсутствие эффектов как синергизма, так и антагонизма при совместном применении этих органических кислот (таблица). В то же время необходимо учитывать, что данных о физиологических эффектах

ЯК, в частности об ее влиянии на активность АФК-генерирующих и антиоксидантных ферментов, накоплено пока мало и они неоднозначны. Так, на основании полученных нами результатов вряд ли можно сделать предположение о вкладе модификации активности каталазы в реализацию эффектов ЯК, поскольку под ее влиянием активность этого фермента в колеоптилях, не подвергнутых нагреву, не изменялась (рис. 2). Тем не менее, на примере двудольных показано существенное ингибирование каталазы физиологическими концентрациями ЯК и СК [21]. В литературе имеются данные об увеличении активности внеклеточных пероксидаз корней пшеницы под влиянием ЯК [19], однако в этой работе использовались достаточно высокие (миллимолярные) концентрации ЯК, эффекты которых могут отличаться от действия физиологических концентраций.

В целом, можно высказать предположение о том, что антистрессовые эффекты ЯК при ее использовании в низких концентрациях могут быть связаны с модификацией ферментов, локализованных на клеточной поверхности и участвующих в образовании АФК (НАДФ·Н-оксидаза, пероксидаза). Их активация может приводить к формированию и передаче в генетический аппарат сигнала, индуцирующего неспецифические защитные реакции, например усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов [9]. В этом отношении физиологические эффекты СК и ЯК могут быть достаточно близкими. Однако для подтверждения данного предположения необходимы детальные исследования действия различных органических кислот (алифатических и ароматических) на окислительно-восстановительный баланс и конкретные физиологические реакции, важные для устойчивости растений к определенным стрессорам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
2. Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 263–275.
3. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. № 3. С. 300–305.
4. Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W., Zhao W., Schiller K.C., Gatzke N., Sung D.Y., Guy C.L. // Plant Physiol. 2004. V. 136. № 4. P. 4159–4168.
5. Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., Metraux J.P. // FEBS Lett. 2008. V. 582. № 4. P. 473–478.
6. Rodriguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Zabalza A., Corpas F.J., Gimez M., Del Rio L.A., Sandalio L.M. // Plant Cell Environ. 2006. V. 29. № 8. P. 1532–1544.

7. Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 579–583.
8. Wang L.J., Li S.H. // Plant Sci. 2006. V. 170. № 4. P. 685–694.
9. Колупаев Ю.Е., Карнец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 352 с.
10. Janda T., Szalai G., Tari I., Paldi E. // Planta. 1999. V. 208. № 2. P. 175–180.
11. Wendehenne D., Durner J., Chen Z., Klessing D.F. // Phytochemistry. 1998. V. 47. № 4. P. 651–657.
12. Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H., Weng F.H., Zhan J.C., Liu Y., Wan S.B., Liu Y.Y. // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. № 4. P. 405–416.
13. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. // Science. 1993. V. 262. № 5141. P. 1883–1886.
14. Rao M.V., Paliyaht G., Ormrod D.P., Murr D.P., Watkins C.B. // Plant Physiol. 1997. V. 115. № 1. P. 137–149.
15. Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 557–563.
16. Geetha H.M., Shetty H.S. // Plant Sci. 2002. V. 163. № 3. P. 653–660.
17. Mika A., Boenisch M.J., Hopff D., Luthje S. // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. № 3. P. 831–841.
18. Тарчевский И.А., Максютлова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 23–28.
19. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. // Protoplasma. 2001. V. 217. № 1–2. P. 125–128.
20. Андрианова Ю.Е., Сафина Н.И., Максютлова Н.Н., Кадошников И.Г. // Агрохимия. 1996. № 8–9. С. 118–123.
21. Панина Я.С., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Докл. РАН. 2004. Т. 397. № 1. С. 131–133.
22. Колупаев Ю.Е. // Укр. ботан. журн. 2007. Т. 64. № 2. С. 270–278.
23. Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. // Physiol. Plant. 2006. V. 127. № 2. P. 293–303.
24. Mori I.C., Pinontoan R., Kawano T., Muto S. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. № 12. P. 1383–1388.
25. Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 12. С. 1612–1618.
26. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. // New Phytologist. 2001. V. 151. № 1. P. 185–194.
27. Ridge I., Osborne D.J. // J. Exp. Bot. 1970. V. 21. № 4. P. 843–856.
28. Horvath E., Janda T., Szalai G., Paldi E. // Plant Sci. 2002. V. 163. № 6. P. 1129–1135.
29. Ivanov S., Konstantinova T., Parvanova D., Todorova D., Djilianov D., Alexieva V. // Докл. Българ. АН. 2001. V. 54. № 7. P. 71–74.
30. Minibayeva F., Mika A., Lūthje S. // Protoplasma. 2003. V. 221. № 1–2. P. 67–72.

Induction of Heat Resistance in Wheat Coleoptiles by Salicylic and Succinic Acids: Connection of the Effect with the Generation and Neutralization of Active Oxygen Forms

Yu. E. Kolupaev, T. O. Yastreb, N. V. Shvidenko, and Yu. V. Karpets

Dokuchaev Kharkov National Agrarian University, Kharkov, 62483 Ukraine

e-mail: plant_biology@mail.ru

Received November 11, 2011

Abstract—The influence of salicylic (SaA) and succinic (SuA) acids on the generation of active oxygen forms (AOFs) and the heat resistance of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles has been studied. The treatment of coleoptiles with 10 μ M SaA or SuA results in the accumulation of hydrogen peroxide and enhanced formation of a superoxide anion radical. This effect is partially suppressed by both α -naphthol (the NADPH oxidase inhibitor) and salicylhydroxamic acid (peroxidase inhibitor). SaA and SuA cause an increase in the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and soluble peroxidase, and improve the heat resistance of coleoptiles. Antioxidant ionol and compounds, which inhibit the NADPH oxidase and peroxidase, significantly reduce the positive influence of SaA and SuA on the heat resistance of wheat coleoptiles. AOFs are considered to be intermediates for heat resistance induction in coleoptiles, treated with SaA and SuA; enhanced AOF generation can be caused by an increased activity of the NADPH oxidase and peroxidase.