

УДК 577.15:581.1

А. А. ВАЙНЕР¹, Ю. Е. КОЛУПАЕВ¹, Т. О. ЯСТРЕБ¹, член-корреспондент В. А. ХРИПАЧ²**ИНДУЦИРОВАНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДОМ
ПРОРОСТКОВ ПРОСА (*PANICUM MILIACEUM*)
С УЧАСТИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**¹Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Украина²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Поступило 19.05.2014

Брассиностероиды (БС) в настоящее время рассматриваются как фитогормоны, задействованные в адаптации растений к стресс-факторам различной природы, в т. ч. к засолению [1; 2]. Установлено, что растения арабидопсиса *det2*, отличающиеся пониженным эндогенным содержанием БС, характеризуются более высокой чувствительностью к действию засоления по сравнению с растениями дикого типа [3]. На крестоцветных, бобовых и злаковых зарегистрировано положительное влияние экзогенных БС на солеустойчивость [4–6]. В ряде работ показано повышение активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, гваяколпероксидазы и других антиоксидантных ферментов при индуцировании БС устойчивости растений к засолению [6; 7]. При этом, однако, отмечается наличие видовых и сортовых различий в реакции растений на БС [6].

В последние годы получен значительный объем сведений о механизмах передачи сигнала БС в генетический аппарат растительных клеток, установлена природа рецептора БС, который является рецепторной киназой BRI1, содержащей лигандный, трансмембранный и протеинкиназный домены [8]. Присоединение БС к внеклеточной области рецептора BRI1 вызывает авто- и трансфосфорилирование BRI1, а затем процессы фосфорилирования и дефосфорилирования ряда других специфических белков. В конечном итоге активируются транскрипт-факторы BZR1 и BES1, вследствие чего усиливается экспрессия генов-мишеней [8].

Помимо специфических белков в трансдукции сигнала БС, очевидно, задействованы сигнальные посредники небелковой природы, в частности, активные формы кислорода (АФК). Так, на растениях огурца показана способность БС усиливать генерацию АФК – супероксидного анион-радикала и пероксида водорода [9]. Этот эффект подавлялся ингибитором НАДФН-оксидазы дифенилениодониумом. Обработка растений огурца 24-эпибрассинолидом (24-ЭБЛ) вызывала комплекс реакций, обуславливающих повышение устойчивости к абиотическим стрессорам (действию параквата и холода) [9], а также системной устойчивости к фузариозу [10]. Такие эффекты были связаны с зависимым от АФК усилением экспрессии целого ряда защитных генов, в т. ч. генов антиоксидантных ферментов.

Менее исследованы механизмы индуцирования БС защитных реакций у однодольных. На листьях кукурузы показано, что БС вызывал накопление транскриптов и повышение активности НАДФН-оксидазы [11]. АФК, генерируемые НАДФН-оксидазой, были необходимы как сигнал для повышения активности антиоксидантных ферментов. Однако связь этих реакций с формированием устойчивости растений к конкретным стресс-факторам в указанной работе не изучалась.

Цель работы – выяснить участие АФК в процессе индуцирования эпибрассинолидом солеустойчивости растений проса (*Panicum miliaceum* L.) на ранних фазах развития. Выбор проса как объекта исследования был обусловлен тем, что оно относится к числу немногих культурных растений, на которых стресс-протекторные эффекты БС до сих пор не исследовались.

Материалы и методы исследования. В работе использовали растения проса сорта Константиновское. Семена обеззараживали путем 30-минутной обработки 3 %-ным перексидом водоро-

да и проращивали в чашках Петри с добавлением дистиллированной воды в течение 4 сут. Затем проростки переносили в пластиковые кюветы, размещая их на завернутых в марлю стеклянных пластинах. Растения выращивали на очищенной водопроводной воде при 12-часовом световом периоде и освещенности 5 клк, температура воздуха 25 ± 1 °С (днем) и 20 ± 1 °С (ночью). На 9-е сутки в кюветы опытных вариантов добавляли эффекторы: 24-ЭБЛ в конечной концентрации 10 нМ, антиоксидант диметилтиомочевину (ДМТМ – 300 мкМ), ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол (60 мкМ). Время инкубации растений на растворе 24-ЭБЛ – 24 ч. В соответствующих вариантах опытов проростки инкубировали 27 ч на растворах ДМТМ или имидазола. В вариантах с комбинированным действием ДМТМ или имидазол вносили в среду инкубации за 3 ч до введения в нее 24-ЭБЛ. Эффективные концентрации исследуемых соединений были выбраны на основании предварительных опытов.

После обработки эффекторами часть 10-дневных растений подвергали потенциально летальному солево-му стрессу путем 7-часовой инкубации на 500 мкМ растворе NaCl, после завершения которой проростки переносили на очищенную водопроводную воду. Выживание растений оценивали через 4 сут. после стрессового воздействия.

Содержание пероксида водорода определяли ферроцианидным методом, экстрагируя его из растертых на холоде листьев 5 %-ным ТХУ [12].

Для определения активности антиоксидантных ферментов навески листьев гомогенизировали на холоде в 0,15 М К,Na-фосфатном буфере (рН 7,6) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ), дитиотреитола (1 мМ), фенолметилсульфонилфторида (0,5 мМ) и детергента Тритона X-100 (конечная концентрация 0,1 %). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4 °С. Условия определения активности СОД (КФ 1.15.1.1), каталазы (КФ 1.11.1.6), гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) подробно описаны ранее [13]. Белок определяли по Бредфорд.

На рисунках приведены средние значения трех независимых опытов и их стандартные отклонения.

Результаты и их обсуждение. Обработка проростков проса 24-ЭБЛ существенно повышала их выживание после потенциально летального действия NaCl (рис. 1).

Под влиянием 24-ЭБЛ в листьях происходило транзитное увеличение содержания пероксида водорода с максимумом через 7 ч (рис. 2). К моменту окончания инкубации проростков на растворе 24-ЭБЛ (24 ч) содержание H_2O_2 в листьях снижалось до уровня контроля.

Если допустить, что пероксид водорода задействован в передаче сигнала экзогенного 24-ЭБЛ в генетический аппарат клетки и индуцировании защитных реакций, то антиоксиданты и инги-

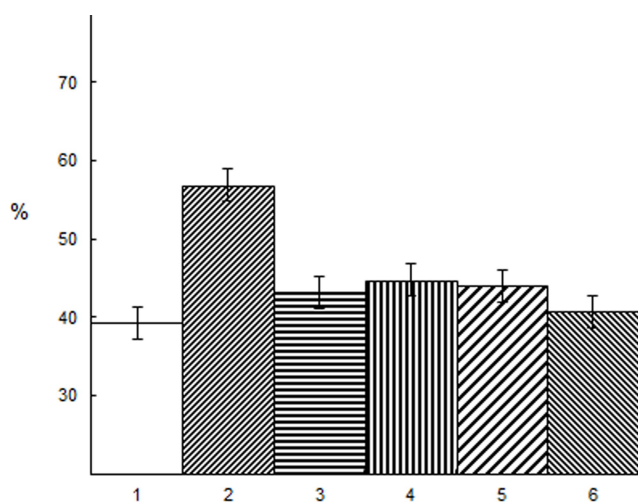


Рис. 1. Выживание (%) проростков проса после 7-часового воздействия 500 мкМ NaCl. Здесь и на рис. 3: 1 – контроль; 2 – 24-ЭБЛ (10 нМ); 3 – ДМТМ (300 мкМ) 4 – имидазол (60 мкМ); 5 – 24-ЭБЛ (10 нМ) + ДМТМ (300 мкМ); 6 – 24-ЭБЛ (10 нМ) + имидазол (60 мкМ)

биторы ферментов, участвующих в генерации АФК, должны препятствовать вызываемому БС развитию солеустойчивости проростков проса. Обработка растений ДМТМ сама по себе немного снижала содержание пероксида водорода в листьях и нивелировала его повышение, вызываемое 24-ЭБЛ (рис. 3). Известно, что одним из основных ферментов, обеспечивающих генерацию АФК на поверхности растительных клеток, является НАДФН-оксидаза [14]. Супероксидный анион-радикал, образуемый этим ферментом, спонтанно или под влиянием СОД превращается в пероксид водорода, который способен проникать в цитоплазму. Кроме того, возможно прохождение супероксидного анион-радикала в протонированном виде через плазмалемму в цитозоль и превращение его в пероксид водорода

внутриклеточными формами СОД [15]. В наших экспериментах обработка проростков ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом снижала содержание пероксида водорода в листьях и частично нивелировала повышение его количества, вызываемое 24-ЭБЛ (рис. 3).

Антиоксидант ДМТМ и ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол сами по себе существенно не влияли на солеустойчивость проростков проса (рис. 1). В то же время оба эффиктора достоверно уменьшали положительное действие 24-ЭБЛ на выживание проростков после действия солевого стресса.

Одной из стресс-протекторных систем, индуцируемых БС и обеспечивающих повышение солеустойчивости проростков, может быть антиоксидантная. Обработка 24-ЭБЛ повышала активность СОД, солевой стресс сам по себе вызывал ее снижение (таблица). При этом 24-ЭБЛ устранял ингибирование активности фермента, вызываемое действием хлорида натрия. Предобработка проростков ДМТМ или имидазолом нивелировала повышение активности СОД, вызываемое БС как в варианте без стрессового воздействия, так и на фоне солевого стресса.

Активность каталазы в варианте с обработкой 24-ЭБЛ также повышалась. Засоление слабо влияло на активность фермента. Однако в варианте с предобработкой 24-ЭБЛ и последующим солевым стрессом активность каталазы была заметно выше (таблица). ДМТМ и имидазол частично снимали эффект повышения активности этого фермента, вызываемый действием 24-ЭБЛ.

Активность другого фермента, участвующего в обезвреживании пероксида водорода – гваяколпероксидазы, увеличивалась в листьях проса как под влиянием предобработки фитогормоном, так и при действии NaCl. Наиболее существенное увеличение активности гваяколпероксидазы наблюдалось в варианте с комбинированным влиянием засоления и 24-ЭБЛ (таблица). При этом антиоксидант и ингибитор НАДФН-оксидазы устраняли вызываемое 24-ЭБЛ повышение активности фермента в варианте без стрессового воздействия и в условиях действия на растения хлорида натрия.

Таким образом, есть основания полагать, что индуцирование солеустойчивости проса экзогенным БС опосредовано усилением генерации АФК, связанным с повышением активности НАДФН-оксидазы. Об этом свидетельствует устранение положительного влияния 24-ЭБЛ на солеустойчивость растений и активность ключевых антиоксидантных ферментов действием антиоксиданта ДМТМ и ингибитора НАДФН-оксидазы имидазола. Ранее снятие антиоксидантами вызываемого БС эффекта повышения устойчивости к гипотермии и агенту окислительного стресса параквату было показано на растениях огурца [9]. Полученные нами результаты позволяют полагать, что формирование сигнала БС, индуцирующего развитие устойчивости расте-

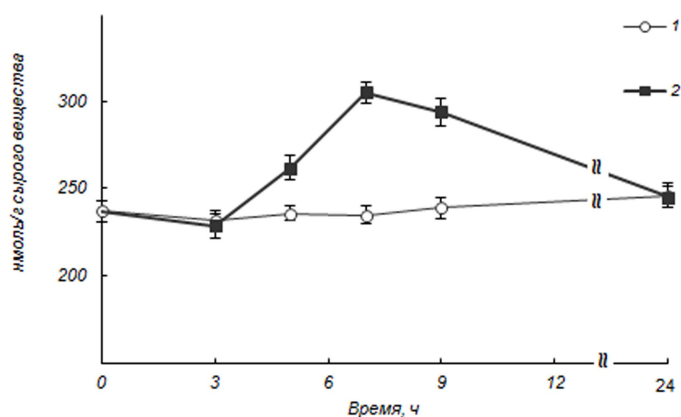


Рис. 2. Динамика содержания пероксида водорода (нмоль/г сырого вещества) в листьях при обработке проростков проса 24-ЭБЛ: 1 — контроль; 2 — 24-ЭБЛ (10 нМ)

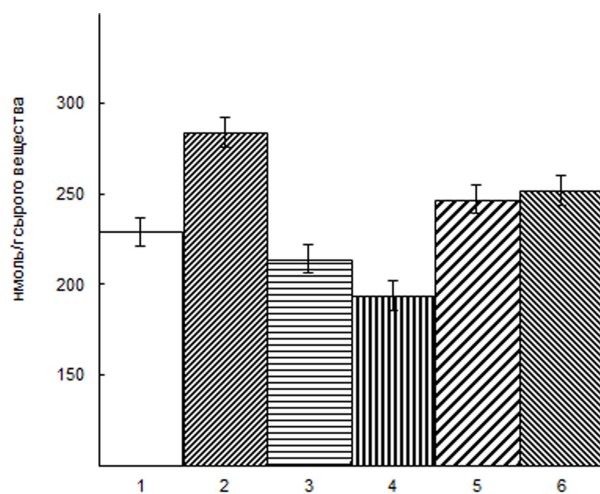


Рис. 3. Содержание пероксида водорода (нмоль/г сырого вещества) в листьях проростков проса при их обработке 24-ЭБЛ и (или) другими эффикторами. Обозначения см. на рис. 1

Активность антиоксидантных ферментов в листьях проса

Вариант опыта	СОД, усл. ед/(мг белка · мин)	Каталаза, мкмоль Н ₂ О ₂ /(мг белка · мин)	Пероксидаза, усл. ед/(мг белка · мин)
Контроль	3,62 ± 0,11	274 ± 6	5,14 ± 0,07
24-ЭБЛ (10 нМ)	4,24 ± 0,13	323 ± 7	5,59 ± 0,10
24-ЭБЛ (10 нМ) + ДМТМ (300 мкМ)	3,71 ± 0,09	301 ± 7	5,23 ± 0,08
24-ЭБЛ (10 нМ) + имидазол (60 мкМ)	3,73 ± 0,11	288 ± 9	5,08 ± 0,10
NaCl (500 мМ)	2,66 ± 0,10	265 ± 11	5,83 ± 0,11
24-ЭБЛ (10 нМ) + NaCl (500 мМ)	3,42 ± 0,12	326 ± 8	6,32 ± 0,09
24-ЭБЛ (10 нМ) + NaCl (500 мМ) + ДМТМ (300 мкМ)	2,88 ± 0,14	290 ± 8	5,87 ± 0,08
24-ЭБЛ (10 нМ) + NaCl (500 мМ) + имидазол (60 мкМ)	2,96 ± 0,11	292 ± 7	5,78 ± 0,10

ний проса к солевому стрессу, по-видимому, происходит с участием АФК, образующихся за счет повышения активности НАДФН-оксидазы. Естественно, при этом нельзя полностью исключить вклад других ферментных систем, в частности, внеклеточных форм пероксидазы в генерацию АФК [15]. Однако, судя по данным ингибиторного анализа, роль НАДФН-оксидазы в этих процессах может быть ведущей.

Литература

1. Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. // Ann. Bot. 2000. Vol. 86. P. 441–447.
2. Divi U. K., Rahman T., Krishna P. // BMC Plant Biology. 2010. Vol. 10; doi: 10.1186/1471-2229-10-151.
3. Zeng H. Tang Qi, Hua X. // J. Plant Growth Regul. 2010. Vol. 29. P. 44–52.
4. Ali B., Hayat S., Fariduddin Q., Ahmad A. // Chemosphere. 2008. Vol. 72. P. 1387–1392.
5. Shahid M. A., Pervez M. A., Balal R. M. et al. // Austr. J. Crop Sci. 2011. Vol. 5. P. 500–510.
6. Talaat N. B., Shawkly B. T. // Acta Physiol. Plant. 2013. Vol. 35. P. 729–740.
7. Fariduddin Q., Khalil R. R., Mir B. A. et al. // Environ. Monit. Assess. 2013. Vol. 185. P. 7845–7856.
8. Gruszka D. // Int. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. P. 8740–8774.
9. Xia X. J., Wang Y. J., Zhou Y. H. et al. // Plant Physiol. 2009. Vol. 150. P. 801–814.
10. Xia X. J., Zhou Y. H., Ding J. et al. // New Phytol. 2011. Vol. 191. P. 706–720.
11. Zhang A., Zhang J., Ye N. et al. // J. Exp. Bot. 2010. Vol. 61. P. 4399–4411.
12. Sagisaka S. // Plant Physiol. 1976. Vol. 57. P. 308–309.
13. Karpets Yu. V., Kolupaev Yu. E., Lugovaya A. A., Oboznyi A. I. // Rus. J. Plant Physiol. 2014. Vol. 61. P. 339–346.
14. Sagi M., Fluhr R. // Plant Physiol. 2006. Vol. 141. P. 336–340.
15. Kolupaev Yu. E., Karpets Yu. V. // Handbook on Reactive Oxygen Species (ROS): Formation Mechanisms, Physiological Roles and Common Harmful Effects / ed. M. Suzuki, S. Yamamoto. NY, 2013. P. 109–136.

A. A. VAYNER, Yu. E. KOLUPAEV, T. O. YASTREB, V. A. KHRIPACH

plant_biology@mail.ru, khripach@iboch.bas-net.by

24-EPIBRASSINOLIDE INDUCES SALT TOLERANCE OF MILLET (*PANICUM MILIACEUM*) SEEDLINGS INVOLVING REACTIVE OXYGEN SPECIES

Summary

The treatment of millet seedlings with 24-epibrassinolide (24-EBL) was shown to cause a transient increase in their hydrogen peroxide content, the subsequent activation of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase) and the development of their resistance to salt stress. Antioxidant dimethylthiourea and NADPH oxidase inhibitor imidazole leveled these processes. It was concluded that the induction of millet salt tolerance by exogenous 24-EBL was mediated by the enhancement of reactive oxygen species level associated with the increased activity of NADPH oxidase.