

## ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ 0,3% РАСТВОРОМ NaCl НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ ПРИ ПОСЛЕДУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ГИПЕРТЕРМИИ\*

**Аннотация:** Рассмотрено совместное воздействие 0,3% концентрации NaCl и повышенной температуры (42°C) в течение 30, 60, 120 минут, которое приводило к неспецифическому повышению устойчивости растений ячменя.

Подобного рода данные указывают о функционировании в растениях общих систем (механизмов) устойчивости к двум или нескольким факторам, называемым перекрестной адаптацией, что объясняется молекулярным механизмом, в основе которого лежит взаимосвязь различных сигнальных систем, центральными универсальными компонентами которых, в частности, являются активные формы кислорода (АФК).

**Ключевые слова:** Термоустойчивость, солеустойчивость, ферменты, экспозиция, стресс, абсцизовая кислота, адаптация.

**Введение.** В настоящее время показано, что образование O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и связанное с ними развитие ПОЛ, рассматривается как сигнал, вызывающую раннюю ответную защитную реакцию антиоксидантной системы [11]. В связи с установленным в предыдущих исследованиях [1] влияния предобработки низкой концентрацией NaCl (0,3%), на устойчивость метаболических процессов в проростках ячменя в условиях 2% NaCl, представлялось интересным изучить действие обработки 0,3% NaCl, к последующему высокотемпературному воздействию.

С этой целью, предобработанные 0,3% NaCl 5-дневные проростки ячменя помещали в термостат при 42 °С в течение коротких экспозиций времени (15, 30, 60, 120 минут). Уровень перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по потенциальной способности проростков к образованию свободных радикалов, содержанию начальных продуктов ПОЛ-ДК, а ответ АО-системы по активности СОД, каталазы (КАТ), глутатион-редуктазы (ГР), глутатион-трансферазы (ГТ). При сравнении результатов, полученных при действии теплового шока в предобработанных 0,3% NaCl, с результатами полученными при температурном воздействии без предобработки солью, за исходные уровни регистрируемых показателей принимали начальный уровень контроля.

**Методы исследования.** В качестве объекта исследований были использованы семена ячменя *Hordeum Vulgaris*, относительно неустойчивого к действию соли, сорта Ширванданы, выращенные при 22-24 °С в течение 5 суток. После этого проростки помещали в среду инкубации, состоящую из смеси 0,3% NaCl и 1,5 % сахарозы в течение суток. Контролем служили проростки, выращенные на растворе 1,5% сахарозы. Тепловой шок создавали, помещая растения в термостат при 42 °С на 30, 60 и 120 минут. Общецелочная суспензии из листьев ячменя, содержала 0,05 М КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub>4; 0,001 М ЭДТА; 0,05% тритон X100; 0,001 М ас-

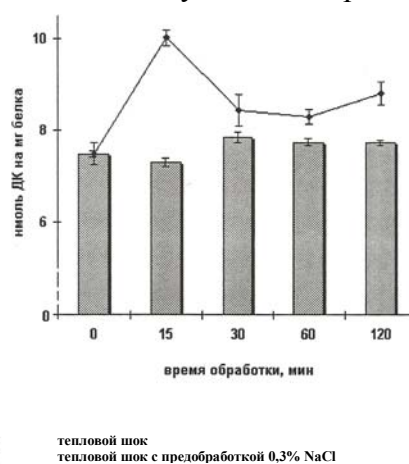


Рис. 1. Влияние совместного действия теплового шока и 0,3% NaCl на содержание диеновых конъюгатов в проростках ячменя.

корбиновой кислоты; рН=7,5. Определение содержание диеновых конъюгатов (ДК) проводили по методу [7]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) по [5], каталазы (КАТ) [12], глутатион-редуктазы (ГР) [9], глутатион-трансферазы (ГТ) [6].

Результаты и обсуждение. При действии на проростки ячменя, обработанных 0,3% NaCl тепловым шоком в течение 15 минутной экспозиции, количество ДК не изменялось. К 30 минутному действию теплового шока уровень первичных продуктов ПОЛ снижалось более, чем на 20% от исходного уровня (рис.1), с удлинением времени экспозиции уровень ДК снова повышался (118%), а при 120 минутах был близок к контрольному уровню.

Известно, что при действии различных стрессов происходит увеличение содержания эндогенной АБК (абсцизовая кислота) [10], поэтому можно предположить, что в начале совместного действия, в предобработанных растениях 0,3% концентрации NaCl и высокой температуры (15, 30 минут), АБК выступает в роли антиоксиданта [10, 14], биологическое действие которого может заключаться в нейтрализации свободных радикалов [3]. Однако, уже при более длительной экспозиции, при достаточном накоплении АБК, она может проявлять свойство ксенобиотика [14], что и объясняет изменение уровня ДК при совместном действии двух факторов.

Помимо этого при сопряженном воздействии на проростки ячменя 0,3% NaCl и высокой температуры, возможно, что АБК также участвует в антиоксидантной защите с помощью активации АО-ферментов. Ответ АО-системы при одновременном действии 0,3% NaCl и теплового шока, выявил резкое увеличение активности СОД (50%) при 15 минутной обработке высокой температурой (рис.2), которая в дальнейшем оставалась выше контроля приблизительно на 30% при 30, 120 минутах воздействия и в 2 раза - к 60 минутам. Таким образом, предобработка 0,3% NaCl приводила к изменению характера активности СОД при действии высокой температуры более ранней активацией фермента. Очевидно, предобработка 0,3% NaCl, опосредовано через увеличение концентрации АБК, повышала актив-

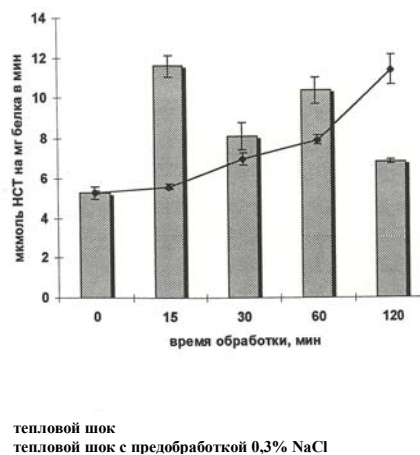


Рис.2. Активность СОД в проростках ячменя с предобработкой 0,3% NaCl.

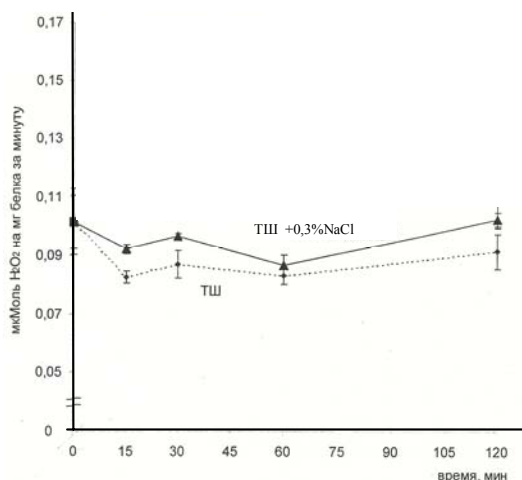


Рис.3. Влияние совместного действия теплового шока и 0,3% NaCl на активность каталазы в проростках ячменя.

тивность этого фермента, действуя или усилением транскрипции его генов [6], либо непосредственным влиянием на увеличение активности уже существующего пула фермента. Ряд исследователей [13] считает, что изменение уровня транскриптов СОД происходит в ответ на действие различных стрессов и являются причиной частичного изменения метаболической активности клетки, управляющей уровнем АФК (активные формы кислорода), которые в свою очередь могут активировать транскрипцию других, АБК-независимых, генов СОД. Другой причиной повышения активности СОД в этих условиях, может быть синтез СОД de novo.

Анализ снижение активности каталазы, непосредственно расщепляющей H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, при сов-

местном действии соли и температуры (рис.3), возможно, связано также с уменьшением ее синтеза, под действием АБК.

Исследование активности ГР, при гипертермии под влиянием обработки 0,3% NaCl, выявило ее снижение при всех экспозициях времени на 15-25% (рис.4), что очевидно, является результатом истощения запаса НАДФ·Н, так как известно, что солевой и тепловой стрессы снижают восстановление НАДФ, в результате ингибирования нециклического транспорта электронов.

Активность другого глутатионзависимого фермента, ГТ, в этих условиях повышалась только к 30 минутной экспозиции (рис.5), что приводило к снижению ДК в начальный период воздействия.

Итак, предобработка 0,3% NaCl оказывала защитный эффект на растения в условиях последующей гипертермии снижением скорости ПОЛ, сохраняя целостность мембран и стабилизацией перекисного окисления, вызванное предобработкой 0,3% NaCl, посредством более ранней, чем при обычном действии высокой температуры, активации СОД.

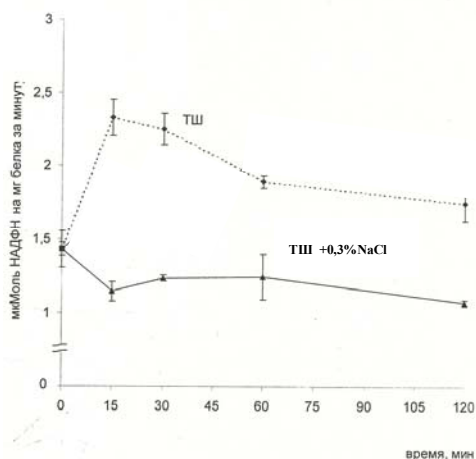


Рис.4. Влияние совместного действия теплового шока и 0,3% NaCl на активность глутатионредуктазы в проростках ячменя.

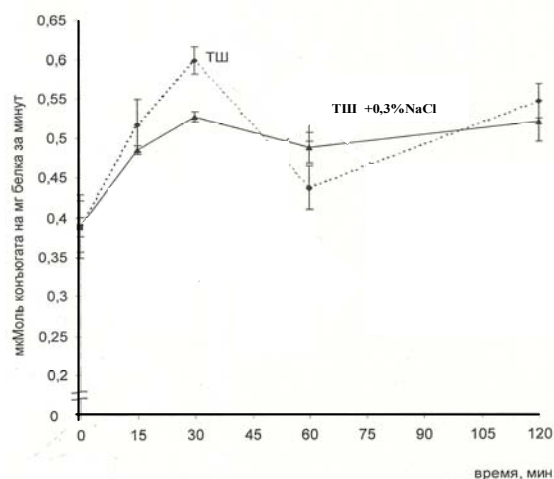


Рис.5. Влияние совместного действия теплового шока и 0,3% NaCl на активность глутатионтрансферазы в проростках ячменя.

Если рассматривать изменение ПОЛ при тепловом шоке с предобработкой 0,3% NaCl не от исходного контрольного уровня, а от уровня, установившегося к моменту начала действия повышенной температуры, то видно, что предобработка 0,3% NaCl приводила к увеличению липопероксидации, а в условиях последующей гипертермии скорость процесса возвращалась к контрольному значению (рис.6).

Можно предположить, вызванная 0,3% NaCl развитие перекисного окисления к 15-минутной экспозиции, стимулировало более раннюю индукцию защитных систем при тепловом шоке. В частности, активность СОД после пониженного уже к 30-60 минутам действия 0,3% NaCl при тепловом шоке резко увеличивалась уже в первые 15 минут, а затем повторно при 60-ти минутах, что и приводило к снижению скорости липопероксидации, а активность ГР, хотя и повышалась значительно в варианте 0,3% NaCl, и в меньшей степе-

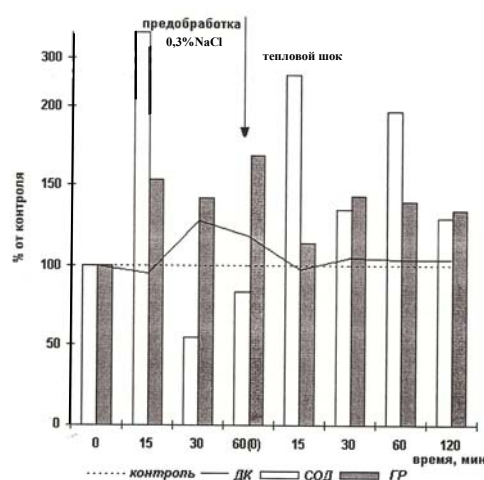


Рис.6. Содержание ДК и активность ферментов антиоксидантной системы проростков ячменя (СОД и ГР) при обработке проростков 0,3% NaCl и последующем тепловом шоке.

ни при гипертермии, при совместном же влиянии двух факторов, была ниже контроля.

Обнаруженный в наших экспериментах защитный эффект 0,3% NaCl к последующему тепловому шоку, можно объяснить с точки зрения перекрестной устойчивости - явления, при котором растение, адаптируясь к одному фактору, приобретает устойчивость и к другому [2]. Подобное явление предполагает вовлечение общих механизмов индукции стресс-ответа и формирование сходных защитных реакций при воздействии перечисленных пар факторов, возможно, через существующую в клетках растений, достаточно скоординированной сигнальной сети [4], главными универсальными компонентами которой, вызывающих перекрестную устойчивость к различным факторам, является АФК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гамбарова Н.Г. Влияние предобработки 0,3% раствором NaCl в устойчивости ячменя к последующему действию экстремального засоления // В сб. материалов Междунар. Научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии». М.: 2008, с.100-102.
2. Креславский В.Д., Карпентер Р., Климов В.В., Мурата Н., Аллахвердиев С.И. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу// Биолог.мембраны, 2007, т.24, №3, с.209
3. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд.-во С.-Петерб. Ун.-та, 2002, 244 с.
4. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002, 294 с.
5. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах// Лабораторное дело. 1985. Вып.11, с.578-681.
6. Gomes Y.M., Yimenes A., Olmos E., Sevilla F. Location and effects of long term NaCl stress superoxidizedismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea chloroplast.// J. of Exp. Bot. 2004, N55, p.119-130.
7. Fletcher D.L., Dillard C.J., Tappel A.Y. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological system and tissues // Analyt. Biochem. 1973. v.52, p.497-499.
8. Habig W.h., Pabst M.V., Jacoby W.B. Glutation-S-transferases // J.Biol. Chem., 1974, v.249, p.7130-7135.
9. Iawata J., Tanaka U. Glutationereductases "positive" spectrophotometre assayes// Colled. Cresh. Chem. Commun. 1977. V.42, №3, p.1086-1089.
10. Jia W., Wang Y., Zhang S., Zhang J. Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots // J.Exp. Bot. 2002, v.53, N 378, p.2201-2206.
11. Lee S.H., Singh A.P., Chung G.C. Rapid accumulation of hydrogen peroxidase in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport// J.Exp. Bot. 2004, v.55, N 403, p.1733-1741.
12. Patterson B.D., Payne L.A., Chen Yi-Zhu, Graham P. An inhibitor of catalase induced by cold in chilling-sensitive plants// Plant Physiology. 1984, v.76, №4, p.1014-1018.
13. Slesak I., Mizsalzki Z. Superoxidizedismutase – like protein from roots of intermediate C3-plant in vitro culture. Plant Sci., 2003, v.164, p.497-505.
14. Zhu J.K. Plant salt tolerance.//Trends Plant Sci., 2001, v.6, p.66-71.

N.G. Gambarova

INFLUENCE OF PRELIMINARY WORKING by 0,3% SOLUTION NaCl ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE SPROUTS OF BARLEY UNDER THE SUBSEQUENT EFFECT OF THE HYPERTHERMY

*Abstract:* A joint action by 0,3% of concentration NaCl and elevated temperature during 30, 60, 120 minutes, which led to an unspecific increase in the stability of the plants of barley is examined. This type of data indicate about the functioning in the plants of the general systems (mechanisms) of stability to two or several factors, called cross adaptation, which is explained by the molecular mechanism, at basis of which lies the interrelation of different signal systems, by central universal components of which, in particular, appear the active forms of oxygen (AFK).

*Key words:* heat stability, saltstability, enzymes, exposition, stress, abscisic acid, adaptation.