

Т. О. Ястреб¹, Ю. Е. Колупаев¹, А. И. Обозный¹, Ю. В. Карпец¹,
член-корреспондент НАН Украины А. П. Дмитриев²

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: plant_biology@mail.ru, dmyt@voliacable.com

Низкомолекулярные протекторы в салицилатдефицитных растениях *Arabidopsis thaliana* при действии солевого стресса

Сравнивали реакцию на солевой стресс (200 мМ NaCl, 24 ч) растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) дикого типа (*Col-0*) и трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы (*NahG*), отличающихся низким содержанием салициловой кислоты. Рост растений дикого типа после солевого стресса значительно ингибировался, а его влияние на рост трансформантов *NahG* было слабовыраженным. После солевого стресса у растений обоих генотипов уменьшалось содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях, однако у растений *NahG* изменения содержания фотосинтетических пигментов были менее заметными, чем у растений дикого типа. Увеличение содержания пролина в листьях растений дикого типа в ответ на действие NaCl было более существенным по сравнению с таковым у салицилатдефицитных трансформантов. В то же время содержание сахаров и антоцианов в листьях растений *NahG* в ответ на солевой стресс увеличивалось, а у дикого типа — уменьшалось. Сделано заключение о различиях во вкладе низкомолекулярных защитных соединений в адаптацию к солевому стрессу у растений арабидопсиса дикого типа и трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, трансформанты *NahG*, салициловая кислота, солевой стресс, пролин, антоцианы.

Салициловая кислота (СК) — эндогенный полифункциональный биорегулятор фенольной природы, участвующий в клеточном сигналинге, ростовых процессах и формировании адаптивных реакций растений. Она является важным фактором в инициации реакции сверхчувствительности и участвует в регуляции устойчивости растений к биотическим [1] и абиотическим стрессам [2, 3], в том числе к солевому [4].

Однако сведения о влиянии салицилатного статуса растений на их устойчивость к абиотическим стрессовым воздействиям весьма противоречивы. Так, растения арабидопсиса, трансформированные бактериальным геном *NahG* и не накапливающие достаточного количества СК, немного превосходили растения дикого типа по способности развивать индуцированную теплоустойчивость, однако проявляли меньшую конститутивную устойчивость к жесткому тепловому стрессу [2]. Показано, что трансформанты *NahG* обладали повышенной устойчивостью к действию хлорида натрия, маннита и агента окислительного стресса метилвиолагена [5]. С другой стороны, мутанты арабидопсиса *snc1*, отличающиеся высоким конститутивным содержанием СК, оказались более чувствительными, а трансформанты

NahG — более устойчивыми к осмотическому стрессу по сравнению с растениями дикого типа [6].

Считается, что, по крайней мере, часть физиологических эффектов СК связана с ее способностью вызывать усиление генерации активных форм кислорода (АФК), в частности пероксида водорода. Следствием транзиторного увеличения содержания H_2O_2 , выполняющего роль сигнальной молекулы, может быть как активация процессов, направленных на уничтожение патогенов (окислительный взрыв, программируемая клеточная гибель) [7], так и повышение активности антиоксидантных ферментов и накопление полифункциональных низкомолекулярных протекторов, что важно для формирования устойчивости растений к абиотическим стрессам [2, 4]. Повышенную устойчивость салицилатдефицитных трансформантов арабидопсиса к действию стрессов связывают с уменьшением генерации АФК в стрессовых условиях и, как следствие, с меньшим развитием вторичных окислительных повреждений [8]. В то же время нельзя исключить, что отсутствие у трансформантов *NahG* салицилатзависимых сигнальных путей может изменять спектр защитных реакций, индуцируя какие-либо компенсаторные реакции.

Хотя реакция трансформантов *NahG* на биотические и абиотические стрессы изучается достаточно давно [9], многие физиологические особенности этих растений до сих пор остаются мало исследованными. Известно, что устойчивость растений к ряду абиотических стрессов, в том числе к солевому, во многом зависит от способности накапливать полифункциональные низкомолекулярные протекторы, участвующие в осморегуляции, защите от окислительных повреждений, предотвращении денатурации белков. К ним относятся, в частности, пролин, сахара и флавоноиды [10–12]. В связи с этим целью исследования было сравнение содержания низкомолекулярных протекторов у трансформантов *NahG* и растений арабидопсиса дикого типа в обычных условиях и при действии солевого стресса.

Материалы и методы исследования. В исследовании использовали четырехнедельные растения *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (*Col-0*) и трансформированные геном бактериальной салицилатгидроксилазы *NahG* (не накапливающие СК вследствие ее превращения в катехин). Семена растений *NahG* были любезно предоставлены проф. Ж.-М. Нейгаузом (Университет Нашатель, Швейцария). Растения выращивали в водной культуре на среде Гоба при температуре 24/18 °С (день/ночь), освещении 6000 лк и фотопериоде 10 ч [13]. Солевой стресс создавали добавлением в среду 200 мМ NaCl. Через 24 ч инкубации с хлоридом натрия среду заменяли обычной средой Гоба.

Для анализов использовали пластинки зрелых листьев прикорневой розетки. Содержание хлорофиллов и каротиноидов определяли в спиртовой вытяжке классическим спектрофотометрическим методом. Суммарное содержание сахаров в растительном материале определяли методом Морриса–Роэ с модификациями [14]. Содержание пролина анализировали с использованием нингидринового реактива [14].

Для определения содержания флавоноидов с максимумом УФ-В поглощения и антоцианов навески листьев (150 мг) гомогенизировали в 10 мл 1% раствора HCl в метаноле. После центрифугирования при 8000 g в течение 15 мин определяли оптическую плотность супернатанта при 300, 530 и 657 нм [15]. При расчете содержания антоцианов учитывали величину неспецифического поглощения при 657 нм.

Эксперименты проводили независимо три раза в трехкратной биологической повторности. На рисунках и в таблице приведены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты исследования и их обсуждение. Растения арабидопсиса *Col-0* и трансформанты *NahG* почти не отличались по интенсивности накопления биомассы в обычных

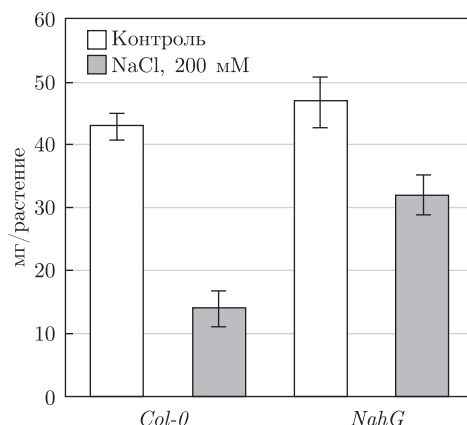


Рис. 1. Прирост биомассы растений арабидопсиса в течение 3 сут после действия солевого стресса

условиях (рис. 1). После воздействия солевого стресса отмечалось значительное (на 67%) ингибирование прироста биомассы растений арабидопсиса дикого типа. Ингибирующее действие соли на рост растений *NahG* было менее выраженным и составляло около 33% контроля (см. рис. 1).

Растения арабидопсиса дикого типа и салицилатдефицитных трансформантов в контрольном варианте мало отличались по содержанию хлорофиллов и каротиноидов в листьях (табл. 1). После инкубации на среде с хлоридом натрия содержание фотосинтетических пигментов снижалось у растений обоих генотипов. При этом у трансформантов *NahG* содержание хлорофиллов и каротиноидов оставалось более высоким по сравнению с таковым у растений дикого типа.

В листьях растений арабидопсиса генотипов *Col-0* и *NahG* при выращивании в обычных условиях содержалось практически одинаковое количество пролина (рис. 2, а). После солевого стресса содержание пролина в растениях дикого типа увеличивалось в 2,4 раза, тогда как у салицилатдефицитных трансформантов оно повышалось лишь на 68%.

Содержание сахаров в листьях растений *NahG* в физиологически нормальных условиях было ниже, чем у растений дикого типа (см. рис. 2, б). Иной оказалась картина после действия солевого стресса: у растений дикого типа содержание сахаров, наоборот, снижалось, в то время как у салицилатдефицитных трансформантов оно повышалось.

Содержание УФ-В поглощающих флавоноидов и антоцианов у растений арабидопсиса дикого типа и трансформантов *NahG* в обычных условиях было одинаковым (рис. 3). Под влиянием солевого стресса количество антоцианов в листьях генотипа *Col-0* немного снижалось, а у салицилатдефицитных растений *NahG* несколько повышалось. В ответ на действие солевого стресса содержание антоцианов в листьях трансформантов *NahG* было достоверно выше, чем у растений дикого типа (см. рис. 3, а).

Таблица 1. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях арабидопсиса, мг/г сухого вещества

Вариант	Хл. а	Хл. б	Хл. а + б	Каротиноиды
<i>Col-0</i> , контроль	11,13 ± 0,33	6,14 ± 0,18	17,27 ± 0,38	1,81 ± 0,04
<i>Col-0</i> , NaCl (200 мМ)	5,29 ± 0,23	2,86 ± 0,22	8,15 ± 0,32	0,86 ± 0,01
<i>NahG</i> , контроль	11,43 ± 0,09	6,62 ± 0,14	18,45 ± 0,17	1,62 ± 0,04
<i>NahG</i> , NaCl (200 мМ)	6,17 ± 0,14	3,39 ± 0,09	9,56 ± 0,17	0,96 ± 0,02

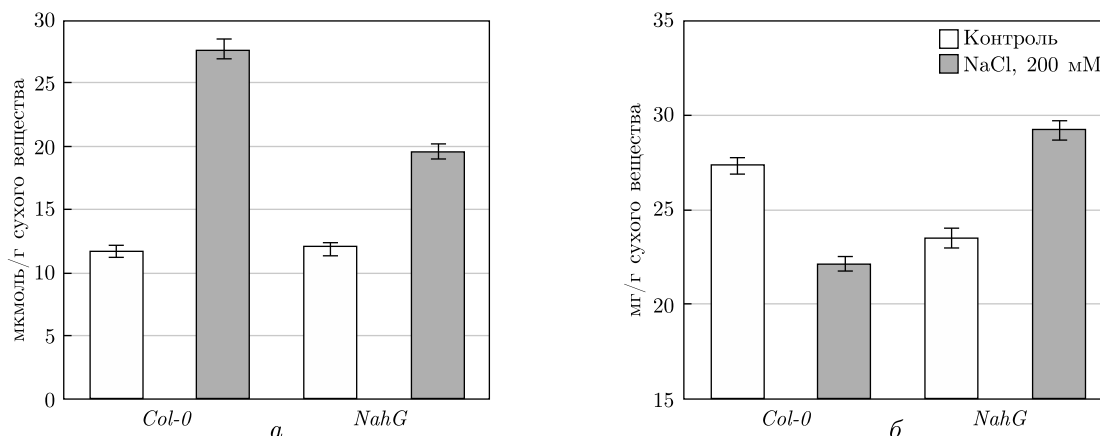


Рис. 2. Содержание пролина (а) и сахаров (б) в листьях растений арабидопсиса

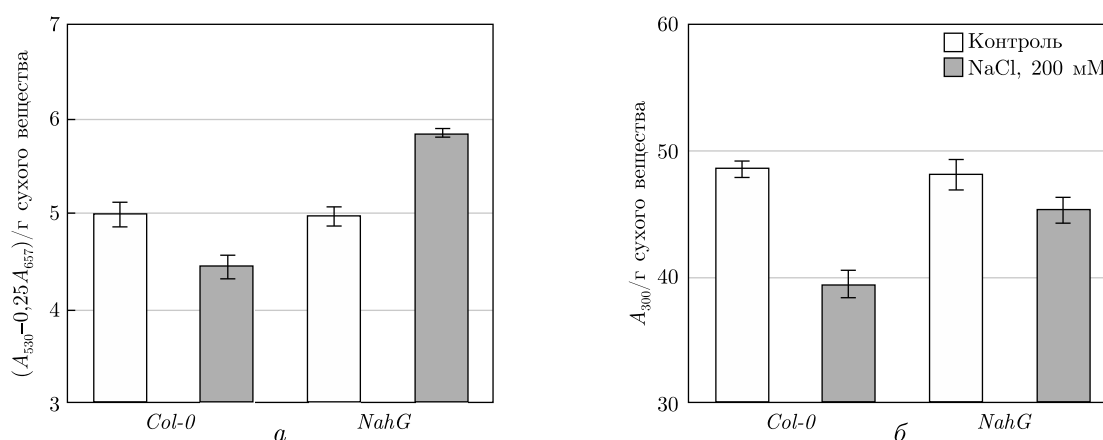


Рис. 3. Содержание антоцианов (а) и флавоноидов (б) в листьях растений арабидопсиса

У растений арабидопсиса дикого типа содержание флавоноидов, поглощающих УФ-В, после солевого стресса снижалось. У растений генотипа *NahG* такой эффект проявлялся лишь на уровне тенденции, в результате чего содержание флавоноидов у этих растений при солевом стрессе было выше, чем у растений *Col-0* (см. рис. 3, б).

Полученные результаты позволяют не только констатировать более высокую солеустойчивость салицилатдефицитных растений арабидопсиса по сравнению с растениями дикого типа, но и говорить о различиях в функционировании их стресс-протекторных систем.

Так, для растений *NahG* было характерно менее заметное по сравнению с растениями дикого типа повышение содержания пролина после солевого стресса (см. рис. 2, а). Эти данные согласуются с результатами, полученными при изучении реакции трансформантов *NahG* на осмотический стресс, вызываемый действием полиэтиленгликоля: у салицилатдефицитных растений содержание пролина повышалось в меньшей степени, чем у растений дикого типа [6]. С другой стороны, в этой же работе показано, что у растений арабидопсиса *snc1* с повышенным содержанием СК в ответ на осмотический стресс количество пролина увеличивалось более существенно по сравнению с растениями *Col-0*.

У салицилатдефицитных растений *NahG* защитные функции в большей степени, по-видимому, выполняют другие низкомолекулярные протекторы, в частности, сахара, антоциа-

ны и, возможно, другие флавоноидные соединения. Сахара помимо известного осмо- и мембранопротекторного действия проявляют заметные антиоксидантные эффекты [14]. Защитное действие флавоноидов при стрессах также связывают в основном с антиоксидантными свойствами [11].

Таким образом, у растений арабидопсиса дикого типа наиболее выраженной из изученных в настоящем исследовании реакций на солевой стресс было накопление пролина, в то время как у салицилатдефицитных трансформантов *NahG* происходило увеличение содержания сахаров и антоцианов. Полученные результаты позволяют связывать повышенную устойчивость трансформантов к засолению и другим абиотическим стрессам не только с обусловленным дефицитом салицилата пониженным образованием АФК [6, 8], но и с эффективным функционированием отдельных компонентов стресс-протекторных систем. В литературе имеются сведения о повышенном содержании восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты при солевом стрессе у растений *NahG* по сравнению с растениями дикого типа [8]. В настоящей работе впервые показаны отличия в содержании флавоноидных соединений (прежде всего, антоцианов) у трансформантов *NahG* и растений дикого типа при действии солевого стресса (см. рис. 3). Повышенная солеустойчивость растений *NahG* может быть также связана с более высоким содержанием в них сахаров (см. рис. 2). Вполне естественно, что особенности функционирования указанных компонентов стресс-протекторных систем у трансформантов *NahG* не исключают наличия у них и других механизмов защиты от различных типов стрессов.

Публикация содержит результаты исследований, проведенных при грантовой поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований по конкурсному проекту Ф64/23-2015.

Цитированная литература

1. Alvarez M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // Plant Mol. Biol. – 2000. – **44**, No 3. – P. 429–442.
2. Clarke S. M., Mur L. A. J., Wood J. E., Scott I. M. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 2004. – **38**, No 3. – P. 432–447.
3. Kolupaev Yu. E., Yastreb T. O., Shvidenko N. V., Karpets Yu. V. Induction of heat resistance of wheat coleoptiles by salicylic and succinic acids: connection of the effect with the generation and neutralization of reactive oxygen species // Appl. Biochem. Microbiol. – 2012. – **48**, No 5. – P. 500–505.
4. Palma F., Lluch C., Iribarne C., García-Garrido J. M., García N. A. T. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris* // Plant Growth Regul. – 2009. – **58**, No 3. – P. 307–316.
5. Borsani O., Valpuesta V., Botella M. A. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings // Plant Physiol. – 2001. – **126**, No 3. – P. 1024–1030.
6. He Q., Zhao S., Ma Q., Zhang Y., Huang L., Li G., Hao L. Endogenous salicylic acid levels and signaling positively regulate arabidopsis response to polyethylene glycol-simulated drought stress // J. Plant Growth Regul. – 2014. – **33**, No 4. – P. 871–880.
7. Wendehenne D., Durner J., Chen Z., Klessig D. F. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase // Phytochemistry. – 1998. – **47**, No 4. – P. 651–657.
8. Cao Y., Zhan Z. W., Xue L. W., Du J. B., Shang J., Xu F., Yuan S., Lin H. H. Lack of salicylic acid in *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress // Z. Naturforsch. – 2009. – **64**, No 3–4. – P. 231–238.

9. Sharma Y. K., Leon J., Raskin I., Davis K. R. Ozone induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**, No 10. – P. 5099–5104.
10. Carcia A. B., Engler J. A., Iyer S., Gerats T., Van Montagu M., Caplan A. B. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice // Plant Physiol. – 1997. – **115**, No 1. – P. 159–169.
11. Neill S. O., Gould K. S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? // Functional Plant Biol. – 2003. – **30**, No 8. – P. 865–873.
12. Kavi Kishor P. B., Sreenivasulu N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? // Plant Cell Environ. – 2014. – **37**, No 2. – P. 300–311.
13. Gibeaut D. M., Hulett J., Cramer G. R., Seemann J. R. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions // Plant Physiol. – 1997. – **115**, No 2. – P. 317–319.
14. Kolupaev Yu. E., Ryabchun N. I., Vayner A. A., Yastreb T. O., Oboznyi A. I. Antioxidant enzyme activity and osmolyte content in winter cereal seedlings under hardening and cryostress // Russ. J. Plant Physiol. – 2015. – **62**, No 4. – P. 499–506.
15. Nogues S., Baker N. R. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under UV-B radiation // J. Exp. Bot. – 2000. – **51**, No 348. – P. 1309–1317.

References

1. Alvarez M. E. Plant Mol. Biol., 2000, **44**, No 3: 429–442.
2. Clarke S. M., Mur L. A. J., Wood J. E., Scott I. M. Plant J., 2004, **38**, No 3: 432–447.
3. Kolupaev Yu. E., Yastreb T. O., Shvidenko N. V., Karpets Yu. V. Appl. Biochem. Microbiol., 2012, **48**, No 5: 500–505.
4. Palma F., Lluch C., Iribarne C., García-Garrido J. M., García N. A. T. Plant Growth Regul., 2009, **58**, No 3: 307–316.
5. Borsani O., Valpuesta V., Botella M. A. Plant Physiol., 2001, **126**, No 3: 1024–1030.
6. He Q., Zhao S., Ma Q., Zhang Y., Huang L., Li G., Hao L. J. Plant Growth Regul., 2014, **33**, No 4: 871–880.
7. Wendehenne D., Durner J., Chen Z., Klessig D. F. Phytochemistry, 1998, **47**, No 4: 651–657.
8. Cao Y., Zhan Z. W., Xue L. W., Du J. B., Shang J., Xu F., Yuan S., Lin H. H. Z. Naturforsch., 2009, **64**, No 3–4: 231–238.
9. Sharma Y. K., Leon J., Raskin I., Davis K. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, **93**, No 10: 5099–5104.
10. Carcia A. B., Engler J. A., Iyer S., Gerats T., Van Montagu M., Caplan A. B. Plant Physiol., 1997, **115**, No 1: 159–169.
11. Neill S. O., Gould K. S. Functional Plant Biol., 2003, **30**, No 8: 865–873.
12. Kavi Kishor P. B., Sreenivasulu N. Plant Cell Environ., 2014, **37**, No 2: 300–311.
13. Gibeaut D. M., Hulett J., Cramer G. R., Seemann J. R. Plant Physiol., 1997, **115**, No 2: 317–319.
14. Kolupaev Yu. E., Ryabchun N. I., Vayner A. A., Yastreb T. O., Oboznyi A. I. Russ. J. Plant Physiol., 2015, **62**, No 4: 499–506.
15. Nogues S., Baker N. R. J. Exp. Bot., 2000, **51**, No 348: 1309–1317.

Поступило в редакцию 24.11.2015

Т. О. Ястреб¹, Ю. Є. Колупаєв¹, О. І. Обозний¹, Ю. В. Карпець¹,
член-кореспондент НАН України О. П. Дмитрієв²

¹Харківський національний аграрний університет ім. В. В. Докучаєва

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: plant_biology@mail.ru, dmyt@voliacable.com

Низькомолекулярні протектори у саліцилатдефіцитних рослинах *Arabidopsis thaliana* під дією сольового стресу

Порівнювали реакцію на сольовий стрес (200 mM NaCl, 24 год) рослин арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* L.) дикого типу (*Col-0*) і трансформованих геном бактеріальної саліцилатгідроксилази (*NahG*), які відрізняються низьким вмістом саліцилової кислоти. Ріст рослин дикого типу після сольового стресу значно пригнічувався, а його вплив на ріст трансформантів *NahG* був слабо вираженим. Після сольового стресу в рослин обох генотипів зменшувався вміст хлорофілів і каротиноїдів у листках, однак у рослин *NahG* зміни вмісту фотосинтетичних пігментів були менш помітними, ніж у рослин дикого типу. Збільшення вмісту проліну в листках рослин дикого типу у відповідь на дію NaCl було більш істотним порівняно з таким у саліцилатдефіцитних трансформантів. У той же час вміст цукрів і антоціанів у листках рослин *NahG* у відповідь на сольовий стрес збільшувався, а у дикого типу — зменшувався. Зроблено висновок про відмінності у внеску низькомолекулярних захисних сполук в адаптацію до сольового стресу рослин арабідопсису дикого типу і трансформованих геном бактеріальної саліцилатгідроксилази.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana*, трансформанти *NahG*, саліцилова кислота, сольовий стрес, пролін, антоціани.

Т. О. Yastreba¹, Yu. E. Kolupaev¹, A. I. Obozniy¹, Yu. V. Karpets¹,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine A. P. Dmitriev²

¹V. V. Dokuchaev National Agrarian University of Kharkiv

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: plant_biology@mail.ru, dmyt@voliacable.com

Low-molecular protectors in salicylate-deficient plants of *Arabidopsis thaliana* under influence of salt stress

The responses to the salt stress (200 mM NaCl, 24 h) of *Arabidopsis thaliana* plants of wild type (*Col-0*) and those transformed with the gene of bacterial salicylate hydroxylase (*NahG*), which have lower content of salicylic acid, have been compared. After the salt stress, the growth of wild type plants was considerably inhibited, while its effect on the growth of *NahG* transformants was weakly expressed. After the salt stress in the leaves of plants of both genotypes, the contents of chlorophyll and carotenoids were decreased; however, in *NahG* plants, the changes of the contents of photosynthetic pigments were less revealed than in wild type plants. In response to the NaCl stress, the increase of the proline content in leaves of wild type plants was more essential in comparison with that in salicylate-deficient transformants. At the same time, the contents of carbohydrates and anthocyanins in leaves of *NahG* plants in response to the salt stress were increased, and those in the wild-type plants were decreased. The conclusion is made about the distinctions in the contributions of low-molecular protective compounds in adaptation of *Arabidopsis* plants of the wild type and those transformed with the bacterial gene of salicylate hydroxylase to the salt stress.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, transformants *NahG*, salicylic acid, salt stress, proline, anthocyanins.