

УДК 581.1

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ, СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРОРОСТКАХ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ ПРИ ФУЗАРИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ДЕЙСТВИИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

О.О. МОЛОДЧЕНКОВА

*Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения Украинской академии аграрных наук
65036 Одесса, Овидиопольская дорога, 3*

Изучены активность НАДФН-оксидазы, содержание H_2O_2 и эндогенной салициловой кислоты в проростках ярового ячменя при инфицировании *Fusarium culmorum* и воздействии экзогенной салициловой кислоты. Показано, что при заражении возбудителями фузариоза растений сортов ярового ячменя, различающихся по устойчивости к этому патогену, активность НАДФН-оксидазы, уровни H_2O_2 и эндогенной салициловой кислоты изменяются дифференцированно в зависимости от устойчивости сортов. Экзогенная салициловая кислота является активатором изменения изученных биохимических показателей в растениях. Предполагается, что НАДФН-оксидаза, H_2O_2 и салициловая кислота участвуют в формировании защитных реакций растений ярового ячменя при заражении фузариозной инфекцией.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., НАДФН-оксидаза, H_2O_2 , фузариоз, салициловая кислота.

В настоящее время увеличивается число исследований, подтверждающих, что активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в защитных механизмах растений при патогенезе [9]. Если раньше рассматривали роль АФК только как источника высокотоксичных, хотя и короткоживущих соединений, ингибирующих развитие патогена, то в настоящее время установлена еще одна их функция — участие в НАДФН-оксидазной сигнальной системе. Предполагается, что при окислении молекулярным кислородом НАДФН, локализованного в цитоплазматической мембране, образуется супероксидный радикал-анион, который в результате реакций, катализируемых супероксиддисмутазой, превращается в пероксид водорода (H_2O_2). Возможно, что супероксидный радикал-анион и H_2O_2 являются вторичными посредниками в НАДФН-оксидазной сигнальной системе. Пероксид водорода активирует факторы регуляции транскрипции и, как следствие, — индуцирует экспрессию защитных генов [7]. Одним из важных источников АФК при фитопатогенезе является НАДФН-оксидаза, локализованная на плазмалемме клетки [10].

Исключительно важную роль в этой сигнальной системе играет салициловая кислота (СК), концентрация которой многократно повышается не только в местах инфицирования, но и в тканях, удаленных от места инфекции. Так как СК связывает каталазу, разлагающую H_2O_2 , то количество последнего возрастает еще больше. Существуют протеинки-

назы, непосредственно активируемые салицилатами, что может объяснить экспрессию защитных генов как СК, так и H_2O_2 [3].

Хотя есть экспериментальные данные, подтверждающие участие НАДФН-оксидазной сигнальной системы в формировании устойчивости растений к патогенам, роль ее компонентов (НАДФН-оксидазы, H_2O_2 и СК) в реакциях зерновых злаковых культур при инфицировании растений возбудителями фузариоза и действии экзогенной СК изучена недостаточно. В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния фузариозной инфекции и экзогенной СК на активность НАДФН-оксидазы, содержание H_2O_2 и СК в проростках сортов ярового ячменя с различной устойчивостью к фузариозу.

Методика

Объектами исследования были надземная часть проростков и корни сортов ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.), различающихся по устойчивости к фузариозным гнилям: Нутанс 244, Вакула (устойчивые сорта), Водограй, Рось (восприимчивые).

Семена перед посевом предварительно обрабатывали 1 %-м раствором $KMnO_4$ с последующей промывкой водопроводной водой. Зерновки проращивали в течение 4 сут при 24 °С на дистиллированной воде (контроль) и на среде, содержащей 10 млн конидий/мл патогенных штаммов *Fusarium culmorum* и 2 мМ СК. Отпрепарированные надземную часть и корни проростков ячменя замораживали при -70 °С.

Активность НАДФН-оксидазы определяли по окислению НАДФН [10]. К реакционной смеси, состоящей из 0,8 мл реакционного буфера (50 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7,8), 0,1 мМ ЭДТА и 1 мкМ KCN), добавляли 0,2 мл пробы и предынкубировали 1 мин при 30 °С. Реакцию инициировали добавлением 100 мкМ НАДФН. Скорость окисления НАДФН регистрировали на спектрофотометре «Spocol-11» (Германия) по уменьшению адсорбции при 340 нм в течение 5 мин и рассчитывали с коэффициентом экстинкции $6,22 (mM \cdot cm)^{-1}$. Содержание белка во фракциях измеряли по методу Лоури.

H_2O_2 определяли флуориметрическим методом на спектрофлуориметре «Shimadzu» (Япония) с использованием гомованилиновой кислоты и триэтилентетрамина [8], СК — на жидкостном хроматографе «Gilson» (Франция) с использованием колонки Zorbax ODS(C18) [11]. Полученные данные обработаны статистически, вычислен критерий достоверности.

Результаты и обсуждение

Установлено, что НАДФН-оксидазная активность в тканях надземной части проростков ячменя устойчивых сортов при инфицировании растений возбудителями фузариоза и действии СК повышалась относительно контроля соответственно в 1,38 и 1,58 раза. У восприимчивых сортов при заражении возбудителями фузариозной инфекции активность НАДФН-оксидазы уменьшалась относительно контроля на 10,4 %, при действии СК — была на уровне контрольных значений. При совместном действии патогена и СК активность фермента у растений ячменя устойчивых сортов повышалась относительно контроля на 18,3 %, у восприимчивых не изменилась (рис. 1).

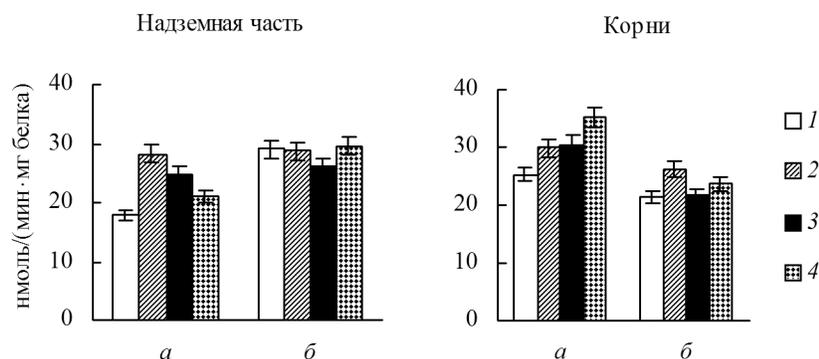


Рис. 1. Активность НАДФН-оксидазы (нмоль/(мин · мг белка) в проростках ярового ячменя на разных фонах проращивания. Здесь и на рис. 2, 3:

a — устойчивые сорта; *б* — восприимчивые сорта; 1 — контроль; 2 — СК; 3 — *Fusarium culmorum*; 4 — СК + *Fusarium culmorum*

В корнях проростков ячменя устойчивых сортов при инфицировании растений возбудителями фузариоза и действии СК активность фермента возрастала на 15–23 % относительно контроля. В корнях проростков восприимчивых сортов активность фермента под действием СК возрастала, а при инфицировании возбудителями фузариоза не отличалась от контроля. При совместном действии патогена и СК активность фермента у устойчивых сортов повышалась в 1,38 раза, у восприимчивых — на 11 % относительно контроля.

Установленные различия в активности НАДФН-оксидазы в тканях проростков ярового ячменя с различной устойчивостью к фузариозу при инфицировании и действии СК, по-видимому, могут быть связаны с уровнем генерации АФК. Для проверки этого предположения было изучено содержание H_2O_2 в проростках ярового ячменя при их заражении возбудителями фузариоза и действии СК (рис. 2).

В тканях надземной части проростков устойчивых сортов ярового ячменя как при отдельном инфицировании возбудителями фузариоза и действии СК, так и при совместном действии патогена и СК, содержание H_2O_2 повышалось в 1,6–1,7 раза относительно контроля, в корнях проростков устойчивых сортов — в 1,6–4,0 раза.

В тканях надземной части проростков восприимчивых сортов ярового ячменя при инфицировании растений возбудителями фузариоза со-

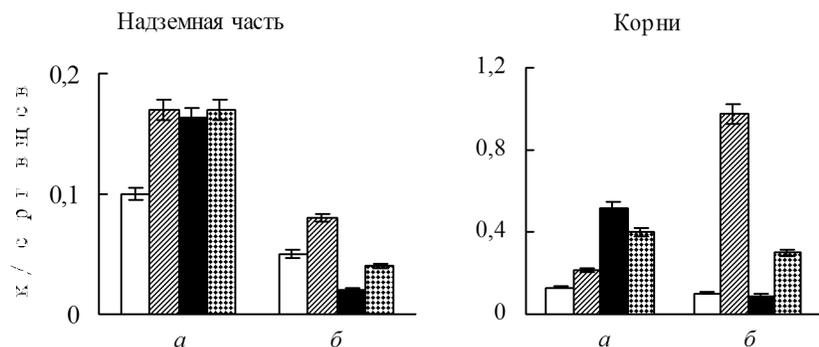


Рис. 2. Содержание пероксида водорода в проростках ярового ячменя при заражении возбудителями фузариозной инфекции и действии салициловой кислоты (мкг/г сырого вещества)

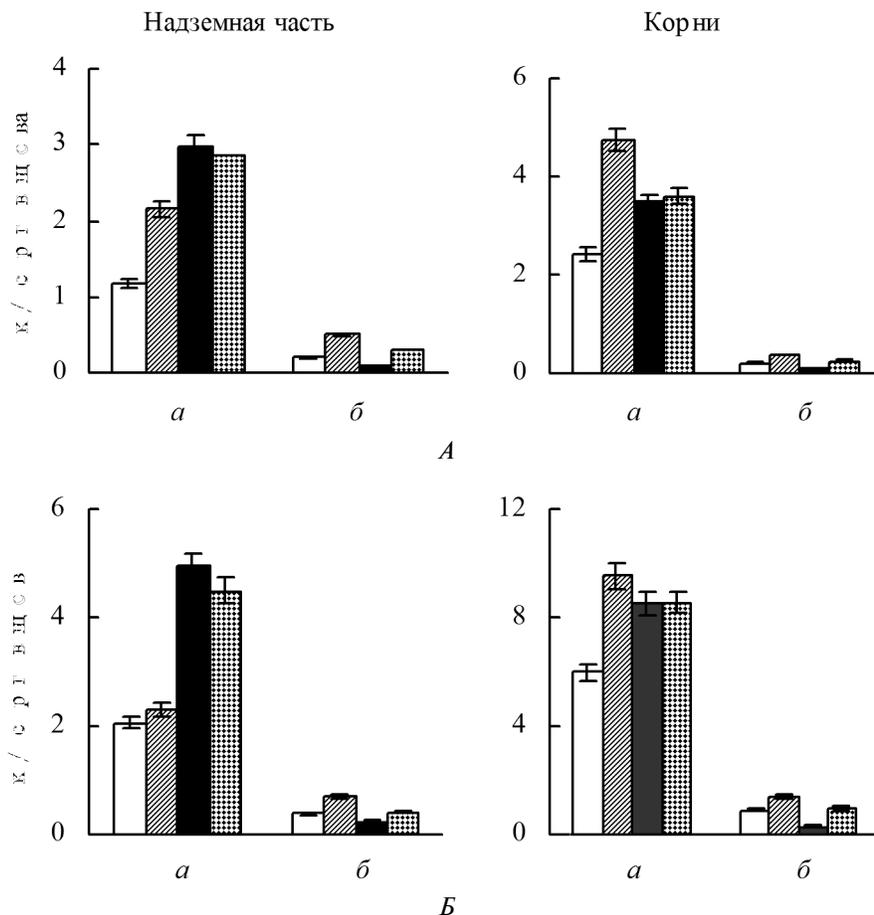


Рис. 3. Содержание свободной (А) и связанной (Б) салициловой кислоты в проростках ярового ячменя при инфицировании *Fusarium culmorum* и действии салициловой кислоты (мкг/г сырого вещества)

держание H_2O_2 уменьшалось в 2,5 раза относительно контроля, а при воздействии СК — увеличивалось в 1,6 раза. При совместном действии этих двух факторов содержание H_2O_2 было на уровне контроля.

В тканях корней восприимчивых сортов ярового ячменя при действии патогена содержание H_2O_2 было на уровне контроля, при действии СК — повышалось в 9 раз, при совместном действии патогена и СК — в 3 раза относительно контроля.

Таким образом, изменение содержания H_2O_2 и НАДФН-оксидазной активности при заражении растений ярового ячменя возбудителями фузариозной инфекции имеет сходную направленность и, по всей видимости, является одним из звеньев формирования реакций растения на инфицирование данным патогеном. При воздействии экзогенной СК характер изменения уровня H_2O_2 и активности НАДФН-оксидазы не всегда совпадал, что, вероятно, связано с регуляцией количества пероксида водорода антиоксидантными ферментами, в частности каталазой, активность которой может ингибироваться СК [3, 4].

Известно, что одним из важных компонентов НАДФН-оксидазной сигнальной системы является СК, поэтому следующим этапом наших исследований было изучение содержания свободной и связанной СК в

проростках ярового ячменя при инфицировании возбудителями фузариоза и действию СК.

Как видно из рис. 3, даже контрольные растения с различной устойчивостью к фузариозу характеризовались неодинаковым содержанием эндогенной свободной и связанной СК. Так, у устойчивых сортов ярового ячменя содержание свободной и связанной СК как в надземной части проростков, так и в корнях было значительно выше, чем у восприимчивых. Более высокое содержание СК в проростках устойчивых сортов ячменя вероятно обеспечивает конститутивную экспрессию некоторых генов, связанных с формированием устойчивости к возбудителям фузариозной инфекции. При инфицировании растений устойчивых сортов этими возбудителями в них содержание как свободной, так и связанной СК повышалось в 1,4–2,5 раза относительно контроля и в надземной части, и корнях проростков. При инфицировании патогеном восприимчивых сортов и в надземной части, и в корнях проростков содержание свободной и связанной СК снижалось в 1,43–2,20 раза относительно контроля (см. рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о возможном участии эндогенной СК в формировании защитных реакций растений ячменя при заражении данным патогеном.

При действии экзогенной СК в надземной части и корнях проростков ячменя содержание эндогенной СК (свободной и связанной) повышалось как у устойчивых, так и восприимчивых сортов в 1,15–2,50 раза относительно контроля. Одной из вероятных причин этого явления может быть индуцируемое возрастание активности фенилаланинаммиазилазы (ФАЛ), установленное в наших исследованиях ранее [1]. Повышение уровня эндогенного салицилата под воздействием экзогенной СК в тканях растений ячменя свидетельствует о возможной активации под действием СК каскада защитных реакций, причем даже у сортов с повышенным базовым уровнем эндогенного салицилата.

При совместном действии патогена и СК у устойчивых сортов ярового ячменя в надземной части проростков содержание свободной и связанной СК увеличивалось в 2,43 и 2,18 раза относительно контроля, а по отношению к зараженным растениям практически не изменялось. В корнях наблюдалась аналогичная тенденция изменения содержания свободной и связанной СК. В надземной части и корнях проростков восприимчивых сортов при совместном действии патогена и СК содержание свободной и связанной СК практически не изменялось относительно контроля, а по отношению к зараженным растениям — увеличивалось в 1,73–3,20 раза.

Следовательно, предварительная обработка семян ячменя СК с последующим выращиванием из них растений на инфекционном фоне приводила к увеличению ее содержания (в 2–3 раза) по сравнению с зараженными растениями у восприимчивых сортов ячменя, а у устойчивых сортов — до уровня зараженных растений. По всей видимости, повышение содержания эндогенной СК в растениях при инфицировании патогеном и воздействии СК является одним из звеньев сложной системы взаимодействия и взаимовлияния в цепи событий, приводящих к возрастанию устойчивости растений к фузариозной инфекции, однако количество СК не может превышать определенный концентрационный порог, необходимый для активации систем защиты и нормального функционирования растения.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при заражении растений ярового ячменя возбудителями фузариозной инфекции дифференцированно изменялись активность НАДФН-оксидазы, содержание H_2O_2 и эндогенной СК в зависимости от устойчивости сортов к фузариозу. Это может свидетельствовать об участии указанных показателей в формировании биохимических механизмов защиты растений от патогена. При инфицировании растений устойчивых сортов ячменя фузариозом активность НАДФН-оксидазы повышалась, что (совместно с фенолпероксидазами), по-видимому, может приводить к усилению генерации супероксидных радикал-анионов. Последние под действием супероксиддисмутазы превращаются в H_2O_2 [6], содержание которого, как было отмечено, повышается. Известно, что АФК и NO способны стимулировать синтез СК, которая, в свою очередь, интенсифицирует АФК-NO-зависимые реакции [4]. Показано, что NO активирует экспрессию гена ФАЛ, являющейся ключевым ферментом фенолпропаноидного метаболизма, а также синтеза СК [2]. Образующиеся H_2O_2 и СК после достижения определенных концентраций способны изменять экспрессию различных генов, в том числе активировать защитные гены. Экзогенная СК влияет на изменение активности НАДФН-оксидазы, содержания H_2O_2 и эндогенной СК в растениях ярового ячменя. При совместном влиянии СК и патогена по всей видимости происходит сложное взаимодействие, направленное на активацию и регуляцию ответных защитных реакций растений ячменя при заражении их возбудителями фузариоза.

1. *Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Цисельская Л.И.* Изменение активности фенилаланин-аммиак-лиазы, суммарных фенольных соединений и лигнина в проростках ярового ячменя при действии фузариозной инфекции и салициловой кислоты // *Вестн. Харьков. аграр. ун-та. Сер. Биология.* — 2007. — **2**. — С. 43—51.
2. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.И., Озерецковская О.Л.* Роль салициловой кислоты в болезнеустойчивости растений // *Прикл. биохимия и микробиология.* — 1999. — **35**, № 5. — С. 557—563.
3. *Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л.* Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота // *Там же.* — 2007. — **43**, № 4. — С. 405—411.
4. *Дмитриев А.П.* Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // *Физиология растений.* — 2003. — **50**, № 3. — С. 465—474.
5. *Максимов И.В., Черепанова Е.А.* Про-антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // *Успехи соврем. биологии.* — 2006. — **126**, № 3. — С. 250—261.
6. *Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // *Там же.* — 1993. — **113**, вып. 4. — С. 442—455.
7. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 294 с.
8. *Ebermann R., Couperus A.* A nonenzymatic method for determination of hydrogen peroxide and organic peroxides // *Anal. Biochem.* — 1987. — **165**, N 2. — P. 414—419.
9. *Mehdy Mona C.* Active oxygen species in plant defense against pathogen // *Plant Physiol.* — 1994. — **105**, N 2. — P. 467—472.
10. *Pinton R., Cakmak I., Marschner H.* Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants // *J. Exp. Bot.* — 1994. — **45**, N 270. — P. 45—50.
11. *Raskin I., Turner I., Welander W.* Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1989. — **86**. — P. 2214—2218.

Получено 04.12.2008

АКТИВНІСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗИ, ВМІСТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ У ПРОРОСТКАХ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ ПРИ ФУЗАРІОЗНІЙ ІНФЕКЦІЇ ТА ДІЇ ЕКЗОГЕННОЇ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ

О.О. Молодченкова

Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення Української академії аграрних наук, Одеса

Вивчено активність НАДФН-оксидази, вміст H_2O_2 та ендогенної саліцилової кислоти у проростках ярого ячменю за інфікування *Fusarium culmorum* та впливу екзогенної саліцилової кислоти. Показано, що при зараженні збудниками фузаріозу рослин сортів ярого ячменю, які різняться за стійкістю до цього патогену, активність НАДФН-оксидази, рівні H_2O_2 та ендогенної саліцилової кислоти змінювались диференційовано залежно від стійкості сортів. Екзогенна саліцилова кислота є активатором зміни вивчених біохімічних показників у рослинах. Припускається, що НАДФН-оксидаза, H_2O_2 та саліцилова кислота беруть участь у формуванні захисних реакцій рослин ярого ячменю в разі зараження фузаріозною інфекцією.

NADP(H)-OXIDASE ACTIVITY, H_2O_2 AND ENDOGENOUS SALICYLIC ACID LEVEL IN THE BARLEY SEEDLINGS AT THE FUSARIOSE INFECTION AND ACTION OF SALICYLIC ACID

О.О. Molodchenkova

Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivars Investigation, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
3 Ovidiopska road, Odesa, 65036, Ukraine

NADP(H)-oxidase activity, H_2O_2 and endogenous salicylic acid contents in the seedlings of the barley at the infection of *Fusarium culmorum* and under the action of salicylic acid were studied. The changes of the NADP(H)-oxidase activity, H_2O_2 and endogenous salicylic acid contents in the barley varieties with different resistance to *Fusarium culmorum* at the pathogenesis and influence of the salicylic acid has been demonstrated. The level of barley varieties resistance to *Fusarium Scab.* affected the rate of these changes. The exogenous salicylic acid is an activator of the changes of studied biochemical indexes of the plants. It was supposed that NADP(H)-oxidase, H_2O_2 and salicylic acid participate in the formation of the defense plant reactions of barley at the fusariose infection.

Key words: *Hordeum vulgare* L., NADP(H)-oxidase, H_2O_2 , *Fusarium* spp., salicylic acid.