

Ю. Е. Колупаев, А. А. Луговая, А. И. Обозный, Т. О. Ястреб,
Ю. В. Карпец, член-корреспондент НАН Украины Л. И. Мусатенко

Сигнальные посредники при индуцировании антиоксидантных ферментов растительных клеток жасмоновой кислотой

Показано, что обработка изолированных coleoptилей пшеницы жасмоновой кислотой (ЖАК) в концентрации 1 мкМ вызывает транзиторное усиление образования супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), последующее увеличение активности антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы — и повышение устойчивости к повреждающему прогреву. Все эти эффекты угнетает предварительная обработка coleoptилей ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом. Антагонист зависимого от фосфолипазы D образования фосфатидной кислоты бутанол-1 также нивелирует вызываемое ЖАК усиление генерации $O_2^{\cdot-}$, активацию СОД и каталазы и развитие теплоустойчивости coleoptилей. Его неактивный изомер бутанол-2 не влияет на исследуемые показатели. Сделано заключение, что повышение активности антиоксидантных ферментов и теплоустойчивости coleoptилей пшеницы экзогенной ЖАК опосредовано усилением генерации активных форм кислорода, связанным с активацией НАДФН-оксидазы. При этом посредником, задействованным в ее регуляции, может быть фосфатидная кислота.

Жасмоновая кислота (ЖАК) относится к фитогормонам, участвующим в развитии защитных реакций растений на биотические и абиотические стрессоры. В условиях последних механизмы физиологических эффектов ЖАК остаются малоизученными. Имеются сведения, указывающие на роль активных форм кислорода (АФК) в жасмонатном сигналинге [1]. Полагают, что некоторые эффекты ЖАК, в частности, индуцирования ею закрытия устьиц [2], повышения активности фенилаланинаммонийлиазы [3] связаны с усилением генерации АФК, обусловленным активацией НАДФН-оксидазы, поскольку данные явления нивелировались ингибиторами этого фермента. Установлена способность экзогенной ЖАК индуцировать ферментативную антиоксидантную систему растений, что может быть важно для развития устойчивости к абиотическим стрессорам [4, 5].

Недавно было показано, что при действии экзогенного метилжасмоната на клетки *Capsicum chinense* в них происходит повышение активности фосфолипазы D (ФЛД) [6], которая участвует в образовании фосфатидной кислоты — важного вторичного мессенджера липидного сигналинга. Известно, что фосфатидная кислота может принимать участие в активации НАДФН-оксидазы — одного из основных источников АФК, образующихся на клеточной поверхности [7]. Можно полагать, что существует взаимодействие между фосфатидной кислотой и АФК как сигнальными посредниками. Однако о том, участвуют ли эти посредники в процессах индуцирования стресспротекторных систем, задействованных в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессорам под влиянием экзогенной ЖАК, почти ничего не известно.

В связи с изложенным наша цель состояла в выяснении методом ингибиторного анализа возможной роли НАДФН-оксидазы и ФЛД в индуцировании экзогенной ЖАК антиоксидантных ферментов растительных клеток и их теплоустойчивости.

Материалы и методы исследования. В работе использовали отрезки базальной части coleoptилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, которые отделяли от 4-суточных этиолированных проростков, выращенных при 20 °С. Coleoptили являются адекватной моделью для исследования действия экзогенных соединений на устойчивость растений, определяющуюся преимущественно клеточными механизмами [8].

Отрезки coleoptилей инкубировали на простерилизованном 2%-м растворе сахарозы с добавлением пенициллина (Na-соль, 100 000 ед.) (контроль). Обработку coleoptилей ЖАК в конечной концентрации 1 мкМ проводили в течение 24 ч внесением ее в среду инкубации. Предварительно ЖАК растворяли в небольшом объеме этанола. В среду вариантов без ЖАК вносили эквивалентное количество этанола. Оптимальная концентрация ЖАК, в наибольшей степени повышающая теплоустойчивость coleoptилей, была установлена нами ранее [9]. В соответствующих вариантах опыта coleoptили обрабатывали в течение 26 ч ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом [10] в концентрации 1 мкМ или ингибитором ФЛД-зависимого образования фосфатидной кислоты 0,2%-м бутанолом-1 либо его неактивным аналогом бутанолом-2 в такой же концентрации [11]. В вариантах с комбинированной обработкой coleoptилей ЖАК и имидазолом или ЖАК и бутанолом-1 (бутанолом-2) соответствующие эффекторы добавляли в среду инкубации coleoptилей за 2 ч до внесения в нее ЖАК. Концентрации эффекторов были выбраны на основании предварительных опытов.

После завершения инкубации coleoptилей на растворах исследуемых соединений часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально летальному прогреву в водяном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при $43 \pm 0,1$ °С в течение 10 мин. Затем coleoptили помещали в чашки Петри с простерилизованным 2%-м раствором сахарозы с добавлением пенициллина. Через 2 сут после прогрева оценивали их повреждения по появлению специфического оттенка и потере тургора.

Выделение супероксидных анион-радикалов из отрезков coleoptилей во внешний раствор определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ) до формазана как описано ранее [8]. Для проверки специфичности определяемой генерации $O_2^{\cdot-}$ в специальных опытах в пробы добавляли супероксиддисмутазу (СОД) (50 ед./мл). СОД угнетала образование формазана не менее чем на 90%. В связи с этим считали, что количество восстановленного НСТ определяется содержанием $O_2^{\cdot-}$. Супероксидпродуцирующую активность оценивали как изменение светопоглощения реакционной смеси за единицу времени инкубации в расчете на один отрезок. За 100% принимали величину в контрольном варианте в первой временной точке наблюдений.

Для определения активности СОД (КФ 1.15.1.1) и каталазы (КФ 1.11.1.6) навеску растительного материала 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. Активность СОД определяли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата [8]. Активность каталазы определяли по количеству разложившегося пероксида водорода за единицу времени как описано ранее [8]. Содержание белка анализировали по методу Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [12]. Опыты проводили в трехкратной биологической повторности и каждый воспроизводили независимо три раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные отклонения.

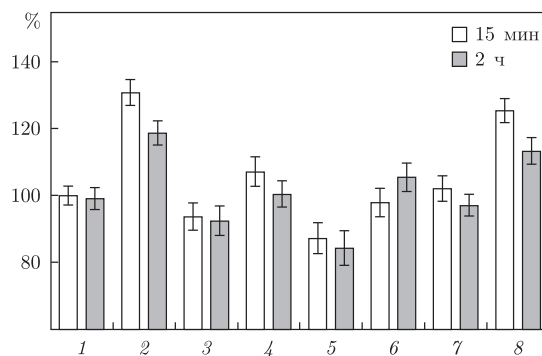


Рис. 1. Генерация супероксидного анион-радикала (% к контролю в начале эксперимента) колеоптилями пшеницы.

Здесь и на рис. 2, 3: 1 — контроль; 2 — ЖАК (1 мкМ); 3 — имидазол (1 мкМ); 4 — ЖАК (1 мкМ) + имидазол (1 мкМ); 5 — бутанол-1 (0,2%); 6 — ЖАК (1 мкМ) + бутанол-1 (0,2%); 7 — бутанол-2 (0,2%); 8 — ЖАК (1 мкМ) + бутанол-2 (0,2%)

Результаты исследования и их обсуждение. Как было установлено ранее, под действием ЖАК в колеоптилях пшеницы происходит транзиторное усиление генерации супероксидного анион-радикала, отмечающееся в течение первых двух часов после начала обработки [9]. В связи с этим влияние ингибитора НАДФН-оксидазы и антагониста ФЛД-зависимого образования фосфатидной кислоты на ЖАК-индуцируемую генерацию супероксидного анион-радикала исследовали через 15 мин и 2 ч после начала обработки колеоптилей ЖАК. Генерация $O_2^{\cdot-}$ колеоптилями пшеницы через 15 мин после начала обработки ЖАК увеличивалась более чем на 30%, а через 2 ч этот эффект снижался до 19% (рис. 1). Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол сам по себе вызывал тенденцию к снижению продукции супероксидного анион-радикала колеоптилями пшеницы и почти полностью нивелировал усиление образования АФК, индуцируемое ЖАК. Генерация $O_2^{\cdot-}$ снижалась и под влиянием ингибитора образования фосфатидной кислоты бутанола-1, который также снимал эффект повышения продукции супероксида, вызываемый ЖАК (см. рис. 1). Обработка колеоптилей бутанолом-2 (неактивным изомером бутанола-1) не оказывала влияния на образование $O_2^{\cdot-}$ и достоверно не изменяла проявление эффекта ЖАК.

Таким образом, можно полагать, что ключевым ферментом генерации супероксидного анион-радикала, активируемым действием на колеоптили ЖАК, является НАДФН-оксидаза. Повышение ее активности, по-видимому, зависит от образования фосфатидной кислоты, катализируемого ФЛД, поскольку оно нивелировалось действием бутанола-1.

Есть основания полагать, что вызываемое ЖАК транзиторное усиление генерации АФК колеоптилями пшеницы должно приводить к последующему увеличению активности антиоксидантных ферментов. Если этот процесс индуцируется АФК как сигнальными посредниками, ингибирование ферментов, прямо или опосредованно задействованных в их генерации, должно модифицировать активность ферментативных компонентов антиоксидантной системы. Под влиянием ЖАК происходило повышение активности СОД и каталазы в колеоптилях пшеницы, которое отмечалось как через 2, так и через 24 ч после начала обработки (рис. 2). Имидазол сам по себе существенно не влиял на активность этих ферментов, однако частично снимал повышение их активности, вызываемое действием ЖАК.

Обработка колеоптилей бутанолом-1 незначительно увеличивала активность СОД и практически не влияла на активность каталазы (см. рис. 2). При этом в сочетании

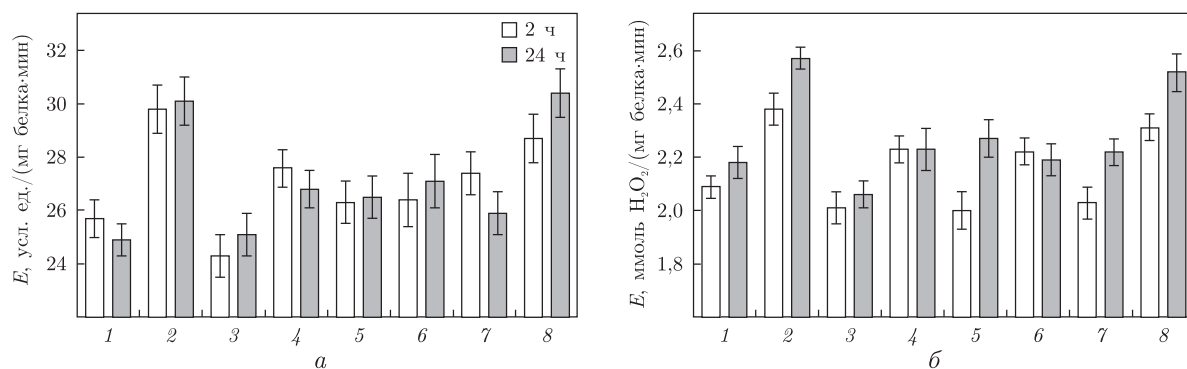


Рис. 2. Активность СОД (а) и каталазы (б) в coleoptилях пшеницы

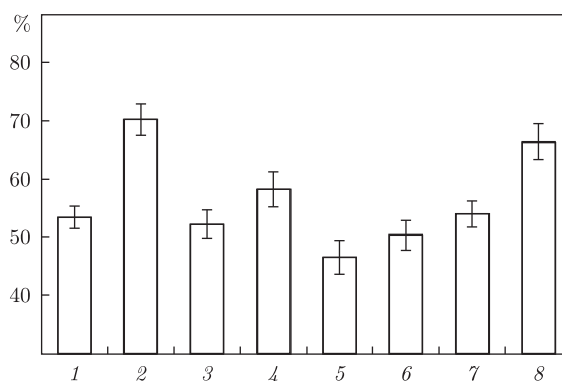


Рис. 3. Выживание (%) coleoptилей пшеницы после повреждающего прогрева (43 °С, 10 мин)

с ЖАК данный спирт, по крайней мере, частично снимал активирующее действие ЖАК на указанные ферменты. Под влиянием бутанола-2 в coleoptилях происходило незначительное (недостовверное при $p \leq 0,05$) повышение активности СОД, связанное, по-видимому, с его неспецифическим действием на coleoptили пшеницы, при этом активность каталазы не изменялась. Бутанол-2 не влиял на проявление эффекта активации СОД и каталазы, вызываемого обработкой coleoptилей ЖАК (см. рис. 2).

Активация или ингибирование антиоксидантных ферментов, являющихся компонентами стресспротекторной системы, может сказываться на устойчивости coleoptилей пшеницы к стрессорам, в частности к повреждающему прогреву. В наших экспериментах под влиянием ЖАК теплоустойчивость coleoptилей повышалась, ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол существенно не влиял на теплоустойчивость отрезков, но в значительной степени уменьшал положительное влияние ЖАК (рис. 3). Бутанол-1 заметно не влиял на устойчивость coleoptилей к прогреву, но в то же время существенно угнетал повышение их теплоустойчивости, вызываемое ЖАК. Его неактивный аналог бутанол-2 не вызывал изменения теплоустойчивости coleoptилей пшеницы и не влиял на ее индуцирование ЖАК.

Таким образом, есть основания полагать, что стресспротекторное влияние ЖАК на coleoptили пшеницы опосредовано образованием АФК, зависимым от НАДФН-оксидазы, поскольку вызываемые ЖАК повышение теплоустойчивости coleoptилей пшеницы и активация антиоксидантных ферментов угнетались ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом (см. рис. 2, 3). В регуляции активности НАДФН-оксидазы могут принимать участие различ-

ные посредники, в частности ионы кальция [13] и фосфатидная кислота [7]. Известно, что в системе *in vitro* фосфатидная кислота стабилизирует НАДФН-оксидазный комплекс мембранной фракции, выделенной из растительных клеток, и тем самым усиливает генерацию АФК [7]. Показано участие фосфатидной кислоты в усилении продуцирования АФК растительными клетками в условиях холодового стресса [14]. Вполне возможно, что ЖАК-индуцированное повышение активности НАДФН-оксидазы опосредовано участием фосфатидной сигнальной системы. В пользу этого предположения свидетельствует снятие бутанолом-1 (антагонистом ФЛД-зависимого образования фосфатидной кислоты) влияния ЖАК на генерацию колеоптилями АФК, активность антиоксидантных ферментов и теплоустойчивость. Предположение о влиянии ЖАК на образование фосфатидной кислоты согласуется с данными [6], полученными путем непосредственного определения активности ФЛД в растительных клетках.

1. Ozawa R., Bertea C. M., Foti M. et al. Exogenous polyamines elicit herbivore-induced volatiles in *Lima bean* leaves: involvement of calcium, H₂O₂ and jasmonic acid // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – **50**. – P. 2183–2199.
2. Suhita D., Raghavendra A. S., Kwak J. M., Vavasseur A. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate – and abscisic acid-induced stomatal closure // *Plant Physiol.* – 2004. – **134**. – P. 1536–1545.
3. Луы Ю., Пан Ц. Х., Ян Х. Р. и др. Взаимосвязь между H₂O₂ и жасмоновой кислотой в ответной реакции листьев гороха на поранение // *Физиология растений.* – 2008. – **56**, № 6. – С. 851–862.
4. Kumari G. J., Reddy A. M., Naik S. T. et al. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings // *Biol. Plant.* – 2006. – **50**. – P. 219–226.
5. Shana C., Liang Z. Jasmonic acid regulates ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress // *Plant Sci.* – 2010. – **178**. – P. 130–139.
6. Altúzar-Molina A. R., Muñoz-Sánchez J. A., Vázquez-Flota F. et al. Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cells // *Plant Physiol. Biochem.* – 2011. – **49**. – P. 151–158.
7. Sang Y., Cui D., Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2001. – **126**. – P. 1449–1458.
8. Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. Влияние нитропрусида натрия на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы: связь эффектов с образованием и обезвреживанием активных форм кислорода // *Физиология растений.* – 2011. – **58**, № 6. – С. 883–890.
9. Карпец Ю. В., Колупаев Ю. Е., Мусатенко Л. И. и др. Жасмоновая кислота индуцирует теплоустойчивость колеоптилей пшеницы и их ферментативную антиоксидантную систему // *Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту.* – 2012. – Вип. 3(27). – С. 22–30.
10. Hung K. T., Hsu Y. T., Kao C. H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // *Physiol. Plant.* – 2006. – **127**. – P. 293–303.
11. Lanteri M. L., Laxalt A. M., Lamattina L. Nitric oxide triggers phosphatidic acid accumulation via phospholipase D during auxin-induced adventitious root formation in *Cucumber* // *Plant Physiol.* – 2008. – **147**. – P. 188–198.
12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
13. Глянько А. К., Ищенко А. А. Структурные и функциональные особенности НАДФН-оксидазы растений (обзор) // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 2010. – **46**. – С. 509–518.
14. Gupta K. J., Hincha D. K., Mur L. A. J. NO way to treat a cold // *New Phytol.* – 2011. – **189**. – P. 360–363.

Харьковский национальный аграрный
университет им. В. В. Докучаева
Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 12.04.2013

Ю. Є. Колупаєв, Г. А. Лугова, О. І. Обозний, Т. О. Ястреб, Ю. В. Карпець,
член-кореспондент НАН України Л. І. Мусатенко

Сигнальні посередники при індукуванні антиоксидантних ферментів рослинних клітин жасмоновою кислотою

Показано, що обробка ізольованих колеоптилів пшениці жасмоновою кислотою (ЖАК) у концентрації 1 мкМ спричиняє транзиторне посилення утворення супероксидного аніон-радикала ($O_2^{\cdot-}$), наступне збільшення активності антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази (СОД) і каталази — і підвищення стійкості до ушкоджуючого прогріву. Всі ці ефекти пригнічує попередня обробка колеоптилів інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом. Антагоніст залежного від фосфоліпази D утворення фосфатидної кислоти бутанол-1 також нівелює спричинювані ЖАК посилення генерації $O_2^{\cdot-}$, активацію СОД і каталази та розвиток теплостійкості колеоптилів. Його неактивний ізомер бутанол-2 не впливає на досліджувані показники. Зроблено висновок, що підвищення активності антиоксидантних ферментів і теплостійкості колеоптилів пшениці екзогенною ЖАК опосередковано посиленням генерації активних форм кисню, пов'язаним з активацією НАДФН-оксидази. При цьому посередником, задіяним в її регуляції, може бути фосфатидна кислота.

Yu. E. Kolupaev, G. A. Lugova, A. I. Oboznyi, T. O. Yastreba, Yu. V. Karpets,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine L. I. Musatenko

Signal intermediates at the induction of antioxidant enzymes of plant cells by jasmonic acid

It is shown that the treatment of wheat isolated coleoptiles with jasmonic acid (JA) in a concentration of 1 μ M causes the transitional intensifying of the generation of superoxide anion-radical ($O_2^{\cdot-}$), the subsequent rise of activity of antioxidant enzymes — superoxide dismutase (SOD) and catalases — and the increase of resistance to damaging heating. All these effects were suppressed by the preliminary treatment of coleoptiles with imidazole, the inhibitor of NADPH oxidase. Butanol-1, the antagonist of phosphatidic acid formation dependent on phospholipase D, also leveled the intensifying of the generation $O_2^{\cdot-}$, activation of SOD and catalase, and development of coleoptiles heat resistance caused by JA. Its inactive isomer butanol-2 did not influence the investigated parameters. The conclusion is made that the increase of the activity of antioxidant enzymes and the heat resistance of wheat coleoptiles by exogenous JA is mediated by the intensifying of the generation of reactive oxygen species related to the NADPH oxidase activation. Thus, phosphatidic acid can be the intermediate involved in its regulation.