

УДК 581.192.7

О. В. ЕВДОКИМОВА, Л. Ф. КАБАШНИКОВА, Г. Е. САВЧЕНКО

**СОДЕРЖАНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА
В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE*) ПРИ ОБРАБОТКЕ САЛИЦИЛАТАМИ**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: ewdokimova@inbox.ru

(Поступила в редакцию 16.01.2014)

Введение. Исследование проблемы системного защитного ответа в растениях позволило выявить особую роль в этом процессе орто-гидроксibenзойной (салициловой) кислоты (СК), относящейся к группе растительных фенольных соединений. Установлено, что СК как многофункциональная молекула, сочетающая свойства фитогормона и эндогенного сигнального интермедиата, участвует во многих физиологических процессах, включая термогенез у ароидных [1], индуцирование цветения [2], прорастание семян [3], регуляцию транспорта органических веществ [4]. СК является стрессовым метаболитом: действие ряда неблагоприятных факторов вызывает значительное возрастание содержания эндогенной СК [5, 6]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что СК выступает в качестве индуктора системной приобретенной устойчивости в растениях. Отмечено повышение содержания салициловой кислоты при формировании устойчивости растений к различным возбудителям болезней [7, 8]. Известно, что нарушение процесса синтеза или стимуляция распада СК ведет к возрастанию восприимчивости растений [9], в то время как обработка растений экзогенной СК повышает сопротивляемость ко многим биотрофным патогенам [7, 8, 10]. Обнаружена высокая эффективность не только экзогенной СК, но и ее структурных аналогов – бензойной, сульфосалициловой и метилсалициловой кислот [11]. Однако одновременно установлено, что протекторный эффект экзогенных салицилатов зависит от их концентрации и может сменяться повреждающим действием, вплоть до появления участков некроза на листьях обработанных растений. Для объяснения подобных эффектов привлекаются данные о влиянии салицилатов на про-антиоксидантное равновесие [4]. В настоящее время превалирует представление о том, что экзогенная СК влияет на устойчивость растений, активируя основные сигнальные сети, работа которых обеспечивается участием кальция и активных форм кислорода (АФК) и приводит к накоплению PR-белков [4, 12, 13].

В связи с тем что применение препаратов, содержащих СК или ее производные, рассматривается как перспективный способ повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам, важно оценить влияние этих веществ на эндогенное содержание СК в растении. Имеющиеся в литературе данные о влиянии экзогенной СК на ее эндогенный пул в растении противоречивы: наблюдали как повышение [14], так и значительное снижение [15] содержания эндогенных салицилатов.

В данной работе изучали влияние экзогенной СК и ее производных (3,5-динитросалициловой кислоты, этилсалицилата и фенилсалицилата) на общий уровень эндогенной СК и содержание АФК в листьях проростков ячменя.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись 6-дневные проростки ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Магутны, выращенные при температуре +23 °C (± 2 °C) в режиме 14 ч света (интенсивность 150 мкмоль квантов \cdot м⁻² \cdot с⁻¹) и 10 ч темноты. В работе использовали коммерческие препараты СК, 3,5-динитросалициловой кислоты и фенилсалицилата, растворенные в 100 мкл этилового спирта и затем разбавленные дистиллированной водой до конечной

концентрации 10^{-5} М. Поскольку этилсалицилат гидрофобен, в дистиллированную воду добавляли необходимое количество реактива и интенсивно встряхивали до образования равномерной эмульсии, которую сразу же использовали. Обработку растений салицилатами проводили двумя способами. В одних экспериментах семена (100 шт.) замачивали в 5 мл раствора СК или ее производных (контроль – в дистиллированной воде) в течение 4 ч, затем высаживали их на сетки и далее проращивали на водопроводной воде. В другом типе экспериментов семена проращивали на водопроводной воде, а в возрасте 3 дней проростки опрыскивали растворами салицилатов или дистиллированной воды (контроль) с помощью пульверизатора из расчета 4 мл на 100 проростков. Содержание СК в проростках оценивали на 6-е сутки после высаживания семян.

Анализировали часть листовой пластинки над coleoptilem, расположенную ниже 1 см от верхушки. Навеску листьев (0,5 г) растирали в жидком азоте и дважды экстрагировали 70%-ным и 90%-ным этанолом, каждый раз центрифугируя гомогенат при 13 000 g в течение 15 мин. Супернатанты двух последовательных экстракций объединяли (10 мл) и вновь центрифугировали. Спирт испаряли под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, при 40 °С. Сконцентрированные экстракты гидролизовали 4 н HCl в течение 60 мин при температуре 80 °С. Гидролизаты осветляли центрифугированием и извлекали салицилаты из супернатантов двукратной экстракцией смесью этилацетат:циклогексан (1 : 1). Органические растворители (6 мл) испаряли, осадок смывали 0,5 мл подвижной фазы (25%-ный метанол в ацетатном буфере, pH 5,5), центрифугировали, после чего определяли количественное содержание СК с помощью ВЭЖХ Shimadzu LC 20 Prominence (Shimadzu, Япония). Изократное разделение СК подвижной фазой проводили на колонке EC 250/3 Nucleodur Hilik, 5 мкм (Macherey-Nagel, Германия) при скорости потока 0,5 мл/мин. В качестве стандарта применяли коммерческий препарат СК (Acros Organics, USA). Наличие СК регистрировали с помощью флуоресцентного детектора ($\lambda_{\text{возб}} = 300$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 415$ нм). В использованной нами системе выход СК регистрировался через $3,8 \pm 0,1$ мин (рис. 1).

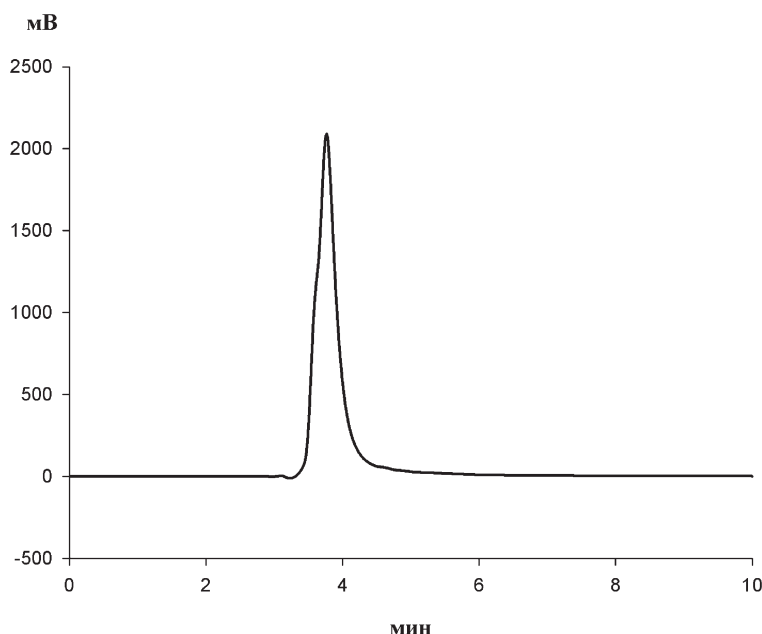


Рис. 1. Хроматограмма гидролизованного экстракта листьев ячменя

Уровень АФК определяли по количеству дихлорфлуоресцеина, образовавшегося при окислении 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата в экстрактах листьев, регистрируя флуоресценцию при $\lambda_{\text{возб}} = 496$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 524$ нм на спектрофлуориметре Solar 2203 (Беларусь) [16].

В работе представлены данные трех независимых экспериментов, проведенных в трехкратной биологической повторности. Статистическую обработку данных проводили по [17].

Результаты и их обсуждение. В таблице показано влияние обработки семян салицилатами на всхожесть и показатели морфоструктуры 6-дневных проростков ячменя. Видно, что предва-

Морфоструктурные параметры 6-дневных проростков ячменя при замачивании семян в растворах СК и ее производных

Вариант обработки	Всхожесть на 6-е сутки, %	Длина проростка, см	Ширина листовой пластинки, мм	Длина корня, см
Контроль	89±1,0	12,0±0,14	5,8±0,26	11,6±0,36
Салициловая кислота, 10 ⁻⁵ М	85±0,6*	11,7±0,20	5,8±0,27	11,5±0,76
3,5-Динитро-салициловая кислота, 10 ⁻⁵ М	84±4,6	11,5±0,24*	5,7±0,14	10,8±0,62
Фенилсалицилат, 10 ⁻⁵ М	90±2,1	11,9±0,35	5,8±0,13	11,0±0,76
Этилсалицилат, 10 ⁻⁵ М	75±6,1*	9,2±0,44**	5,6±0,15	9,1±0,24**

*Отличия от контроля значимы при $P < 0,05$

**При $P < 0,001$.

рительное замачивание семян на растворе фенилсалицилата не влияло на всхожесть и морфоструктурные показатели 6-дневных проростков. Действие СК и 3,5-динитросалициловой кислоты проявилось в небольшом снижении данных параметров. Этилсалицилат значительно ингибировал прорастание семян и рост проростков: всхожесть снижалась в среднем на 16 %, высота проростков – на 23 %, а длина корней – на 20 %. Известно, что природные фенольные соединения обладают рострегулирующей активностью и являются ингибиторами многих ферментов [18], поэтому в высоких концентрациях могут вызывать подавление роста. Согласно литературным данным, использованная нами концентрация экзогенной СК являлась оптимальной для индукции устойчивости и не вызывала ингибиторных эффектов у большинства объектов [3, 11]. В наших экспериментах СК статистически значимо снижала всхожесть семян.

В растении салицилаты представлены в виде трех основных форм: «свободной» СК, ее эфиров и фенольных гликозидов. Глюкозилсалицилат физиологически не активен и рассматривается как запасная форма СК, метилсалицилат считается транспортной формой СК, в которую он легко превращается в тканях-мишенях [4]. Обработка растений экзогенной СК, как правило, изменяет эндогенное содержание салицилатов, но, как отмечено выше, эффекты могут быть противоположными у разных объектов [14, 15]. Это может быть связано как с разницей в конститутивном уровне СК у растений (от 100 нг/г сырой массы у арабидопсиса до 30 000 нг/г сырой массы у риса [14]), так и с используемой для обработки концентрацией экзогенной СК и продолжительностью ее воздействия. В наших экспериментах 4-часовая обработка семян ячменя СК и ее производными повышала общий эндогенный пул салицилатов в листьях 6-дневных проростков (рис. 2, а). При этом действие СК, 3,5-динитросалициловой кислотой и фенилсалицилата имело

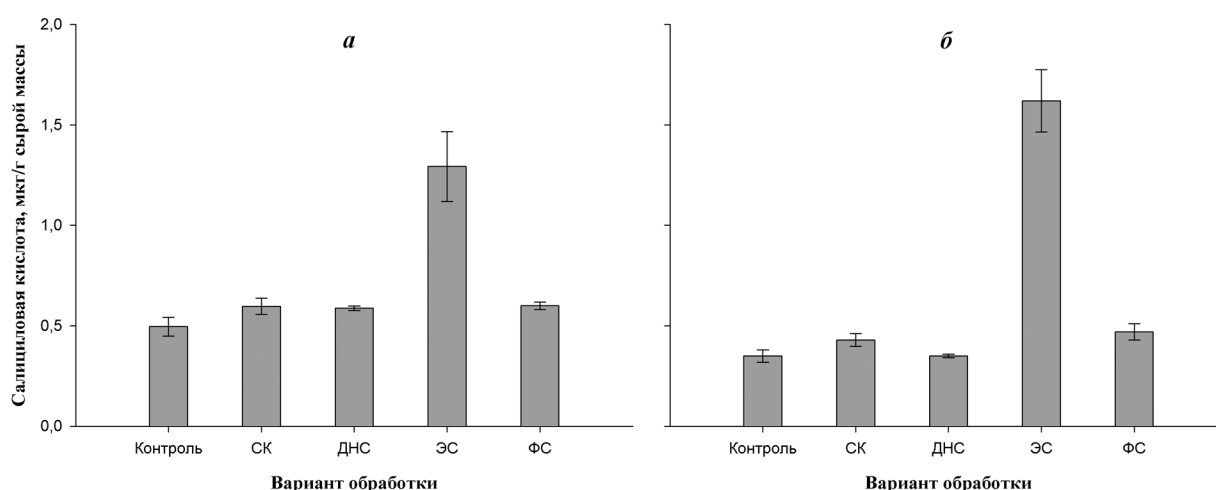


Рис. 2. Влияние обработки СК и ее производными на содержание СК в листьях 6-дневных проростков ячменя: а – замачивание семян на 4 ч в растворах СК, 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС), этилсалицилата (ЭС) и фенилсалицилата (ФС); б – однократное опрыскивание проростков растворами

сходный по интенсивности эффект – содержание общей СК возрастало в 1,2 раза по сравнению с контролем. Этилсалицилат приводил к повышению пула СК более чем в 2,5 раза ($P < 0,001$). Не исключено, что эмульсионная форма раствора этилсалицилата могла приводить к образованию пленки на поверхности семян, тем самым повышая локальную концентрацию салицилата, или нарушать газообмен и влагопроницаемость. Но главной причиной нарушения всхожести и ингибирования роста проростков могло быть существенное возрастание содержания эндогенной СК.

При обработке 3-дневных проростков растворами СК и ее производных не было выявлено ни видимых местных эффектов экзогенных салицилатов на ткань листьев, ни влияния на морфоструктурные параметры 6-дневных проростков (данные не представлены). Обработка 3-дневных проростков раствором 3,5-динитросалициловой кислоты не изменяла общее содержание СК в листьях по сравнению с контролем (рис. 2, б). Однако действие экзогенной СК и фенилсалицилата приводило к достаточно заметному возрастанию общего пула СК в листьях – на 23 и 34 % соответственно. При обработке же этилсалицилатом наблюдали значительное возрастание эндогенного уровня СК в листьях (в 4,6 раза по сравнению с контролем, $P < 0,01$). Таким образом, при обоих способах введения экзогенных салицилатов пул СК в листьях увеличивался, но степень повышения содержания эндогенной СК при действии разных производных значительно отличалась. Возможно, одной из причин этих отличий является разная скорость метаболизма экзогенных салицилатов.

Анализ общего содержания АФК в ткани листа в наших экспериментах показал, что под действием этилсалицилата оно повысилось на 27 % по сравнению с контролем ($P < 0,001$, рис. 3). Следует также отметить, что влияние этилсалицилата на относительное увеличение содержания АФК гораздо менее выражено, чем на относительный прирост содержания эндогенной СК.

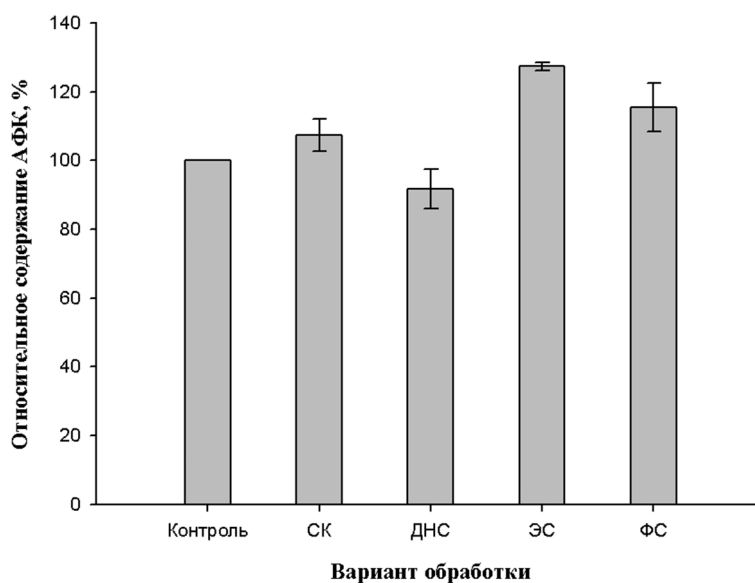


Рис. 3. Влияние обработки семян экзогенными СК и ее производными на относительное содержание АФК в листьях 6-дневных проростков ячменя. Семена замачивали на 4 ч в растворах СК, ДНС, ЭС и ФС

Обработка СК и фенилсалицилатом приводила к меньшему повышению уровня АФК в листьях 6-дневных проростков – на 7 и 15 % соответственно. Полученные результаты согласуются в целом с предположением о том, что эффекты СК в значительной степени связаны с ее способностью увеличивать содержание АФК как необходимого звена в реализации защитного действия СК [4, 12, 19]. Нельзя при этом игнорировать и возможность динамического характера ответной реакции. Так, имеются данные о том, что повышение устойчивости coleoptилей и интактных проростков пшеницы к повреждающему нагреванию и действию хлорида натрия под влиянием экзогенной СК сопровождалось временным возрастанием содержания АФК и обратимой активацией перекисного окисления липидов [4].

Несмотря на то что уровень АФК как один из важных показателей реакции растения на воздействие является в нашем случае информативным, несомненно, что для оценки эффективности экзогенных салицилатов как индукторов устойчивости, необходимо расширить набор параметров, характеризующих активацию защитных механизмов. Это особенно важно для того чтобы соотнести возможный защитный эффект с негативными изменениями физиологического и биохимического характера в каждом конкретном случае.

Заключение. Показано, что обработка семян и проростков ячменя потенциальными индукторами системной устойчивости: салициловой кислотой (СК), 3,5-динитросалициловой кислотой, этилсалицилатом и фенилсалицилатом (10^{-5} М), вызывала разное по величине повышение эндогенного пула салицилатов в листьях. Возрастание общего содержания СК более чем в 2 раза регистрировалось в варианте с этилсалицилатом, что сопровождалось подавлением роста проростков ячменя и существенным увеличением в них содержания АФК. 3,5-Динитросалициловая кислота незначительно влияла на перечисленные параметры. Обработка растворами СК и фенилсалицилата вызывала умеренное повышение содержания эндогенной СК, при этом не регистрировалось негативное действие на морфометрические показатели. Полученные результаты указывают на то, что в качестве индукторов устойчивости целесообразно использовать СК и фенилсалицилат.

Литература

1. Raskin I., Turner I. M., Melande W. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 2214–2218.
2. Raskin I. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P. 439–463.
3. Пуеничная Л. А., Шуканов В. П., Вольнец А. П., Гриб С. И. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2009. № 3. С. 10–14.
4. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. // Вестн. Харьковского Национального Аграрного университета. Сер. биол. 2009. Т. 2, № 17. С. 19–39.
5. Sawada H., Shim Ie-Sung, Usui K. // Plant Cell Physiol. 2004. Vol. 45. P. 121–129.
6. Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.-J. // Plant Physiol. 2003. Vol. 132. P. 272–281.
7. Yalpani N., Silverman P., Wilson T., et al. // Plant Cell. 1991. Vol. 3. P. 809–818.
8. Крючкова Л. А., Маковейчук Т. И., Яворская В. К., Курчий Б. А. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2006. Т. 38, № 1. С. 45–52.
9. Дмитриев О. П. // Физиология растений на рубеже тысячелетия. Киев, 2001. С. 38–51.
10. Huang A., She X. // J. Shaanxi Normal Univ. Natur. Sci. Ed. 2003. Vol. 31, № 3. P. 107–109.
11. Senaratna T., Merritt D., Dixon K. et al. // Plant Growth Regul. 2003. Vol. 39, № 1. P. 77–81.
12. Полуксенова В. Д. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2009. № 1. С. 48–60.
13. Martinez C., Vaccou J.-C., Bresson E. et al. // Plant Physiol. 2000. Vol. 122, № 3. P. 757–766.
14. Молодченкова О. О. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2009. Т. 41, № 4. С. 321–327.
15. Rakhmankulova Z. F., Fedyayev V. V., Rakhmatulina S. R., et al. // Russian Journal of Plant Physiology. 2010. Vol. 57, № 6. P. 778–783.
16. Козел Н. В., Шальго Н. В. // Физиол. растен. 2009. Т. 56, № 3. С. 351–358.
17. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Изд. 3-е, исправленное. Мн., 1973.
18. Вольнец А. П., Пальченко Л. А. // Метаболизм и механизм действия фитогормонов. Иркутск, 1979. С. 132–134.
19. Шакирова Ф. М. // Агрехимия. 2000. № 11. С. 87–94.

O. V. EVDOKIMOVA, L. F. KABASHNIKOVA, G. E. SAVCHENKO

SALICYLIC ACID AND REACTIVE OXYGEN SPECIES CONTENT IN LEAVES BARLEY (*HORDEUM VULGARE*) AT SALICYLATES TREATMENTS

Summary

The change of endogenous pool of salicylates in barley leaves after seed and seedling treatments with salicylic acid (SA) and its derivatives: 3,5-dinitrosalicylic acid, ethyl salicylate and phenyl salicylate (10^{-5} M) was investigated. Ethyl salicylate more than twice increased total SA content in leaves, moreover, seeds soaking in this solution led to seedling growth inhibition and significant increase ROS content in leaves. Exogenous CK, 3,5-dinitrosalicylic acid and phenyl salicylate increased endogenous pool of salicylates in moderate level (20 to 34 %). The possibility of using SA and phenyl salicylate as inductors of systemic resistance in barley plants through increasing endogenous SA is discussed.