



УДК 631.811.98:581.52

ВПЛИВ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ НА ВМІСТ ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ У ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ *TRITICUM AESTIVUM* L. ТА СОНЯШНИКА *HELIANTHUS ANNUUS* L. ЗА ДІЇ ЙОНІВ КАДМІЮ

М. Кобилецька, О. Терек

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: kobyletskam@mail.ru

Досліджено вплив саліцилової кислоти (СК) у концентрації 0,05 ммоль/л на вміст вільних амінокислот у проростках пшениці *Triticum aestivum* L. та соняшника *Helianthus annuus* L. за дії кадмію хлориду у концентрації 10 та 100 мкмоль/л. За обробки насіння СК зростає вміст вільних амінокислот у тканинах коренів і пагонів досліджуваних проростків. За сумісного впливу дії СК та кадмію хлориду виявлено синергізм дії цих двох сполук, котрий проявлявся у значному збільшенні вмісту вільних амінокислот.

Ключові слова: саліцилова кислота, вільні амінокислоти, *Triticum aestivum* L., *Helianthus annuus* L., стрес, йони кадмію.

ВСТУП

Згідно зі сучасними уявленнями, одним із індукторів стійкості рослин до біотичних і абіотичних факторів вважається саліцилова кислота (СК). Встановлено, що екзогенна СК індуктує експресію генів і синтез низки білків, у тому числі й тих, що належать до PR-білків (pathogen resistant protein) – білків стійкості до патогенів, а також утворення фітоалексинів [20, 5]. СК бере участь в активації низки сигнальних систем рослин, таких як НАДФН-оксидазна, NO-сигнальна, MAP-кіназна та, можливо, інших систем [3, 4, 18]. У низці досліджень показана можливість підвищення стійкості пшениці до абіотичних стресових факторів за дії екзогенної СК [1, 9, 13].

Однією з неспецифічних реакцій рослинного організму у відповідь на дію стресових факторів є збільшення пулу низькомолекулярних сполук (НМС) різної природи: розчинних вуглеводів, рибозомононуклеозидфосфатів, різноманітних нітрогеновмісних сполук – вільних амінокислот, серед них і проліну, пептидів, поліамінів, бетаїнів [2, 8, 6, 12]. Низькомолекулярні сполуки нітрогену, які нагромаджуються за умов стресів, становлять особливий інтерес, оскільки ці речовини не лише посідають важливе місце у формуванні осмотичного потенціалу клітин, а й виконують різноманітні протекторні та регуляторні функції [11]. Проте незважаючи на численні відомості про захисну роль вільних амінокислот, зокрема проліну, бетаїнів, поліамінів у рослинах за несприятливих умов, уявлення про функціональне значення цих

сполук мають дискусійний характер. Нагромадження низькомолекулярних сполук за умов стресів різної природи можна тлумачити по-різному: з одного боку – як свідчення існування деяких ще повністю не з'ясованих універсальних функцій цих сполук, а з іншого – як результат деструктивних процесів, перш за все протеолізу, що супроводжують стрес [7, 15, 17].

Тому ми спрямували свою увагу на дослідження змін вмісту вільних амінокислот у тканинах проростків пшениці *Triticum aestivum* L. та соняшника *Helianthus annuus* L. за дії 0,05 мкмоль/л СК та кадмію хлориду концентрацією 10 та 100 мкмоль/л.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для досліджень використовували тридобові проростки пшениці *Triticum aestivum* L. сорту Крижинка та соняшника *Helianthus annuus* L. сорту Світоч. Насіння замочували у розчині саліцилової кислоти у концентрації 0,05 ммоль/л протягом трьох годин, для контролю насіння замочували протягом такого ж часу в дистильованій воді. У подальшому насіння переносили на дистильовану воду в чашки Петрі для проростання протягом трьох діб у термостат за температури 24°C. Опісля проростки переносили на розчини, які містили CdCl₂ у концентраціях 10 та 100 мкмоль/л і дистильовану воду (контроль). Для визначення вмісту вільних амінокислот [10] рослинний матеріал гомогенізували у 10% розчині етанолу, після чого гомогенат фільтрували через беззольний фільтр. Відбирали 1 мл відфільтрованої суміші, додавали 1 мл ацетатного буферу (рН 4,7; 50 мМ), 3 мл нігдринового реактиву та 0,1 мл 3% розчину аскорбінової кислоти. Отриману суміш нагрівали на водяній бані за 100°C 15 хвилин. Після охолодження суміш доводили до 20 мл 60% розчином етанолу і вимірювали значення екстинції на спектрофотометрі (Model UV-9100) при довжині хвилі 570 нм. Результати опрацьовували статистично з визначенням середнього арифметичного зі стандартною похибкою ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

З отриманих нами результатів (рис. 1) видно, що за дії стресового фактора – кадмію хлориду – зростає загальний вміст амінокислот у коренях і пагонах проростків пшениці щодо контролю. Досить значне зростання цього показника спостерігається також і у проростків за дії саліцилової кислоти.

Загалом у відповідь на стреси у рослинному організмі відбувається значна перебудова метаболізму нітрогеновмісних сполук, проявом якої є зміни в усьому спектрі низькомолекулярних сполук нітрогену: нагромадження та зміна співвідношення вільних амінокислот, істотне підвищення вмісту амінокислоти проліну [1, 14], утворення бетаїнів, збільшення рівня діамінів і поліамінів [19].

Результати наших досліджень показали стрімке зростання загального вмісту амінокислот у коренях проростків пшениці за дії СК (майже у 5,5 разу). За дії кадмію хлориду в досліджуваних концентраціях теж відбувалося збільшення вмісту вільних амінокислот, зокрема удвічі в коренях проростків за дії кадмію хлориду концентрацією 10 мкмоль/л; у 3,5 разу в коренях проростків за сумісної дії важкого металу цієї ж концентрації та СК; майже удвічі за дії 100 мкмоль/л кадмію хлориду та у 2,7 разу за сумісної дії СК і 100 мкмоль/л кадмію хлориду.

Вміст вільних амінокислот у пагонах проростків також зростав у всіх варіантах досліджень – в 1,8 разу в проростках за дії СК; у 2,5 разу в проростках за дії 10 мкмоль/л кадмію хлориду; в 1,5 разу за дії 100 мкмоль/л кадмію хлориду й удвічі

в проростках за одночасного впливу СК та 100 мкмоль/л кадмію хлориду. Найвищим вмістом вільних амінокислот характеризувалися проростки, що зазнали сумісного впливу СК та 10 мкмоль/л кадмію хлориду – у 3,6 разу щодо контролю.

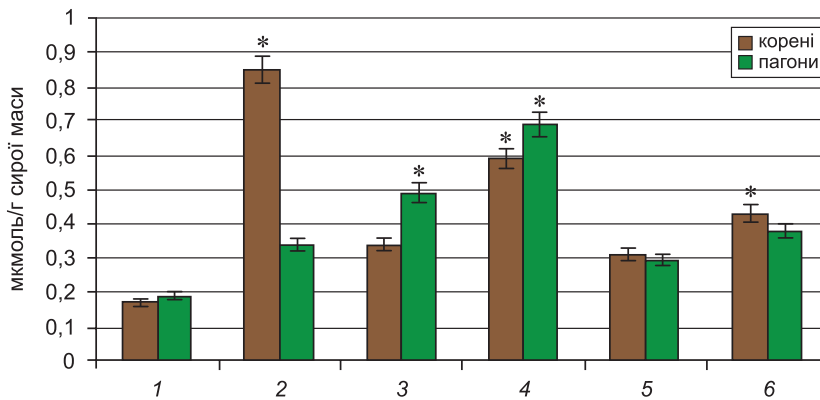


Рис. 1. Вміст вільних амінокислот у проростках пшениці *Triticum aestivum* L. за дії СК та кадмію хлориду: 1 – контроль; 2 – СК (0,05 ммоль/л); 3 – CdCl₂ (10 мкмоль/л); 4 – СК+CdCl₂ (10 мкмоль/л); 5 – CdCl₂ (100 мкмоль/л); 6 – СК+CdCl₂ (100 мкмоль/л). * – відмінність достовірна щодо контролю р≤0,05

Fig. 1. Content of free amino acids in the wheat *Triticum aestivum* L. germs under the salicylic acid and cadmium chloride influence: 1 – control; 2 – СК (0.05 mM); 3 – CdCl₂ (10 μM); 4 – СК+CdCl₂ (10 μM); 5 – CdCl₂ (100 μM); 6 – СК+CdCl₂ (100 μM). * – significant differences compared with control at p≤0,05

Щодо шляхів збільшення загального пулу вільних амінокислот і низькомолекулярних пептидів за стресових умов, зокрема дії важких металів, то головною причиною цього явища вважається протеоліз [14, 18, 19]. Механізми регуляції активності протеаз різноманітні, серед них особливе місце посідають специфічні білкові інгібітори [5, 9]. У регуляції цього процесу можуть брати участь і вільні радикали, кількість яких значно зростає за дії на клітини пошкоджуючих агентів різної природи [13, 17].

Ми також проводили визначення загального вмісту амінокислот у проростках соняшника за сумісної дії СК і кадмію хлориду концентрацією 10 та 100 мкмоль/л. Отримані результати представлені на рис. 2.

Проаналізувавши отримані результати, слід зазначити, що у проростках соняшника вміст вільних амінокислот за дії досліджуваного стресового фактора та СК, як і у проростках пшениці, істотно зростає. При цьому у тканинах коренів проростків соняшника концентрація вільних амінокислот була значно нижчою ніж у пагонах, на відміну від проростків пшениці, в яких більший вміст вільних амінокислот виявлено у коренях.

Найвищу концентрацію вільних амінокислот відзначено у коренях проростків соняшника за одночасної дії СК та 10 мкмоль/л кадмію хлориду, у цьому варіанті значення перевищує показники контролю майже втричі. Найменший вміст вільних амінокислот виявлено у коренях проростків, на які впливали кадмію хлоридом у концентрації 100 мкмоль/л, але і в цьому випадку показник був удвічі вищим порівняно з контролем. У коренях проростків за сумісної дії СК і 100 мкмоль/л кадмію хлориду вміст вільних амінокислот перевищував контрольне значення у 2,5 разу; за дії 10 мкмоль/л кадмію хлориду у 2,8 разу та за дії лише СК у 2,7 разу.

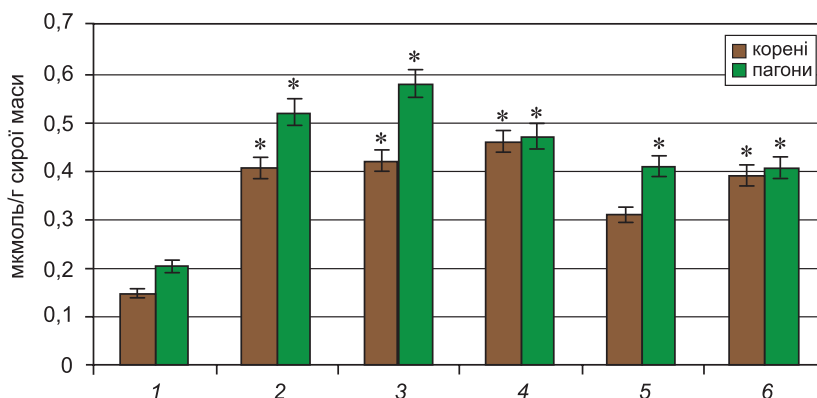


Рис. 2. Вміст вільних амінокислот у проростках соняшника *Helianthus annuus* L. за дії СК та кадмію хлориду: 1 – контроль; 2 – СК (0,05 ммоль/л); 3 – CdCl₂ (10 мкмоль/л); 4 – СК+CdCl₂ (10 мкмоль/л); 5 – CdCl₂ (100 мкмоль/л); 6 – СК+CdCl₂ (100 мкмоль/л). * – відмінність достовірна щодо контролю $p \leq 0,05$

Fig. 2. Content of free amino acids in the sunflower *Helianthus annuus* L. germs under the salicylic acid and cadmium chloride influence: 1 – control; 2 – SA (0.05 mM); 3 – CdCl₂ (10 μM); 4 – SA+CdCl₂ (10 μM); 5 – CdCl₂ (100 μM); 6 – SA+CdCl₂ (100 μM). * – significant differences compared with control at $p \leq 0,05$

Щодо пагонів, то найвищий вміст вільних амінокислот було виявлено у тканинах проростків, що піддавалися дії 10 мкмоль/л кадмію хлориду – у 2,8 разу щодо контролю. Близьким до цього показника був вміст вільних амінокислот у пагонах за дії лише СК – у 2,5 разу. У 2,2 разу цей показник перевищував значення контролю у проростків, що росли за сумісної дії СК та 10 мкмоль/л. Найнижчим вмістом вільних амінокислот характеризувалися пагони проростків, що росли за одночасного впливу СК та 100 мкмоль/л кадмію хлориду.

Цілком імовірно, що залежно від сили стресу можуть запускатися різні механізми нагромадження вільних амінокислот – „синтетичні” за умов помірних стресів і пов’язані з активацією протеаз за умов „жорстких” стресів [5, 6, 20]. Ймовірно, що помірна дія несприятливого фактора спричиняє нагромадження цих сполук переважно синтетичним шляхом [3], проте більш „жорсткі” стреси спричиняють активацію протеаз [14]. Один із її шляхів – зняття з ферменту інгібіторного блоку під впливом вільних радикалів. Окрім того, за умов „жорстких” стресів у клітинах можуть з’являтися денатуровані макромолекули („білкові трупи”), які розщеплюються протеазами значно легше, ніж непошкоджені молекули білка [7, 15]. Таким чином, одночасна активація протеаз і поява частково денатурованих білкових молекул можуть бути причинами нагромадження вільних амінокислот, які, у свою чергу, здатні перетворюватись на інші низькомолекулярні сполуки нітрогену, зокрема, й із протекторними властивостями [19].

Низькомолекулярні сполуки, в тому числі вільні амінокислоти, можуть мати специфічне значення у детоксикації важких металів, зокрема деякі амінокислоти здатні утворювати стійкі комплекси з йонами важких металів [18]. Однак особливе значення у детоксикації важких металів, вочевидь, відводиться небілковим низькомолекулярним поліпептидам, що складаються з 2–11 амінокислотних залишків, з’єднаних у певній послідовності [11]. Синтез таких поліпептидів із відповідних вільних амінокислот індукується якраз підвищеними дозами кадмію та деяких інших важких металів [12].

ВИСНОВКИ

Відомо, що саліцилова кислота бере участь у активації багатьох захисних систем рослинного організму, зокрема спричинює зростання вмісту вільних амінокислот. Результати попередніх досліджень засвідчують, що за дії СК зростає вміст проліну – дуже важливої захисної сполуки рослинної клітини, а також триптофану – попередника фітогормону ауксину [1]. Наші дослідження показують, що екзогенна СК разом зі стресовим фактором кадмію хлоридом у тканинах проростків пшениці та соняшника призводить до синергічного ефекту, тобто надсинтезу вільних амінокислот, які виконують низку захисних функцій у клітинах рослинних організмів.

1. Качмар Б., Кобилецька М., Терек О. Ростові параметри та вміст проліну і триптофану в проростках пшениці *Triticum aestivum* L. за дії саліцилової кислоти та йонів кадмію. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2010; 52: 185–191.
2. Кобилецька М.С., Терек О.І. Вплив іонів кадмію на вміст фенольних сполук та вільного проліну в рослинах кукурудзи. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2002; 28: 311–316.
3. Колесниченко А.В., Войников В.К. Белки низкотемпературного стресса растений. Иркутск, 2003. 197 с.
4. Колесниченко А.В., Грабельных О.И., Побежимова Т.П. Механизмы и функции регулируемого разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриях растений. **Вісн. Харк. націон. аграрн. ун-ту. Сер. біол.**, 2004; 1(14): 7–25.
5. Колупаєв Ю.Є., Косаківська І.В. Роль сигнальних систем і фітогормонів у реалізації стресових реакцій рослин. **Укр. ботан. журнал**, 2008; 65(3): 418–430.
6. Коровецька Г., Цвілинюк О., Терек О. Вплив нафтового забруднення ґрунту на вміст проліну та розчинних цукрів у рослинах осоки (*Carex hirta* L.). **Біологічні студії**, 2009; 3(2): 115–122.
7. Молодченкова О.О. Влияние салициловой кислоты на ответные реакции проростков кукурузы при абиотических стрессах. **Вісн. Харк. націон. аграрн. ун-ту. Сер. біол.**, 2008; 3(15): 24–32.
8. Терек О.І. Механізми адаптації та стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля. **Журнал агробіології та екології**, 2004; 1(1–2): 41–56.
9. Шакирова Ф.М. **Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция**. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
10. Xiong Z.-T., Liu C., Geng B. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2006; 64: 273–280.
11. Alvarez M. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death disease resistance. **Plant Mol. Biol.**, 2000; 44: 429–442.
12. Azooz M.M., Youssef M.M. Evaluation of heat shock and salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in hassawi wheat. **Am. J. of Plant Physiol.**, 2010; 5(2): 56–70.
13. Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., Metraux J. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. **FEBS Letters**, 2008; 582: 473–478.
14. Farooq M., Wahid A., Kobashi N. et al. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. **Agron. Sustain. Dev.**, 2009; 29: 185–212.
15. Gregory J., Rairdan P., Terrence P. Role of salicylic acid and NIMI1/NPR1 in race-specific resistance in *Arabidopsis*. **Genetics**, 2002; 161: 803–811.
16. Hayat S. **Salicylic acid: a plant hormone**. Springer, 2007. 401 p.
17. Jiang Y., Huang B. Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. **Crop Sci.**, 2002; 42: 202–207.
18. Sanchez E., Lopes-Lefebvre L., Garcia P. Prolin metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plant (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). **Plant Physiology**, 2001; 158: 593–598.

19. Umbese C.E., Olatimilehin T.O., Ogunsusi T.A. Salicylic acid protects nitrate reductase activity, growth and proline in amaranth and tomato plants during water deficit. **Am. J. of Agricult. and Biol. Sci**, 2009; 4(3): 224–229.
20. Xinnian Dong. SA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Option in Plant Biology**, 2005; 1: 316–323.

EFFECT OF SALICYLIC ACID ON FREE AMINO ACIDS CONTENT IN WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* L. AND SUNFLOWER *HELIANTHUS ANNUUS* L. PLANTS UNDER THE ACTION OF CADMIUM IONS

M. Kobyletska, O. Terek

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: kobyletskam@mail.ru*

The influence of salicylic acid (SA) in concentration of 0,05 mmole on general content of free amino acids in sprouts of wheat *Triticum aestivum* L. and sunflower *Helianthus annuus* L. under the exposure to cadmium chloride in concentrations 10 and 100 μ mole was analyzed. At treatment of seeds with salicylic acid the percentage of free amino acids in the examined plant stalks and roots has increased. Under simultaneous exposure to salicylic acid and cadmium chloride, we observed synergism in the action of these two compounds that became apparent in the considerable increase of the content of free amino acids.

Keywords: salicylic acid, free amino acids, *Triticum aestivum* L., *Helianthus annuus* L., stress, cadmium ions.

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L. И ПОДСОЛНЕЧНИКА *HELIANTHUS ANNUUS* L. ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ

М. Кобылецька, О. Терек

*Львовський національний університет імені Івана Франка
ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Україна
e-mail: kobyletskam@mail.ru*

Исследовано влияние салициловой кислоты (СК) в концентрации 0,05 ммоль/л на содержание свободных аминокислот в проростках пшеницы *Triticum aestivum* L. и подсолнечника *Helianthus annuus* L. под действием хлорида кадмия в концентрации 10 и 100 мкмоль/л. При обработке семян СК возросло содержание свободных аминокислот в тканях корней и побегов исследуемых проростков. В проростках пшеницы при совместном влиянии СК и хлорида кадмия обнаружен синергизм действия этих двух соединений, который проявлялся в значительном увеличении содержания свободных аминокислот.

Ключевые слова: салициловая кислота, свободные аминокислоты, *Triticum aestivum* L., *Helianthus annuus* L., стресс, ионы кадмия.

Одержано: 01.02.2012