



УДК 581.142:581.143:631.811.98

АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ТА ВМІСТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ У ПРОРОСТКАХ ЗА ДІЇ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ І ФІТОПАТОГЕНУ

О. Гарайда, М. Кобилецька, О. Терек

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

Досліджено активність супероксиддисмутази та вміст пероксиду водню в органах проростків кукурудзи і пшениці за дії саліцилової кислоти, фітопатогену *Fusarium* sp. та їхнього сумісного впливу. З'ясовано, що саліцилова кислота, фітопатоген і їхня сумісна дія мають різний характер впливу на активність ензиму та вміст пероксиду водню залежно від виду й органів проростків.

Ключові слова: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Fusarium* sp., саліцилова кислота, фітопатоген, стійкість рослин, супероксиддисмутаза, пероксид водню.

ВСТУП

Оскільки використання хімічних засобів захисту рослин, незважаючи на їхню ефективність, призводить до забруднення навколишнього середовища, нагромадження у рослинах небезпечних для здоров'я людини і тварин доз хімічних речовин та порушення екологічної рівноваги у біосфері, ведеться пошук альтернативних, екологічно безпечних засобів захисту, які базуються на підвищенні природної стійкості рослин до хвороб [10].

Інфікування рослин патогенними організмами є поширеним біотичним стресом. Перше місце за кількістю захворювань займають фітопатогенні гриби, які спричинюють численні хвороби рослин. Гриби роду *Fusarium* sp. широко розповсюджені у природі та є збудниками різноманітних рослинних захворювань [4].

Саліцилову кислоту (СК) розглядають як перспективну для практичного застосування сполуку з метою захисту рослинних організмів від широкого спектру стресових факторів довкілля [12]. Здатність СК підвищувати стійкість рослин до стресорів різної природи пов'язують, насамперед, із її здатністю індукувати нагромадження активних форм кисню (АФК), а отже, впливати на активність ферментів-антиоксидантів [8].

Із джерел літератури відомо, що посилення утворення АФК – це універсальна неспецифічна реакція рослинних організмів у відповідь на різноманітні біотичні й абіотичні впливи [6].

Супероксиддисмутаза (СОД) є одним із ключових ферментів системи захисту клітин і тканин від окислювальної деструкції. Вона єдина каталізує реакцію дисмутації супероксидного аніон радикалу (O_2^-) до O_2 та H_2O_2 , регулюючи таким чином внутрішньоклітинну концентрацію вільних радикалів кисню. Активність СОД за дії несприятливих факторів навколишнього середовища, коли у рослинних організмах збільшується утворення активних форм кисню, може змінюватися по-різному, що залежить від тривалості й інтенсивності дії стресового чинника, а також від стійкості організму, стадії розвитку рослин тощо [1].

Метою нашої роботи було дослідити вплив екзогенної СК, фітопатогену (ФП), а також їхньої сумісної дії на активність супероксиддисмутази та вміст пероксиду водню у коренях і пагонах проростків кукурудзи та пшениці.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проводили на проростках кукурудзи (*Zea mays* L.) сорту Закарпатська жовта зубоподібна та пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Крижинка. Знезаражене у слабкому розчині $KMnO_4$ насіння замочували у $50,0 \mu M$ розчині СК протягом 3 год. Після цього частину насіння переносили у чашки Петрі на середовище, яке містило 1×10^5 конідій/мл патогенного *Fusarium* sp. Інфіковане та неінфіковане насіння пророщували у термостаті при температурі $+24^\circ C$ протягом трьох діб. За контроль слугували проростки, насіння яких не інфікували та не обробляли СК. На четверту добу визначали активність СОД [9] і вміст пероксиду водню [13] в органах досліджуваних проростків. Повторність незалежних дослідів трикратна.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення впливу регулятора росту і фітопатогену на активність ключового ферменту антиоксидантної системи – СОД – у коренях і пагонах проростків кукурудзи представлено на рис. 1.

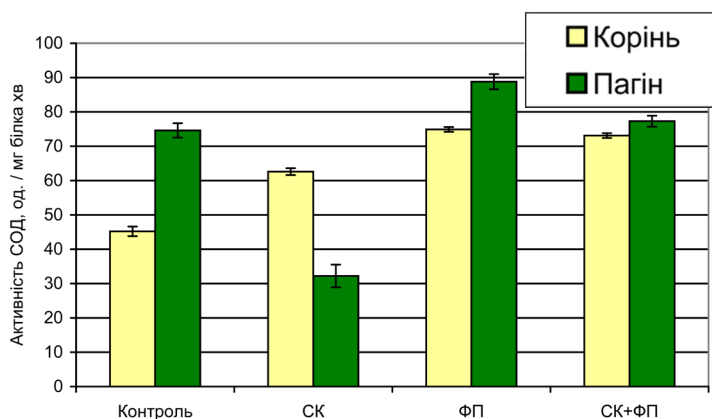


Рис. 1. Вплив саліцилової кислоти (СК) і фітопатогену (ФП) на активність супероксиддисмутази в органах 4-добових проростків кукурудзи *Zea mays* L.

Fig. 1. Effect of salicylic acid and phytopathogen on superoxide dismutase activity in organs of four day old plant of maize *Zea mays*

Нами відзначено підвищення активності ферменту в коренях досліджуваних проростків кукурудзи, насіння якої замочували у регуляторі росту, на 38,5% порівняно з контролем. Так, у контролі активність СОД становить $45,2 \pm 1,4$ од./хв мг білка, а за дії СК – $62,6 \pm 1$ од./хв мг білка. Проте у пагонах кукурудзи за дії СК активність ензиму знижується на 56,8% щодо контролю та становить $32,2 \pm 3,3$ од./хв мг білка (у контролі – $74,6 \pm 2,1$ од./хв мг білка).

Причини зниження активності СОД можуть бути різні. Наприклад, виснаження пулу ферменту через його посилене використання у реакції дисмутації. Окрім того, оскільки активність ензиму є результатом як його синтезу, так і деградації, зниження активності може бути наслідком зниження синтезу та / або підвищення деградації молекул СОД. В інактивації та деградації цього ферменту можуть брати участь активні форми кисню: гідроксильні радикали та пероксид водню. Останній може відновлювати Cu^{+2} в активному центрі ензиму до Cu^+ , який, взаємодіючи із новою молекулою пероксиду водню, утворює $\text{Cu}^{+2}\text{OH}^{\bullet}$. Цей радикал викликає окислювальну модифікацію амінокислотних послідовностей в активному центрі ферменту, що призводить до його денатурації [1].

Інокуляція насіння кукурудзи фітопатогеном призводить до підвищення активності СОД у коренях (на 65,7%) і пагонах (на 19%) цих проростків. Найвищі абсолютні значення активності ферменту спостерігаються саме у цьому варіанті, становлячи у коренях $74,9 \pm 0,7$ од./хв мг білка, у пагонах – $88,8 \pm 2,2$ од./хв мг білка. Сумісне замочування насіння досліджуваних рослин у СК та їхнє інфікування *Fusarium* sp. підвищує активність ензиму як у коренях, так і у пагонах проростків кукурудзи.

Слід відзначити, що активність СОД у рослин, які відрізняються за стійкістю до дії стресу, є різною. Стійкі рослини порівняно з нестійкими характеризуються більш високою активністю СОД і менш вираженими окислювальними пошкодженнями [15].

На рис. 2 представлено активність СОД у коренях і пагонах проростків пшениці за дії СК, ФП та їхнього сумісного впливу.

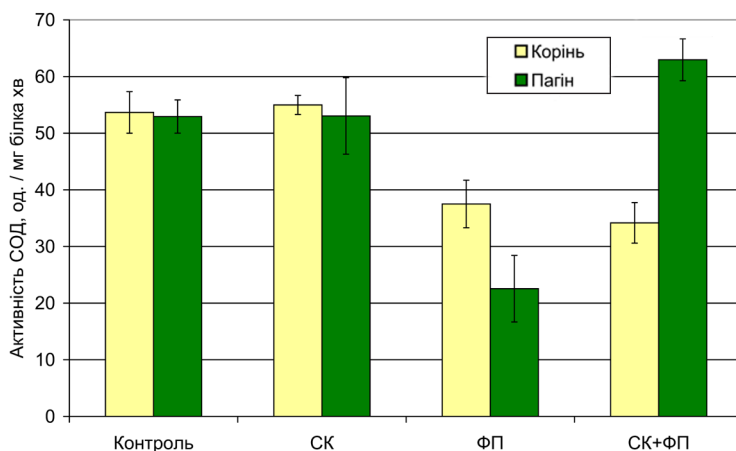


Рис. 2. Вплив саліцилової кислоти (СК) і фітопатогену (ФП) на активність супероксиддисмутази в органах 4-добових проростків пшениці *Triticum aestivum* L.

Fig. 2. Effect of salicylic acid and phytopathogen on superoxide dismutase activity in organs of four day old plant of wheat *Triticum aestivum* L.

У коренях досліджуваних проростків, насіння яких замочували у СК, активність цього ензиму незначною мірою підвищується порівняно з контролем і становить $54,99 \pm 1,68$ од./хв мг білка. Інфікування насіння пшениці фітопатогеном призводить до зниження активності СОД на 30% щодо контролю. Сумісна дія регулятора росту і *Fusarium* sp. викликає зниження активності ферменту на 36% порівняно з контролем.

Аналізуючи вплив СК, фітопатогену та їхньої сумісної дії на активність СОД у пагонах проростків пшениці, слід зазначити, що регулятор росту суттєво не впливає, порівняно з контролем, на активність досліджуваного ензиму та становить $53,05 \pm 6,75$ од./хв мг білка. У пагонах пшениці, насіння якої інфікували фітопатогеном, активність СОД знижується на 57,4% щодо контролю. Найвищі абсолютні значення активності ферменту відзначено у пагонах досліджуваних проростків, насіння яких замочували у СК й інфікували *Fusarium* sp.

Отже, замочування насіння пшениці у СК майже не впливає на активність СОД як у коренях, так і у пагонах проростків, тобто зберігається на рівні контролю.

Щодо інфікування насіння пшениці фітопатогеном, то у цьому випадку активність ензиму знижується у тканинах коренів і пагонів проростків. Інгібування супероксиддисмутази активності, імовірно, є наслідком утворення надлишкової кількості пероксиду водню, виснаження СОД і зсуву прооксидантної-антиоксидантної рівноваги у бік інтенсифікації процесів ліпопероксидації [14].

Сумісна дія регулятора росту і *Fusarium* sp. викликає зниження активності СОД у коренях та його підвищення у пагонах досліджуваних проростків. Активація СОД за несприятливих умов довкілля є відповіддю на збільшення продукції радикалів супероксиду в таких умовах, що забезпечує захист клітин і тканин рослинних організмів від окислювальної деструкції [1].

Отже, результати наших досліджень свідчать про здатність екзогенної СК змінювати активність супероксиддисмутази у проростках кукурудзи та пшениці. Зміни відбуваються залежно від органа проростків і виду рослин.

Інокуляція насіння фітопатогеном викликає зниження активності СОД як у коренях, так і у пагонах проростків пшениці, натомість спостерігається підвищення активності цього ферменту в органах проростків кукурудзи.

Зниження активності СОД зумовлюється, імовірно, збільшенням у клітинах концентрації пероксиду водню, оскільки за таких умов активуються ензими, які його розщеплюють, а також інактивуються системи, що його продукують [2].

Протилежні зміни активності супероксиддисмутази виявлено й за сумісного впливу СК і фітопатогену в обох видах рослин. Ця різниця в активності ферменту в органах проростків кукурудзи та пшениці відображає їхні фізіолого-генетичні особливості.

Відомо, що нагромадження активних форм кисню АФК, до яких належить H_2O_2 , вважається однією із ключових реакцій рослинних клітин на дію стресових факторів [5]. АФК можуть викликати пригнічення розвитку патогену в інфікованій клітині та локальну загибель клітин рослини-живителя у разі гіперчутливої реакції, здатні „вмикати” метаболічні сигнальні мережі, які закінчуються експресією генів захисних білків і ферментів синтезу фітоалексинів і, як наслідок, руйнувати патогенні мікроорганізми та віруси, а також індукувати розвиток системної набутої стійкості у рослин [8].

У попередніх дослідженнях [3] ми виявили, що замочування насіння кукурудзи у регуляторі росту призводить до збільшення вмісту пероксиду водню у пагонах

проростків порівняно з контролем і становить 558 мг/г маси сирої речовини. Спостерігали незначний вплив СК на вміст цієї сполуки у коренях досліджуваних проростків щодо контролю (рис. 3). Деякі зміни, а саме збільшення вмісту пероксиду водню (на 2,73%), виявлено у коренях проростків кукурудзи, насіння якої інфікували *Fusarium* sp. Вміст пероксиду водню у коренях проростків кукурудзи майже не змінюється за сумісного впливу СК і фітопатогену.

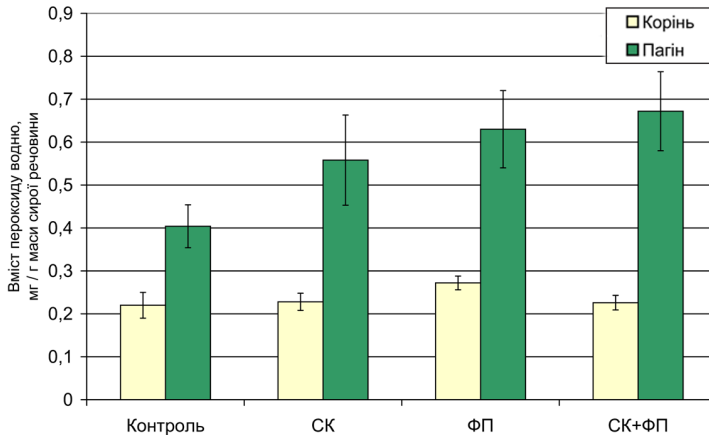


Рис. 3. Вплив саліцилової кислоти (СК) і фітопатогену (ФП) на вміст пероксиду водню в органах 4-добових проростків кукурудзи *Zea mays* L.

Fig. 3. Effect of salicylic acid and phytopathogen on hydrogen peroxide content in organs of four day old plant of maize *Zea mays* L.

Найвищий вміст H_2O_2 виявлено у пагонах проростків *Zea mays* L., насіння яких інфікували фітопатогеном, і за сумісної дії саліцилової кислоти та *Fusarium* sp.

Дещо інша картина спостерігається у проростків пшениці (рис. 4). Тут вміст пероксиду водню знижується як у тканинах коренів, так і у тканинах пагонів за дії саліцилової кислоти, *Fusarium* sp. та їхнього сумісного впливу порівняно з контролем.

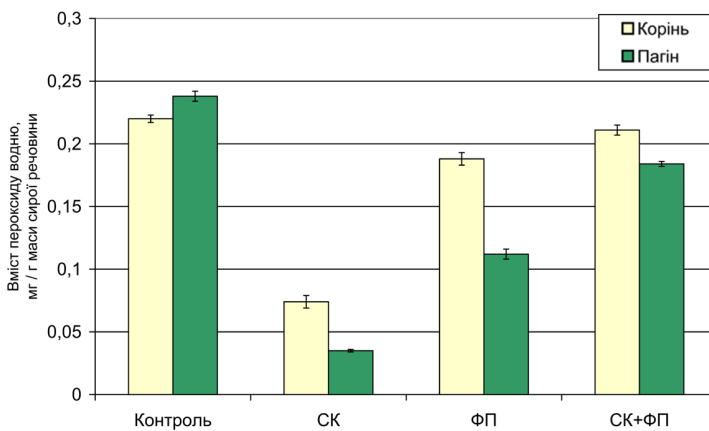


Рис. 4. Вплив саліцилової кислоти (СК) і фітопатогену (ФП) на вміст пероксиду водню в органах 4-добових проростків пшениці *Triticum aestivum* L.

Fig. 4. Effect of salicylic acid and phytopathogen on hydrogen peroxide content in organs of four day old plant of wheat *Triticum aestivum* L.

Так, у тканинах коренів пшениці, насіння якої замочували у СК, вміст H_2O_2 зменшується на 66,4% порівняно з контролем і становить 74 мкг/г маси сирової речовини. Інокуляція насіння пшениці фітопатогеном призводить до зниження вмісту пероксиду водню на 14,5% щодо контролю.

Найвищі абсолютні значення вмісту H_2O_2 (211 мкг/г маси сирової речовини, що на 4,1% менше, ніж у контролі) виявлено у коренях проростків пшениці, насіння якої замочували у регуляторі росту й інфікували *Fusarium* sp.

Щодо вмісту пероксиду водню у тканинах пагонів проростків пшениці, то нами виявлено зменшення його концентрації як при замочуванні насіння у СК (на 85%), інфікуванні фітопатогеном (на 53%), так і за сумісного впливу регулятора росту і *Fusarium* sp. (на 23%) порівняно з контролем.

Отже, попередня обробка насіння кукурудзи та пшениці СК викликає порушення в антиоксидантній системі проростків цих рослин, що призводить до нагромадження пероксиду водню.

Аналіз участі активних форм кисню у взаємодії в системі патоген-рослина показує, що вони є необхідними сигналами для ініціації імунної відповіді, але не є достатніми та потребують додаткових стимулювальних сполук, однією з яких є СК [5].

ВИСНОВКИ

Проаналізувавши вплив саліцилової кислоти, фітопатогену та їхньої сумісної дії на вміст пероксиду водню в органах проростків кукурудзи і пшениці, ми спостерігаємо збільшення вмісту H_2O_2 у коренях і пагонах проростків кукурудзи та зниження його концентрації в органах проростків пшениці. Зростання вмісту пероксиду водню у коренях і пагонах проростків кукурудзи може відбуватися за рахунок підвищення активності супероксиддисмутази, а зниження вмісту цієї активної форми кисню можна пояснити активним функціонуванням системи антиоксидантного захисту рослин, котра протидіє кисневому пошкодженню компонентів клітини та забезпечує пристосування рослинного організму до несприятливих умов зростання.

1. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений. **Цитология**, 2006; 48(6): 465–474.
2. Бацманова Л.М. Активність супероксиддисмутази та каталази в листках проростків озимої пшениці за дії екзогенного пероксиду водню. **Укр. біохім. журн**, 2008; 80(6): 101–105.
3. Гарайда О., Кобилецька М., Терек О. Морфо-біохімічні показники проростків *Zea mays* L. за дії саліцилової кислоти та фітопатогену. **Вісн. Львівськ. ун-ту. Сер. Біол.**, 2009; 50: 196–201.
4. Грузевський О.А., Протченко П.З., Стороженко В. Б. Мікробне забруднення рослинної лікарської сировини фітопатогенними мікроорганізмами. **Одеськ. мед. журн**, 2005; 2(88): 107–110.
5. Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин. **Цитология и генетика**, 2005; 39(4): 64–75.
6. **Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в экстремальных условиях** / Под. ред. Е. Л. Кордюм. Киев: Наук. думка, 2003. 277 с.
7. Колупаєв Ю.Є. Можлива роль супероксиддисмутази у саліцилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. **Укр. ботан. журн**, 2007; 64(2): 270–277.

8. Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Мусатенко Л.І. Участь активних форм кисню в індукованні солестійкості проростків пшениці саліциловою кислотою. **Доп. НАНУ**, 2007; 6: 154–158.
9. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И. Чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кварцетина. **Вопр. мед. химии**, 1990; 2: 88–91.
10. Поляковський С., Кравчук Ж., Дмитрієв О. **Механізми дії індукторів стійкості у рослин на прикладі взаємодії в системі *Botrytis cinerea* – *Allium cepa***. Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі. Фізіолого-біохімічні та екологічні аспекти. Тези доп. III Міжнар. конф. Львів, 2007. С.176.
11. Рябушкина Н. А. Синергизм действия метаболитов в ответных реакциях растений на стрессовые факторы. **Физиология растений**, 2005; 52(4): 614–621.
12. Clarke J., Volko S., Ledford H. et al. Roles of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 2000; 12: 2175–2190.
13. Di Toppi L., Lambardi M., Pazzagli L. et al. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. **Plant Science**, 1999; 137: 119–129.
14. Jiang Y., Huang B. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two coll-season grasses. **J. Exp. Bot**, 2001; 52: 341–349.
15. Wu F., Zhang G., Dominy P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of oxidant capacity. **Environ. Exp. Bot**, 2003; 50: 67–78.

ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND HYDROGEN PEROXIDE CONTENT IN PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF SALICYLIC ACID AND PHYTOPATHOGEN

O. Garaida, M. Kobyletska, O. Terek

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005 Ukraine
e-mail: oljagarajda@rambler.ru*

The effect of salicylic acid and phytopathogen *Fusarium* sp. on the superoxide dismutase activity and hydrogen peroxide content in maize and wheat plant was investigated. It was found that salicylic acid, phytopathogen and their joint action has a different character on the enzyme activity and hydrogen peroxide content, depending on the species and plant organs.

Key words: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Fusarium* sp., salicylic acid, phytopathogen, plants resistance, superoxide dismutase, hydrogen peroxide.

АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ПРОРОСТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТЫ И ФИТОПАТОГЕНА

O. Гарайда, М. Кобылецкая, О. Терек

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: oljagarajda@rambler.ru*

Исследована активность супероксиддисмутазы и содержание перекиси водорода в органах проростков кукурузы и пшеницы при действии саліцилової кисло-

ты, фитопатогена *Fusarium* sp. и их совместного влияния. Выяснено, что салициловая кислота, фитопатоген и их совместное действие имеют различный характер влияния на активность энзима и содержание перекиси водорода в зависимости от вида и органов проростков.

Ключевые слова: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L., *Fusarium* sp., салициловая кислота, фитопатоген, устойчивость растений, супероксиддисмутаза, перекись водорода.

Одержано: 27.09.2010