

Пестова Елена Леонидовна

**ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ
ПЕРЕКИСНОГО ГОМЕОСТАЗА РАСТЕНИЙ ГОРОХА
ПРИ ПРЕАДАПТАЦИИ К ТЕПЛОВОМУ ШОКУ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

*Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Нижний Новгород
2007

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии растений
Нижегородского государственного университета им.Н.И.Лобачевского

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор А.П. Веселов

кандидат биологических наук,
доцент Л.Н. Курганова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор В.М.Пахомова

доктор биологических наук,
профессор М.С. Рубцова

Ведущая организация: Санкт-Петербургский
государственный университет

Защита состоится « 29 » мая 2007г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета К 212.166.06 Нижегородского
государственного университета им. Н.И. Лобачевского (603950,
Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского
государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан « 28 » апреля 2007 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

И.Ф. Александрова

Пестова Елена Леонидовна

**ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТОЯНИЕ
ПЕРЕКИСНОГО ГОМЕОСТАЗА РАСТЕНИЙ ГОРОХА
ПРИ ПРЕАДАПТАЦИИ К ТЕПЛОВОМУ ШОКУ**

Автореферат

Подписано в печать 23 апреля 2007 г.
Тираж 100 экз.

Отпечатано на ризографе Института физики микроструктур РАН,
603950, Нижний Новгород, ГСП – 105.

современной фитобиотехнологии». Москва – Ростов-на-Дону, 2006. С. 131.

9. Курганова Л.Н., Веселов А.П., Пестова Е.Л., Абрамова Н.А. Влияние салициловой кислоты на перекисный гомеостаз хлоропластов гороха при тепловом шоке // **Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского**. Сер.: Биология. Выпуск 1(11). Нижний Новгород, 2006. С. 84 – 87.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксидантный
АФК – активные формы кислорода
ДК – диеновые конъюгаты
МДА – малоновый диальдегид
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СК – салициловая кислота
СОД - супероксиддисмутаза
ШО – шиффовы основания

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Активация процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран, вызванная усиленной генерацией активных форм кислорода (АФК), является одним из наиболее ранних эффектов, происходящих у растений при воздействии различных стрессовых факторов, в том числе и теплового шока (Курганова и др., 1997; Dat e.a., 1998; Курганова и др., 1999; Zhou, Leul, 1999). Повышение уровня ПОЛ приводит к серьезным повреждениям мембран, вызывая существенные нарушения их структуры и функций (Браун, Моженок, 1987; Барабой и др., 1992). Начальным этапом в развитии ПОЛ является интенсификация генерации АФК (Зенков, Меньщикова, 1993; Halliwell, Gutteridge, 1986). В клетках растений, образование АФК наиболее интенсивно идет в хлоропластах (Мерзляк, 1989). Этим обусловлена высокая степень выраженности в этих органоидах общих изменений в состоянии про- антиоксидантного равновесия в клетке при тех или иных внешних воздействиях.

При неблагоприятных условиях окружающей среды для сдерживания окислительных процессов необходимо быстрое включение антиоксидантных (АО) ресурсов. Обнаружено, что активность АО-системы может увеличиваться при действии стрессоров самой различной природы, что предупреждает окислительные изменения мембран и предотвращает гибель клеток (Konklin, Last, 1995; Rao et al., 1996; Kubo et al., 1999). Устойчивость растений к внешним воздействиям в значительной степени определяется соотношением уровня ПОЛ и активности антиоксидантной системы.

Особое внимание исследователей к салициловой кислоте (СК) связано с обнаружением ее ключевой роли в индукции системной приобретенной устойчивости растений к инфицированию фитопатогенами. Однако не вызывает сомнения факт участия СК в развитии защитных реакций в растениях в ответ на неблагоприятные факторы среды не только биотической, но и абиотической природы (Шакирова, 2000; Шакирова, 2001).

Показано, что салициловая кислота может изменять уровень ПОЛ. Большое количество данных свидетельствует о том, что СК стимулирует образование АФК и развитие ПОЛ (Вовчук и др., 1997, Conrath et al., 1995). Одновременно предполагается важная роль

салицилата и в сдерживании окислительных процессов, связанных с защитными реакциями растений (Тарчевский и др., 1999).

Однако следует отметить, что в литературе практически отсутствуют сведения о роли влияния СК на про- антиоксидантный статус клеток в изменении чувствительности растений к действию неблагоприятных факторов среды.

В связи с этим представляется актуальным исследование влияния салицилата на интенсивность перекисного окисления и активность АО-системы при преадаптации растений к последующей гипертермии.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в исследовании влияния салициловой кислоты на уровень перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы растений гороха, выявлении значения вызванных салицилатом изменений в перекисном гомеостазе для развития ответной реакции на последующую гипертермию.

Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние экзогенной салициловой кислоты на перекисный гомеостаз клеток гороха при кратковременной (до 120 мин) обработке проростков салицилатом.
2. Исследовать изменения уровня перекисного окисления липидов и активности антиоксидантной системы клеток и хлоропластов гороха при длительном (7 суток) воздействии экзогенной салициловой кислоты на растения.
3. Сравнить влияние салицилата в двух концентрациях (100 и 500 мкМ) на перекисный гомеостаз растений гороха.
4. Исследовать влияние предобработки СК на ответную реакцию про- антиоксидантной системы растений гороха при последующем действии гипертермии.

Научная новизна

Впервые показано, что кратковременная обработка растений гороха 100 и 500 мкМ салициловой кислотой вызывает изменения в перекисном гомеостазе клеток, причем 500 мкМ салицилат оказывает более ярко выраженное действие.

Получены новые данные, позволяющие оценить соотношение изменений перекисного гомеостаза под влиянием длительной обработки салициловой кислотой в клетках и хлоропластах гороха.

ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2005. С. 88 – 89.

2. **Пестова Е.Л., Цима В.А., Абрамова Н.А.** Влияние предобработки салициловой кислотой на перекисное окисление липидов у растений гороха (*Pisum sativum* L.) при последующем тепловом шоке // Сборник тезисов докладов X нижегородской сессии молодых ученых. Нижний Новгород, 2005. С. 224.
3. **Пестова Е.Л., Курганова Л.Н., Абрамова Н.А., Веселов А.П.** Изменение уровня перекисного окисления липидов под влиянием салициловой кислоты, как фактора преадаптации растений к последующему тепловому шоку // Материалы IV Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2005. С. 173.
4. **Пестова Е.Л., Абрамова Н.А., Горчакова Т.С.** Изменения в перекисном окислении липидов в хлоропластах гороха при предобработке растений салициловой кислотой и последующем тепловом шоке // Сборник тезисов 10 – ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2006. С. 89.
5. **Пестова Е.Л., Абрамова Н.А.** Влияние салициловой кислоты на состояние перекисного гомеостаза хлоропластов гороха в связи с преадаптацией к тепловому шоку // Материалы докладов XI нижегородской сессии молодых ученых. Нижний Новгород, 2006. С. 194 – 195.
6. **Пестова Е.Л., Абрамова Н.А., Горчакова Т.С.** Influence of salicylic acid on lipid peroxidation in pea chloroplasts in connection with heat-stress preadaptation // Proceedings of the I (IX) Conference of Young Botanists in Saint-Petersburg. Saint-Petersburg, 2006. P. 181.
7. **Kurganova L.N., Pestova E.L., Veselov A.P.** Effects of salicylic acid on lipid peroxidation under heat shock // Abstracts of the second international symposium «Signalling system of plant cells: role in adaptation and immunity. Kazan, 2006. P. 67 – 68.
8. **Пестова Е.Л., Курганова Л.Н., Абрамова Н.А., Горчакова Т.С., Веселов А.П.** Обработка салициловой кислотой как возможный фактор устойчивости растений к тепловому шоку при окислительном стрессе // Тезисы докладов конференции «Физиология растений – фундаментальная основа

системы, активность которой была на достаточно высоком уровне еще до начала действия гипертермии, по сравнению с контрольными растениями, и продолжала активироваться по мере действия теплового шока. Полученные результаты позволяют заключить, что одним из механизмов повышения стрессовой устойчивости растений под влиянием салициловой кислоты является ее воздействие на про-антиоксидантную систему растений.

ВЫВОДЫ

1. Действие салициловой кислоты в концентрациях 100 и 500 мкМ на проростки гороха в течение 15 и 60 минут приводило к незначительному снижению интенсивности перекисного окисления липидов и небольшой активации антиоксидантной системы клетки. Обработка проростков гороха салицилатом в течение 2 часов вызывала усиление ПОЛ. Одновременно наблюдалось угнетение работы антиоксидантной системы, особенно СОД под действием 500 мкМ салициловой кислоты.
2. При длительном введении (7 суток) 500 мкМ салициловой кислоты в клетках проростков гороха наблюдалось снижение интенсивности ПОЛ и суммарной активности антиоксидантной системы, но при этом активность СОД увеличивалась. В хлоропластах также наблюдалось снижение содержания продуктов ПОЛ, тогда как активность антиоксидантной системы возрастала.
3. СК в концентрации 500 мкМ оказывала более сильное влияние на про- и антиоксидантный статус клеток гороха, по сравнению со 100 мкМ СК.
4. Длительное (7 суток) воздействие СК в концентрации 500 мкМ способствует адаптации про- антиоксидантной системы растений гороха к последующей гипертермии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Пестова Е.Л., Цима В.А.** Влияние салициловой кислоты на прооксидантное и антиоксидантное равновесие клеток растений в связи с тепловым шоком // Сборник тезисов 9 – ой Международной Пушинской школы-конференции молодых

Установлено, что выращивание растений гороха на среде, содержащей 500 мкМ салициловую кислоту, приводит к снижению уровня перекисного окисления и активации системы антиоксидантной защиты.

Впервые показано, что предобработка 500 мкМ салицилатом растений гороха в течение 7 суток приводит к преадаптации проростков к последующему тепловому шоку.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты важны для понимания механизмов участия салициловой кислоты в развитии защитных реакций в растениях в ответ на неблагоприятные факторы среды абиотической природы, в частности высокой температуры. Знания биохимических изменений, вовлеченных в растительные стрессовые ответы, могут быть использованы для выведения растений с повышенной устойчивостью к абиотическому стрессу. Основные выводы и результаты работы могут быть использованы в учебном процессе на биологических факультетах университетов при чтении спецкурсов и включены в соответствующие разделы лекций общего курса по физиологии растений.

Апробация работы

Основные положения работы были доложены на 9-й и 10-й Международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005, 2006), на X и XI нижегородских сессиях молодых ученых (Нижний Новгород, 2005, 2006), на IV Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005), на I (IX) Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2006), на Втором Международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), на конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2006).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (147 работ, в том числе 95 иностранных). Работа изложена на 110 страницах, содержит 13 рисунков и 3 таблицы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований служили двухнедельные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.) сорта Альбумен. Семена проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной водой при 22°C.

Для изучения кратковременного влияния салицилата на растения гороха экзогенную салициловую кислоту в концентрациях 100 и 500 мкМ наносили на листья и выдерживали при комнатной температуре 15, 60 и 120 минут. При наблюдении за реакцией растений на длительное введение салицилата 7-дневные проростки гороха переносили на среду, содержащую 500 мкМ СК и выращивали в таких условиях в течение 7 суток. Контролем служили растения, не обработанные экзогенной салициловой кислотой.

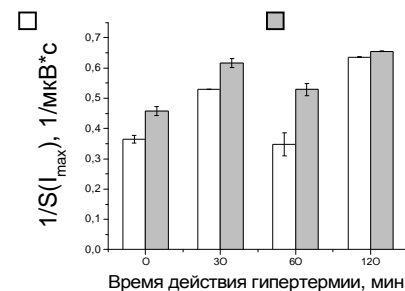
Тепловой шок создавали, помещая растения в термостат при 42 °C на 30, 60 и 120 минут.

По окончании воздействия выделяли общеклеточную суспензию и хлоропласты из листьев гороха.

В полученных препаратах проводили определение уровня липопероксидации по потенциальной способности клеток и хлоропластов гороха к образованию свободных радикалов и по содержанию продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и шиффовых оснований (ШО). Оценку состояния системы АО-защиты проводили по суммарной АО-активности клеток и хлоропластов гороха и по активности основных АО-ферментов – СОД и каталазы.

Потенциальную способность клеток и хлоропластов гороха к образованию свободных радикалов и суммарную АО-активность оценивали по биохемилюминисценции.

Уровень продуктов ПОЛ – ДК, МДА и ШО определяли спектрофотометрически (Fletcher et al., 1973; Стальная, Гаришвили, 1977; Камышников, 2003).



□ - вода (контроль) ■ - 500 мкМ СК

Рис. 11. Суммарная активность АО-системы ($1/S(I_{max})$) хлоропластов гороха при выращивании растений на 500 мкМ СК в течение 7 суток и последующем действии гипертермии. Эта картина близка к изменению активности СОД в клетках гороха. Возможно, именно хлоропластная СОД вносит существенный вклад в работу общеклеточного пула данного фермента.

Таким образом, получены результаты, свидетельствующие о том, что длительное влияние СК в концентрации 500 мкМ способствует преадаптации про-антиоксидантной системы растений гороха к последующему воздействию неблагоприятных факторов, в частности повышенной температуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что кратковременная (до 120 минут) обработка листьев гороха салициловой кислотой в концентрациях 100 и 500 мкМ приводила к колебаниям уровня ПОЛ и активности АО-системы клеток гороха в зависимости от концентрации и продолжительности действия салицилата. Выявлено, что в процессе роста гороха на среде, содержащей 500 мкМ СК в течение 7 суток наблюдалось заметное снижение уровня ПОЛ и активация АО-системы клеток и хлоропластов гороха. После начала влияния высокой температуры на растения, обработанные салицилатом в течение длительного времени, СК не позволила усилиться процессу липопероксидации. Это может объясняться качественной работой АО-

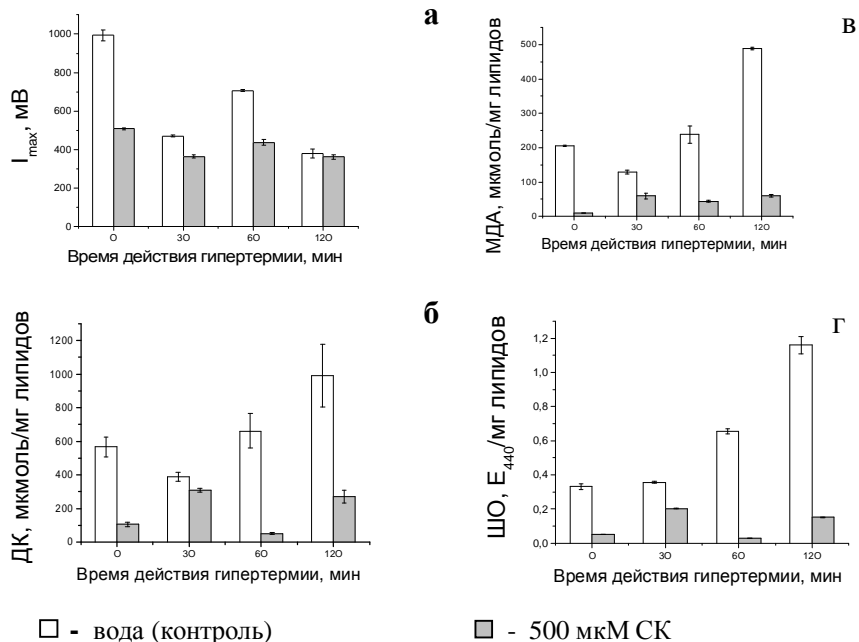


Рис. 10. Интенсивность ПОЛ хлоропластов гороха, при выращивании растений на 500 мкМ СК в течение 7 суток и последующем действии гипертермии (а – потенциальная способность к образованию свободных радикалов (I_{max}), б – содержание ДК, в – содержание МДА, г – содержание -ШО)

Активность СОД измеряли спектрофотометрически по восстановлению нитросинего тетразолия (Чевари и др, 1985), активность каталазы – по убыли пероксида водорода (Patterson et al., 1984).

На графиках представлены средние арифметические значения 3 независимых опытов, каждый из которых проведен в трехкратной биохимической повторности, и ошибки среднего значения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного продукта Microsoft Excel for Windows. Достоверность полученных данных определяли с помощью коэффициента Стьюдента согласно С.Гланцу (1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение про- антиоксидантного статуса клеток гороха при разных концентрациях и продолжительности обработки растений салициловой кислотой

Известно, что генерация активных форм кислорода – это очень быстрый физико-химический процесс, длящийся порядка микро- и миллисекунд (Зенков, Меньщикова, 1993; Breusegem et al., 1998). Следовательно и смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в мембранах живых организмов развивается довольно быстро, сравнимо со временем избыточной генерации АФК. Однако при экзогенном введении салицилата, возможно, требуется достаточное время для передвижения СК по растению и для последующего развития изменений в про- антиоксидантной системе клеток растений. В связи с этим нами исследовалось влияние СК на ПОЛ клеток гороха как при кратковременной (15, 60 и 120 минут) обработке листьев физиологической концентрацией СК 100 мкМ и более высокой концентрацией – 500 мкМ, так и при длительной (7 суток) обработке растений 500 мкМ салицилатом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при обработке листьев растений 100 и 500 мкМ СК в течение 15 минут, потенциальная способность клеток гороха к образованию свободных радикалов в растениях, обработанных СК в обеих концентрациях, была ниже по сравнению с контрольными, необработанными СК (рис. 1, а).

Одними из наиболее ранних продуктов ПОЛ являются ДК. Содержание ДК в клетках гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК снижалось в опытных растениях, по сравнению с

контрольными, сопоставимо с общей способностью клетки к образованию свободных радикалов (рис. 1, б). Однако, содержание вторичного продукта ПОЛ – МДА, наоборот увеличивалось в опытных образцах в такой же степени, как снижалось содержание ДК (рис. 1, в). Это может объясняться

Изменения в развитии реакций перекисного окисления липидов и антиоксидантной системе в хлоропластах растений гороха при тепловом шоке после продолжительной обработки салицилатом

В условиях окислительного стресса изменяются функции хлоропластов, в первую очередь за счет нарушения структуры белков и липидов тилакоидных мембран; нарушается трансформация энергии в АТФ и, следовательно, в клетке быстро истощаются энергетические ресурсы (Гродзинский, 1983; Веселовский, 1987).

В связи с этим представляло интерес исследовать, какие изменения будут наблюдаться в хлоропластах гороха при предобработке растений СК в течение длительного времени и последующем тепловом шоке.

Установлено, что потенциальная способность к образованию свободных радикалов у хлоропластов, выделенных из контрольных растений (без СК), была выше, чем у выращенных на СК, на протяжении всего времени действия ТШ (рис. 10, а). При выращивании растений на 500 мкМ СК изменение содержания всех исследованных продуктов ПОЛ по мере действия высокой температуры имело схожую картину. До начала действия стрессового фактора уровень ДК, МДА и ШО был ниже, чем в контрольных растениях, выращенных на водной среде (рис. 10, б, в, г). По мере действия высокой температуры содержание продуктов ПОЛ в опытных растениях (обработанных СК) повышалось к 30 минутам высокотемпературной обработки и возвращалось к исходному уровню к 60 и 120 минутам влияния гипертермии. При этом на протяжении всего времени действия стрессового фактора уровень всех продуктов ПОЛ оставался ниже, чем в контрольных растениях, не обработанных СК (рис. 10, б, в, г).

При исследовании суммарной активности АО-системы хлоропластов установлено, что у растений, выращенных на 500 мкМ СК суммарная активность АО-системы была выше, чем у контрольных растений, выращенных на воде (рис. 11).

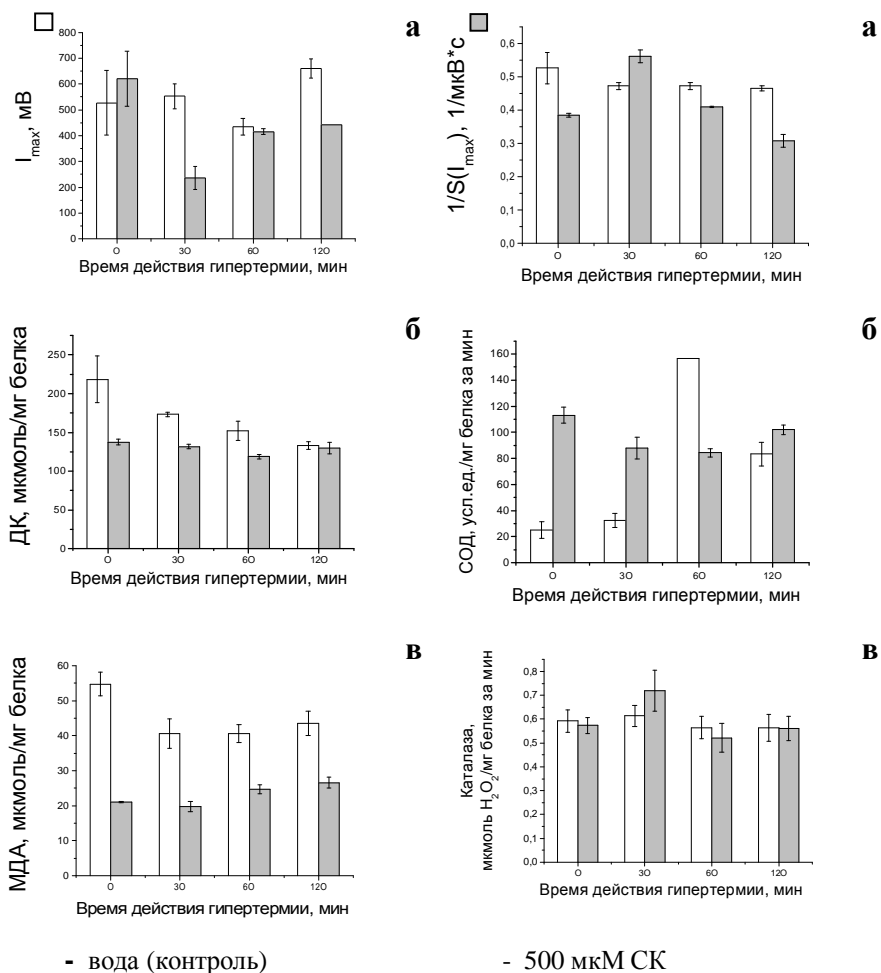


Рис. 8. Интенсивность ПОЛ клеток растений гороха, выращенного на 500 мкМ СК в течение 7 суток, при последующем действии гипертермии (а – потенциальная способность к образованию свободных радикалов (I_{max}), б – содержание ДК, в – содержание МДА)

Рис. 9. Активность АО-системы клеток растений гороха, выращенного на 500 мкМ СК в течение 7 суток, при последующем действии гипертермии (а – суммарная АО-активность (1/S(I_{max})), б – активность СОД, в – активность каталазы)

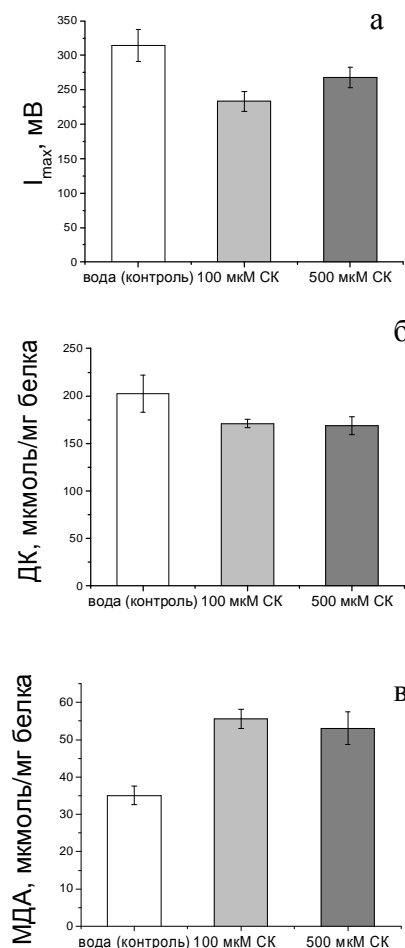


Рис. 1. Интенсивность ПОЛ клеток гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК в течение 15 мин (а – потенциальная способность к образованию свободных радикалов (I_{max}), б – содержание ДК, в – содержание МДА)

тем, что первичные продукты ПОЛ – ДК, к 15 минутам обработки салицилатом уже превратились в более поздний продукт – МДА.. Поддержание уровня липопероксидации в безопасных пределах для клетки осуществляется многокомпонентной системой АО-защиты, включающей в себя как ферменты, так и низкомолекулярные соединения. В обсуждаемых экспериментах оценивали суммарную АО-активность клетки растений гороха по биохимилюминисценции. В проведенных экспериментах наблюдали небольшое повышение активности АО-системы в растениях, обработанных СК, по сравнению с контрольной группой, причем эффект от меньшей концентрации был более ярко выражен (рис. 2).

Таким образом, обработка листьев гороха 100 и 500 мкМ СК в течение 15 минут в целом дала близкие результаты. Обе концентрации СК немного снижали потенциальную способность клетки к свободнорадикальному окислению и образование начальных продуктов ПОЛ – ДК, увеличивая, в свою очередь, содержание более позднего продукта ПОЛ – МДА.

Одновременно обработка СК в обеих концентрациях способствовала усилению суммарной АО-активности клеток гороха.

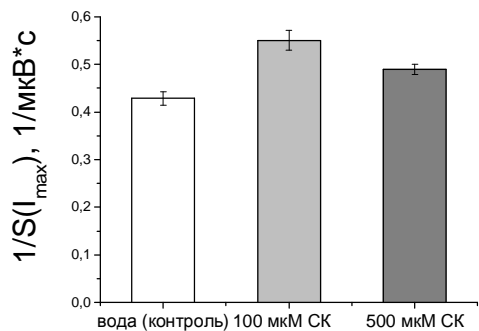


Рис. 2. Суммарная активность АО-системы ($1/S(I_{max})$) клеток гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК в течение 15 мин

продуктов ПОЛ – ДК и МДА, снижалось в равной степени в растениях, обработанных как 100мкМ, так и 500 мкМ СК (по сравнению с контрольной группой) (рис. 3, б, в).

Обнаружено, что на суммарную АО активность клеток гороха обработка СК при экспозиции 60 минут практически не влияла (рис. 4, а). Одними из основных АО-ферментов являются СОД и каталаза. При обработке растений СК в течение 1 часа наблюдались незначительные колебания активности данных ферментов: 100 мкМ СК немного усиливала активность обоих ферментов, а 500 мкМ СК незначительно ее снижала, по сравнению с контрольной группой растений, которые не были обработаны СК (рис. 4, б, в).

Таким образом, при обработке растений гороха СК в течение 1 часа не наблюдалось существенных различий между опытной и контрольной группой по обобщенным показателям – потенциальной способности клетки синтезировать свободные радикалы и общей АО-активности клетки. Однако наблюдалось снижение содержания продуктов ПОЛ – ДК и МДА под влиянием как 100, так и 500 мкМ СК. В то же время изменения, наблюдаемые в активности АО-ферментов – повышение активности СОД и каталазы под действием 100 мкМ СК и ее снижение под влиянием 500 мкМ СК – были незначительны.

При обработке растений СК в течение 120 минут потенциальная способность клеток гороха к образованию свободных радикалов в растениях, обработанных 500 мкМ СК, была на уровне контрольных

При обработке растений СК в течение 60 минут потенциальная способность клеток гороха к образованию свободных радикалов не изменялась в результате обработки СК любой из использованных концентраций, по сравнению с

контрольными растениями (рис. 3, а). Однако, содержание и первичных, и вторичных

Одновременно оценивали активность антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы. В нашей работе в растениях, выращенных на СК, уровень СОД достигал высокого уровня еще до начала действия стрессующего фактора и поддерживался на этом уровне на протяжении всего времени действия ТШ (рис. 9, б). Известно, что экспрессия генов СОД может активироваться салицилатом (Scandalios, 1997) и в ответ на действие стрессующих факторов (Matters, Scandalios, 1998; Bowler et al., 1989; Zhu, Scandalios, 1994). Но последнее происходит уже после начала влияния высокой температуры, тогда как обработка СК, вероятно, способствует предварительной подготовке АО-системы клеток гороха к последующему воздействию стресса.

Что касается другого АО-фермента – каталазы, то ее активность практически не изменялась в контрольных и опытных растениях на протяжении всего времени действия гипертермии (рис. 9, в).

В результате проведенных экспериментов наблюдали соответствие между интегральными показателями интенсивности ПОЛ и активности АО-системы (рис. 8, а, 9, а). Так до начала действия стрессового фактора общая АО-активность растений, обработанных СК была ниже контрольных значений. Но уже к 30 минутам действия высокой температуры суммарная АО-активность клеток под влиянием СК увеличивалась. Одновременно наблюдалось значительное снижение потенциальной способности клеток к образованию свободных радикалов под влиянием СК к 30 минутам действия гипертермии. К 60 и 120 минутам влияния ТШ способность к образованию свободных радикалов увеличивалась, а АО-активность уменьшалась примерно в равной степени.

Что касается интенсивности ПОЛ, оцениваемой по содержанию продуктов ПОЛ, то оно было явно ниже в растениях, обработанных СК (рис. 8, б, в). Можно предположить, что это объясняется тем, что салицилат активировал работу АО-системы еще до начала действия гипертермии (рис. 9, б).

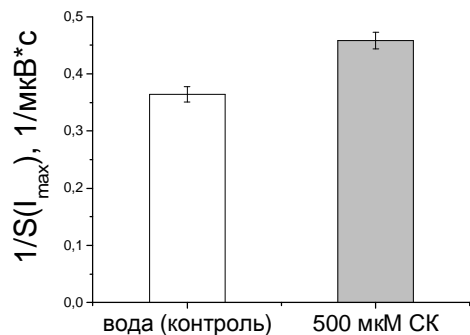


Рис. 7. Суммарная активность АО-системы ($1/S(I_{max})$) хлоропластов гороха при выращивании растений на 500 мкМ СК в течение 7 суток.

Таким образом, в процессе роста гороха на среде, содержащей 500 мкМ СК в течение достаточно длительного времени – 7 суток – происходили изменения про-антиоксидантной системы и клеток, и хлоропластов гороха, в результате которых наблюдалось снижение уровня ПОЛ и повышение активности АО-системы.

Вероятно, в данных условиях растения преадаптировались к возможному воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Это предположение было проверено на следующем этапе нашей работы.

Про- и антиоксидантный статус клеток гороха при тепловом шоке после продолжительной обработки салицилатом

Обнаружено, что потенциальная способность клеток гороха, предобработанного 500 мкМ СК, к образованию свободных радикалов, до начала действия высокой температуры не различалась у опытных и контрольных растений. После начала действия стрессирующего фактора в контрольных растениях данный показатель поддерживался на постоянном уровне, а в обработанных СК снижался по сравнению с контрольной группой (рис. 8, а).

Установлено, что содержание ДК и МДА изменялось незначительно независимо от длительности теплового шока, но было ниже в растениях, выращенных на салициловой кислоте (рис. 8, б, в).

Суммарная активность АО-системы до начала действия ТШ была выше в контрольной группе растений, у которой поддерживалась на этом уровне на протяжении всего действия стрессирующего фактора. В растениях, выращенных на СК, наблюдалось повышение активности АО-системы к 30 минутам действия ТШ, а затем постепенное снижение к 120 минутам влияния высокой температуры (рис. 9, а).

значений, тогда как 100 мкМ СК немного снижала этот показатель, по сравнению с контрольной группой (рис. 5, а). Содержание продуктов ПОЛ – ДК и МДА, было выше в растениях, обработанных СК в обеих концентрациях. При этом если содержание ДК увеличивалось сильнее под действием 100 мкМ СК, то количество МДА возрастало одинаково под влиянием обеих концентраций салицилата (рис. 5, б, в).

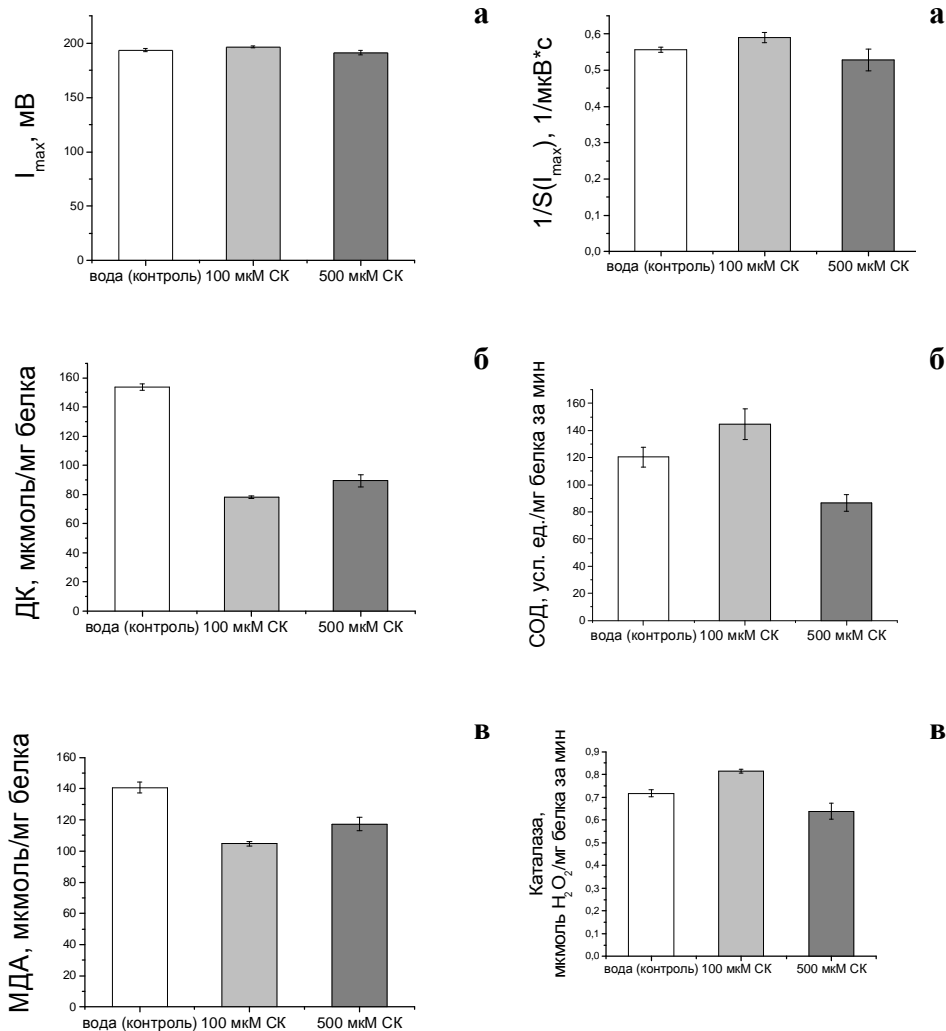
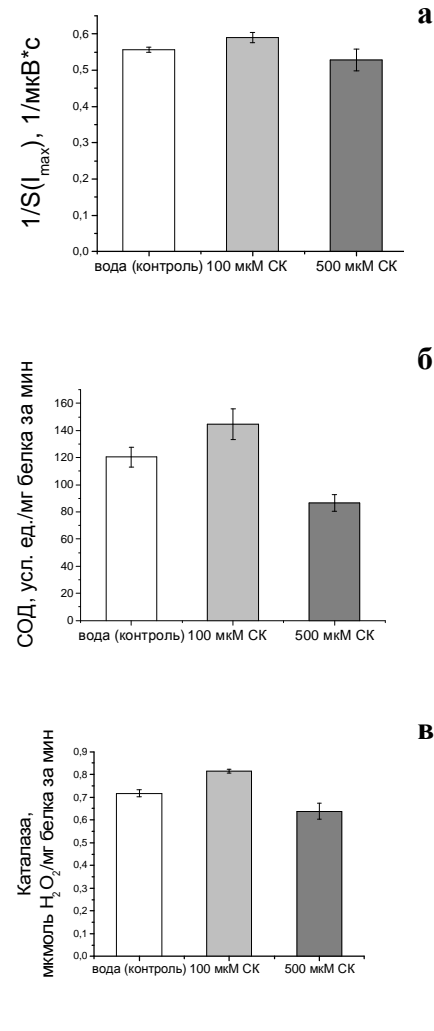


Рис. 3. Интенсивность ПОЛ клеток гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК в течение 60 мин (а – потенциальная способность к образованию свободных радикалов (I_{\max}), б – содержание ДК, в – содержание МДА)

Рис. 4. Активность АО-системы клеток гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК в течение 60 мин (а – суммарная АО-активность ($1/S(I_{\max})$), б – активность СОД, в – активность каталазы)



обработанных СК, по сравнению с контрольными, выращенными на воде (табл. 3). Суммарная активность АО-системы хлоропластов гороха, выращенного на 500 мкМ СК была выше, чем у контрольной группы (рис. 7).

Таким образом, СК в концентрации 500 мкМ, влияла на уровень ПОЛ и АО-систему хлоропластов гороха, снижая содержание продуктов ПОЛ и повышая активность АО-системы.

Таблица 3. Интенсивность ПОЛ хлоропластов гороха при выращивании растений на 500 мкМ СК в течение 7 суток

	Вода (контроль)	500 мкМ СК
Потенциальная способность к образованию свободных радикалов, I_{\max} , мВ	994,50 ± 28,00	507,50 ± 5,50
Содержание ДК, нмоль/мг общих липидов	566,57 ± 58,00	105,52 ± 13,87
Содержание МДА, нмоль/мг общих липидов	206,19 ± 2,00	9,98 ± 0,21
Содержание ШО, E_{440} /мг общих липидов	0,33 ± 0,02	0,05 ± 0,01

Сравнивая реакцию про- антиоксидантной системы клеток и хлоропластов гороха на длительную (7 суток) обработку 500 мкМ СК, можно отметить снижение уровня ПОЛ как в клетках, так и в хлоропластах гороха под влиянием СК. Суммарная АО-активность при действии СК повышалась только в хлоропластах. Это может быть связано с тем, что в хлоропластах сосредоточены основные антиоксиданты, которые могут активироваться СК – СОД и глутатионредуктаза – ключевой фермент аскорбат-глутатионового цикла (Rao et al., 1997). Повышение активности СОД в общей клеточной фракции под влиянием СК, возможно, наблюдалось в результате активации СК в том числе и хлоропластной СОД. Однако вклад хлоропластов в суммарную АО-активность, по-видимому, не является определяющим, так как наблюдалось ее снижение в клетках, несмотря на повышение в хлоропластах.

	Вода (контроль)	500 мкМ СК
Потенциальная способность к образованию свободных радикалов, I_{\max} , мВ	527,50 ± 125,50	621,00 ± 106,00
Содержание ДК, мкмоль/мг белка	218,34 ± 29,98	137,47 ± 3,91
Содержание МДА, мкмоль/мг белка	54,79 ± 3,44	21,03 ± 0,21

Суммарная АО-активность клеток растений, выращенных на СК, также в целом была ниже, чем у контрольной группы (табл. 2). Однако, активность основного АО-фермента – СОД значительно возрастала при выращивании на 500 мкМ СК. В свою очередь, активность каталазы не изменялась под влиянием салицилата, оставаясь на уровне контроля (табл. 2).

Таблица 2. Активность АО-системы клеток гороха при выращивании растений на 500 мкМ СК в течение 7 суток

	Вода (контроль)	500 мкМ СК
Суммарная АО-активность, $1/S(I_{\max})$, $1/\text{мкВ} \cdot \text{с}$	0,53 ± 0,05	0,38 ± 0,01
Активность СОД, усл. ед./мг белка за мин	25,12 ± 6,39	113,15 ± 6,25
Активность каталазы, мкмоль H_2O_2 /мг белка за мин	0,59 ± 0,05	0,57 ± 0,03

Таким образом, при длительном влиянии СК на растения гороха наблюдалось усиление работы АО-системы клеток, что выражалось в снижении уровня ПОЛ и активации основного АО-фермента СОД.

Изменение про- и антиоксидантного статуса хлоропластов гороха при продрлжительной обработке растений салициловой кислотой

Наиболее интенсивно генерация АФК идет на сопрягающих мембранах хлоропластов и митохондрий (Аверьянов, 1991). В связи с этим представляло интерес исследовать, какие изменения будут наблюдаться в хлоропластах гороха при обработке растений 500 мкМ СК в течение длительного времени.

Согласно полученным данным, потенциальная способность хлоропластов гороха к образованию свободных радикалов у обработанных СК растений была существенно ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Содержание всех анализированных продуктов ПОЛ (ДК, МДА и ШО) было намного ниже в растениях,

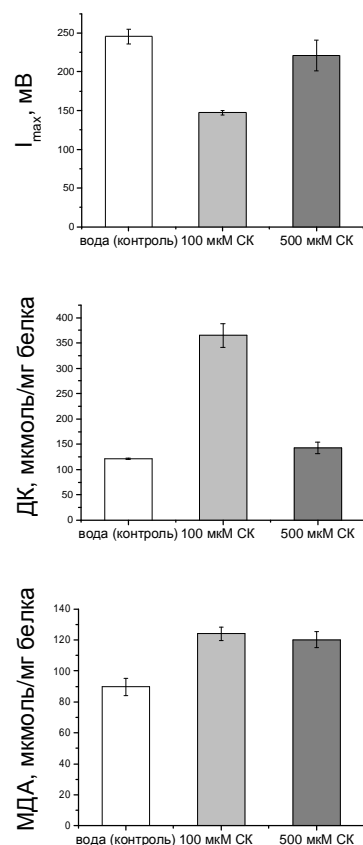


Рис. 5. Интенсивность ПОЛ клеток гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК в течение 120 мин (а – потенциальная способность к образованию свободных радикалов (I_{\max}), б – содержание ДК, в – содержание МДА)

Одновременно, двухчасовое действие СК инактивировало работу АО-системы в целом и одновременно снижало активность основного АО-фермента – СОД, особенно в концентрации 500 мкМ, однако, активность каталазы практически не изменялась.

В целом, исследование кратковременного действия двух концентраций СК (100 и 500 мкМ) на проростки гороха показало, что 15-ти минутное

а 120-минутная обработка растений СК, в отличие от экспозиции 60 минут, оказывала влияние и на АО-систему клетки. Так, несмотря на то, что суммарная АО-активность общеклеточной фракции гороха не изменялась при обработке 100 мкМ СК по сравнению с контролем, она снижалась при обработке 500 мкМ СК (рис. 6, а). Что касается основных АО-ферментов, СОД и каталазы, то в обработанных СК растениях наблюдалось снижение активности СОД, причем более высокая концентрация салицилата сильнее ингибировала фермент (рис. 6, б). Активность каталазы не изменялась под влиянием 100 мкМ СК и немного увеличивалась 500 мкМ салицилатом по сравнению с контрольными растениями (рис. 6, в).

Таким образом, обработка листьев гороха СК в течение 2 часов приводила к увеличению интенсивности ПОЛ, что отражалось в росте содержания продуктов ПОЛ – ДК и МДА.

Одновременно, двухчасовое действие СК инактивировало работу АО-системы в целом и одновременно снижало активность основного АО-фермента – СОД, особенно в концентрации 500 мкМ, однако, активность каталазы практически не изменялась.

В целом, исследование кратковременного действия двух концентраций СК (100 и 500 мкМ) на проростки гороха показало, что 15-ти минутное

и часовое воздействие СК приводило к незначительному снижению интенсивности ПОЛ и небольшой активации АО-системы клетки. Кроме того существенной разницы между влиянием двух концентраций СК не наблюдалось. В свою очередь, обработка проростков гороха СК в течение 2 часов вызывала, наоборот, усиление ПОЛ. Одновременно наблюдалось угнетение работы АО-системы, особенно СОД под действием 500 мкМ СК..

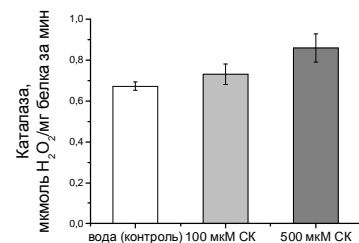
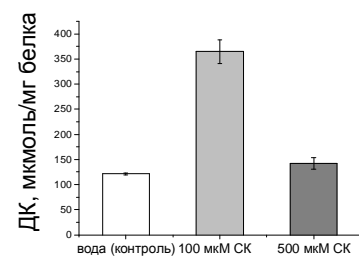
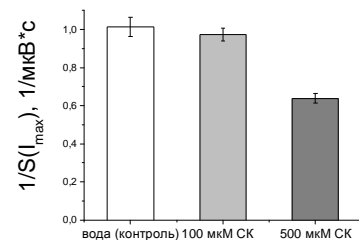


Рис. 6. Активность АО-системы клеток гороха при обработке листьев 100 и 500 мкМ СК в течение 120 мин (а – суммарная АО-активность ($1/S(I_{max})$), б – активность СОД, в – активность каталазы)

по сравнению с контрольной группой почти в 2 раза (табл. 1).

Таблица 1. Интенсивность ПОЛ клеток гороха при выращивании растений на 500 мкМ СК в течение 7 суток

а В литературе встречаются данные, в соответствии с которыми степень экзогенного влияния СК на разнообразные процессы в клетках растений прямопропорционально зависит от концентрации и времени действия салицилата (Dat et al., 1998). В наших экспериментах данное наблюдение подтвердилось и было замечено, что более высокая концентрация и более длительное влияние СК вызывали и более заметный эффект на состояние про- и антиоксидантной системы клеток гороха.

б Учитывая изложенные выше результаты, представлялось интересным посмотреть, как будет влиять 500 мкМ СК на про- и антиоксидантный статус растений гороха при длительном действии салицилата.

в В результате данного эксперимента наблюдали, что потенциальная способность клеток гороха к образованию свободных радикалов не изменялась при выращивании растений на 500 мкМ СК, тогда как содержание продуктов ПОЛ – ДК и МДА, у растений, выращенных на СК, было ниже