

Научно-исследовательская работа

Биология

**«ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ
ПРОЦЕССЫ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ»**

Выполнил:

Ванисов Сергей

учащийся 11 класса

ГБОУ СОШ №1 с углубленным изучением английского языка

Россия, г. Санкт-Петербург

Научный руководитель работы:

Емельянов Владислав Владимирович

(кандидат биологических наук, доцент СПбГУ)

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Россия, г. Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ.

Живые организмы постоянно испытывают на себе влияние различных факторов окружающей среды. Растения, в силу своего прикрепленного образа жизни, особенно подвержены этим воздействиям. Одним из широко распространенных неблагоприятных факторов является кислородная недостаточность, которая наблюдается при затоплении растений, образовании ледяной корки на поверхности почвы при выращивании озимых злаков (рис. 1), создании асфальтовых покрытий в городах и т.д. С гипоксическим или аноксическим воздействием тесно связано влияние еще одного неблагоприятного фактора – окислительного стресса, который возникает сразу после действия кислородной недостаточности, когда растения вновь оказываются в условиях нормальной аэрации. В природе окислительный стресс – прямое следствие гипоксии и аноксии, поэтому устойчивые к кислородной недостаточности растения, по-видимому, должны обладать устойчивостью и к этому воздействию.



Рис. 1.
Образование
ледяной корки на
почве при
выращивании
озимых злаков.

Постоянное или временное переувлажнение характерно для многих регионов Земли, и в том числе для Северо-Запада России. Подобные условия способствуют возникновению кислородной недостаточности, при этом ограничивается жизнедеятельность представителей дикой флоры и создаются трудности для возделывания сельскохозяйственных культур. Поэтому изучение

путей адаптации растений к кислородной недостаточности и последующей реаэрации представляет большой интерес и имеет значительную практическую ценность.

Целью настоящей работы стало изучение генерации пероксида водорода в тканях растений пшеницы и перекисного окисления липидов мембран, а также влияние на эти процессы салициловой кислоты.

Нами были поставлены следующие задачи:

- определить содержание пероксида водорода в побегах и корнях пшеницы и риса в условиях аноксии;
- установить интенсивность перекисного окисления липидов мембран в условиях аэрации и аноксии;
- оценить действие салициловой кислоты на перекисное окисление липидов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

2.1. Особенности устойчивости к недостатку или отсутствию кислорода.

Способность организмов переносить временный дефицит или отсутствие кислорода широко распространена в природе. Растения часто подвергаются воздействию этого неблагоприятного фактора. Подобные условия имеют место при затоплении и заболачивании почвы, когда воздух вытесняется из неё водой. Наиболее часто в этих условиях оказываются озимые хлеба (пшеница, ячмень, рожь), рис, соя, хлопчатник, а также некоторые древесные растения (ива, ель, сосна, берёза и некоторые фруктовые деревья). Явления гипоксии и аноксии имеют много общего, поскольку некоторые ткани растений испытывают при гипоксии острое отсутствие кислорода [36].

Различные растения по-разному воспринимают условия кислородного голодания. Так, рис переходит к анаэробному обмену при содержании кислорода в среде 5-10%, тогда как у пшеницы подобные явления наблюдаются при содержании кислорода в среде более 10% [5]. Считается, что гипоксическое воздействие начинается тогда, когда парциальное давление кислорода становится недостаточным для нормального образования АТФ митохондриями [7]. При этом наступает энергетическое голодание тканей растений. Аноксическое воздействие имеет место, если образование АТФ митохондриями становится значительно ниже, чем ее синтез в ходе субстратного фосфорилирования в гликолизе. Таким образом, гипоксия и аноксия, действительно, являются стрессовыми факторами, имеющими много общих черт и тесно связанных друг с другом.

2.1.1. Структурные изменения при аноксии.

При ограничении доступа кислорода к тканям, растения стараются сохранить его достаточный для выживания уровень. Показано, что у некоторых

растений происходит утолщение и укорачивание корней [36]. У представителей болотной флоры в тканях образуются воздухоносные ходы – аэренхима. Образование последней связано с работой гидролитических ферментов или с запланированной клеточной смертью на определённых участках [7]. В период аноксии смерть клеток становится более выраженной [3].

2.1.2. Метаболические изменения при аноксии.

В условиях аноксии происходит ингибирование электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, и, как следствие этого, прекращение окислительного фосфорилирования.

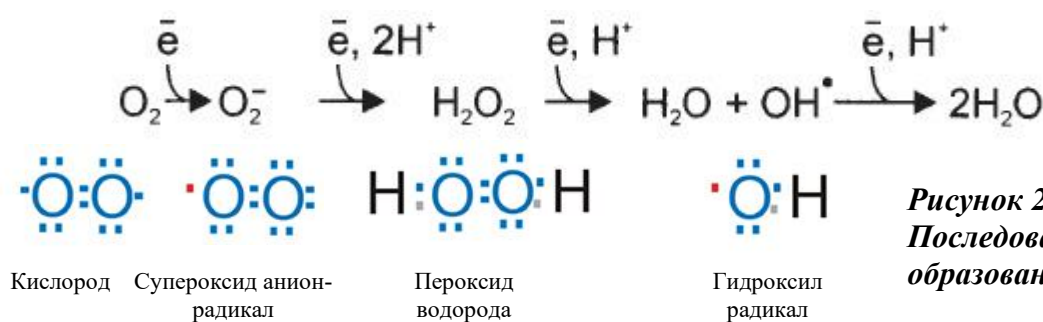
Основным источником энергии, т.е. АТФ, в этих условиях является гликолиз, в котором происходят процессы субстратного фосфорилирования. Снижение содержания АТФ в тканях при аноксии характерно и для устойчивых и для неустойчивых растений, хотя первые способны поддерживать энергетический статус своих клеток в течение более длительного времени [36].

Одним из важных последствий энергетического голодания является высокий восстановительный потенциал клеток. При отсутствии кислорода восстановители не способны перейти в окисленную форму и остаются в восстановленной форме. Такая ситуация и приводит к активированию альтернативных путей реокисления восстановленных форм, важную роль среди которых играют брожения. Основными видами брожения являются молочнокислое и спиртовое [36].

Известно, что первичным стрессовым сигналом является появление в тканях активных форм кислорода (АФК) [18]. Аноксия в этом отношении не исключение. Показано, что уже в период анаэробно-анаэробного периода, а особенно в период постаноксической аэрации в тканях как устойчивых, так и неустойчивых к недостатку кислорода накапливаются АФК [3].

2.2. Активные формы кислорода.

Молекула кислорода довольно медленно реагирует с органическими молекулами, так как имеет на внешних орбиталях два неспаренных электрона с параллельными спинами, а в органических молекулах, как правило, на внешних орбиталях находятся пары электронов с антипараллельными спинами. Однако в клетке в некоторых условиях существует вероятность образования форм кислорода, которые обладают необычайно высокой активностью и способны повреждать практически все компоненты клетки, включая белки (окисление аминокислотных остатков, образование ковалентных «сшивок»), липиды, ДНК (повреждение азотистых оснований) и мембранные структуры. Активация кислорода может происходить либо при поглощении энергии, необходимой для изменения спина одного из электронов кислорода, либо в ходе реакций восстановления. В первом случае образуется химически активный синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), во втором возникают различные АФК, являющиеся промежуточными продуктами восстановления кислорода до воды в электрон-транспортных цепях:

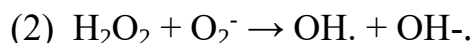
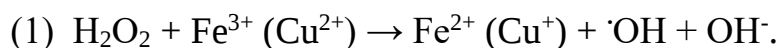


*Рисунок 2.
Последовательные стадии
образования АФК*

Наименьшей стабильностью среди АФК отличается супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), образующийся при передаче кислороду одного электрона [33]. Супероксидный анион-радикал генерируется, в первую очередь, в ЭТЦ митохондрий и хлоропластов. В хлоропластах он возникает в фотосистеме I (при участии ферредоксина) и фотосистеме II (в результате фотолиза воды), а также при функционировании РБФ-карбоксилазы как оксигеназы.

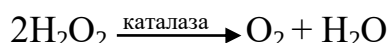
Пероксид водорода (H_2O_2) образуется при последующем получении супероксидным анион-радикалом (или гидропероксильным радикалом) ещё одного электрона и представляет собой более стабильное соединение [33]. Это соединение не является свободным радикалом, но участвует в качестве окислителя средней силы во многих реакциях. В отличие от супероксида, H_2O_2 способен диффундировать через мембраны. Пероксид может инактивировать некоторые ферменты, окисляя их тиоловые группы. Так, Cu/Zn-супероксиддисмутаза и Fe-супероксиддисмутаза инактивируются H_2O_2 .

Гидроксильный анион радикал ($\cdot\text{OH}$) является наиболее активной формой кислорода, неферментативно образующейся в результате реакции Фентона (1) или реакции Хабера-Вейса (2) [27, 31]:



Гидроксил-радикал наиболее частый инициатор перекисного окисления липидов.

Пероксид водорода и особенно супероксидный анион радикал из-за высокой токсичности в клетках быстро трансформируются в H_2O и O_2 под действием ферментов [34]:



Аналогично с каталазой действует пероксидаза, катализируя устранение пероксида водорода. В этих реакциях донором протонов может быть субстрат (A):

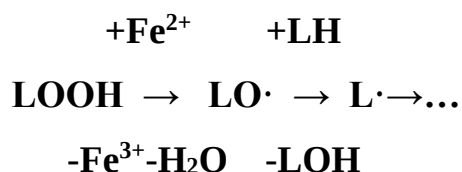
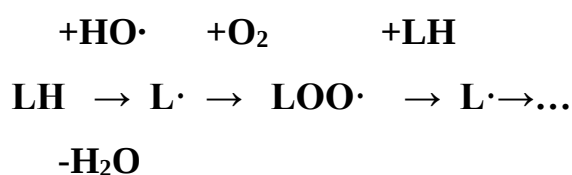


АФК в тканях растений играют важную роль, если растение способно контролировать их концентрацию. Благодаря АФК растение может уничтожить патоген путем окислительного стресса и в результате реакции сверхчувствительности сформировать вокруг него зону из мертвых растительных клеток, насыщенных антимикробными соединениями [32].

Активные формы кислорода могут отщеплять электрон от многих соединений, превращая их в новые свободные радикалы, и инициируют тем самым цепные окислительные реакции, в конечном итоге ведущие к гибели клеток.

2.3. Перекисное окисление липидов.

В устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям существенна также роль липидов. Основные субстраты ПОЛ - это ненасыщенные жирные кислоты в составе фосфолипидов. Продуктами на ранних стадиях процесса являются гидроперекиси жирных кислот, которые в ходе метаболизма могут образовывать спирты, альдегиды и другие окисленные соединения. Конечным продуктом является малоновый диальдегид (МДА), этан, пентан и др. ПОЛ индуцируется активными формами кислорода (АФК) и превращается в цепную реакцию по следующей схеме:



Показано на корнях пшеницы и риса, что процессы ПОЛ протекают и при анаэробнозе. Но если у пшеницы уровень пероксидации уже через 1 сутки аноксии увеличивался на 22,5%, то у риса исходный уровень МДА сохранялся вплоть до 7 суток аноксии [37].

Выяснено, что интенсификация ПОЛ происходила при поступлении кислорода после анаэробного воздействия. У риса усиление ПОЛ при пост-аноксическом доступе кислорода было выражено слабее, чем у пшеницы, что,

видимо, связано с существованием у него более совершенных систем антиоксидантной защиты, о которых говорилось выше.

На двух видах ириса, *Iris pseudacorus* L. и *Iris germanica* L., устойчивом и неустойчивом к аноксии соответственно, показаны различия метаболизма в пост-аноксическом периоде. У неустойчивого вида после 10-14 суток аноксии содержание МДА при возвращении на воздух возрастало в 150 раз, в то время как на *I. pseudacorus* такая обработка не оказывала заметного влияния [10]. Показано, что в период реаэрации после семисуточной аноксии образование АФК происходит только у *I. Germanica* [5].

Таким образом, уровень ПОЛ является одним из показателей устойчивости к стрессовому воздействию. Деградация жирных кислот способствует ПОЛ, интенсивность которого при неблагоприятных воздействиях возрастает.

Пост-аноксическое воздействие - это фактически окислительный стресс, а уровень МДА и методы, демонстрирующие степень сохранности мембран клеток - это хорошие показатели активности окислительных процессов и степени развития адаптивных механизмов.

2.4. Салициловая кислота

В последние годы значительный интерес исследователи проявляют к салициловой кислоте – стрессовому метаболиту, сочетающему свойства сигнального интермедиата и фитогормона [6]. Салициловая (*орто*-гидроксибензойная) кислота (СК) относится к группе растительных фенольных соединений. Салициловая кислота – $C_7H_6O_3$; бесцветные кристаллы; темп-а пл. 159,5 °С, темп-а. кип. 211 °С. Отлично растворяется в диэтиловом эфире и этаноле, плохо растворяется в воде. СК – одна из наиболее распространенных оксибензойных кислот. В природе существует в растениях в виде производных – чаще всего в виде гликозида метилового эфира. Салициловая кислота впервые

была выделена из ивовой коры Рафаэлем Пириа. С этим связано название этого вещества, *Salix* по Латыни - это ива.

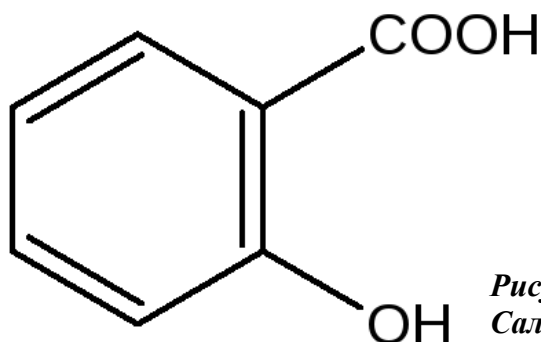


Рисунок 3.
Салициловая кислота

В настоящее время салициловая кислота считается эндогенным биорегулятором фенольной природы, который выполняет множество физиологических функций в клетках растений [29]. В растениях она синтезируется из шикимовой кислоты двумя путями (*рис. 4*)

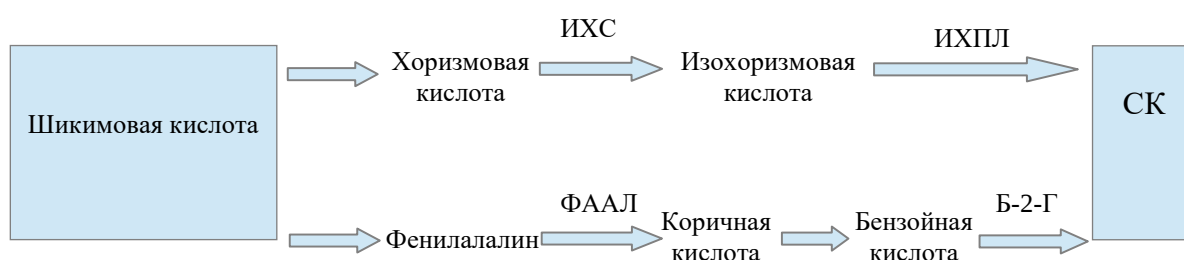


Рисунок 4. Два пути биосинтеза СК в растениях. [4, 22, 26, 29]
ИХС — изохоризматсинтаза; ИХПЛ — изохоризматпируватлиаза; ФААЛ — фенилаланинаммонийлиаза; Б-2-Г — бензоат-2-гидроксилаза.

Различные неблагоприятные условия окружающей среды стимулируют появление в тканях растений активных форм кислорода, таких как пероксид водорода. Чрезмерное накопление АФК ведет к разрушению мембраны клеток растения (ПОЛ), но это можно избежать при правильной работе антиоксидантной системы АФК в тканях растений, которая может стимулировать включение защитных процессов и экспрессии стрессовых генов [13].

Показано, что СК может регулировать процессы через соответствующие рецепторные системы растительных клеток, а также участвовать в регуляции

работы ряда ферментов, в частности каталазы [24], которая ускоряет разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород. Были проведены эксперименты, в ходе которых добавление СК в водные вытяжки из клеток культуры ткани полисциас (*Polyscias*) вызывало дозозависимое ингибирование каталазы [24]. Таким образом, СК модулирует работу антиоксидантной системы, что может приводить к накоплению H_2O_2 в тканях растений и последующему развитию окислительного стресса. Заключительным этапом происходит реакция ПОЛ, одним из продуктов которой, является малоновый диальдегид (МДА).

Однако действие салициловой кислоты не всегда является отрицательным. В исследованиях действия СК на холодоустойчивость проростков огурца, экзогенная СК и при обычной температуре (22 °C), и в условиях низкой закалывающей (12 °C) и повреждающей (4 °C) температуры снижала ПОЛ, приводя к уменьшению уровня МДА, а также способствовала накоплению в семядольных листьях свободного пролина [35]. Полученные данные свидетельствуют о способности СК активизировать процессы, направленные на повышение холодоустойчивости растений огурца [35].

В клетках арабидопсиса происходило кратковременное увеличение содержания СК в ответ на мягкий тепловой шок (действие температуры 37°C) [12]. Изменение содержания СК в ответ на гипертермию детально изучено на примере молодых растений винограда [25]. Показано, что через 1 ч после начала инкубации растений при температуре 38°C содержание эндогенной СК увеличивалось в 4 раза, а в течение последующих 23 ч постепенно снижалось до контрольного уровня. Теплоустойчивость растений винограда возрастала в течение первого часа и достигала максимума к 6 ч. В целом идентичный характер изменения содержания СК и развития теплоустойчивости зарегистрирован и при изучении действия гипертермии на растения горчицы [6].

На примере растений винограда показано, что содержание конъюгированной (гликозилированной) СК практически не изменялось при воздействии высоких температур, увеличение содержания СК происходило за счет свободной ее формы [25], что позволяет предполагать именно активацию синтеза СК, а не распад ее конъюгатов. Увеличение содержания свободной СК сопровождалось возрастанием активности фенилаланинаммиаклиазы, которая является ферментом, лимитирующим скорость синтеза СК на первом его этапе [25]. Повышение активности фенилаланинаммиаклиазы рассматривается как один из механизмов обеспечения устойчивости к патогенам [16]. Предполагается, что путь накопления СК в растениях при действии патогенов и абиотических стрессоров может быть идентичным – биосинтетическим, связанным с образованием *транс*-коричной кислоты, являющейся предшественником СК.

Значение эндогенной СК в формировании теплоустойчивости показано на примере мутантов арабидопсиса, дефектных по синтезу СК. Они имели пониженную теплоустойчивость [14].

С помощью экзогенной СК удалось индуцировать устойчивость растений к осмотическому и солевому стрессам. СК повышала засухоустойчивость проростков пшеницы [1], огурца, тыквы [9], растений томата, фасоли [20]. Экзогенная СК уменьшала последствия водного стресса и для растений подсолнечника [11]. Также показано положительное влияние экзогенной СК на растения риса [15], огурца [21], при действии на проростки пшеницы потенциально летального солевого стресса [30].

Защитные эффекты экзогенной СК зарегистрированы и в условиях воздействия на растения тяжелых металлов, в частности, кадмия [19], никеля, свинца [23]. Положительное действие СК на растения в условиях стресса, вызываемого тяжелыми металлами, проявлялось в нормализации функционирования фотосинтетического аппарата, сохранении активности антиоксидантных ферментов [19, 23].

Тем не менее, в литературе отсутствуют сведения о влиянии салициловой кислоты на окислительные процессы в клетке. В связи с этим нами были предприняты попытки изучения этого вопроса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

3.1. Растительный материал.

Объектами исследования являлись 7-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта “Ленинградка” и 10-дневные проростки японской разновидности риса (*Oryza sativa* L.) сорта “Лиман” (рис. 5).



Triticum aestivum



Oryza sativa

Рисунок 5. Растения, использовавшиеся для проведения экспериментов.

Семена протравливали 5% раствором NaClO в течение 10 мин, промывали теплой кипяченой водой и замачивали на 1 ч в горячей воде (45-50°C для пшеницы и 50-60°C для риса). Семена пшеницы проращивали в термостате при 23°C двое суток, а риса – при 28°C трое суток. Далее проростки пересаживали на перфорированные пластиковые пластины таким образом, чтобы корни растений находились в сосудах, содержащих 1,2 л 1/5 модифицированного раствора Кнопа, через который постоянно продували воздух, и выращивали при освещении 80 Вт/м² и температуре 20-21°C (рис. 6).

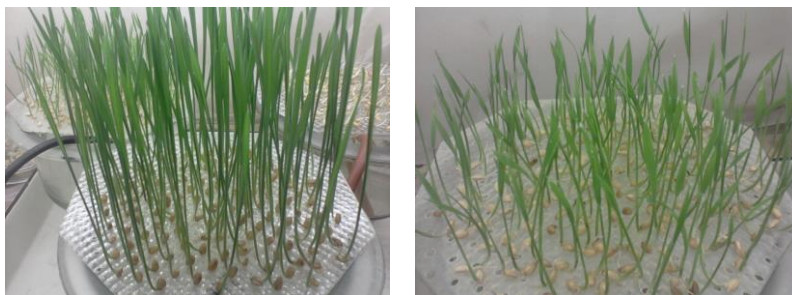


Рисунок 6. Выращивание растений на перфорированных пластинах (слева – пшеница, справа – рис).

Часть растений использовали для анализа в качестве исходного материала, оставшуюся часть разделяли на опытные и контрольные варианты. Для создания анаэробных условий растения опытных вариантов помещали в камеры объёмом 1,5 л, через которые 40 минут пропускали газообразный азот (содержание кислорода $<0,01\%$; АОЗТ “Лентехгаз”, С.-Петербург), затем камеры герметично закрывали и помещали в темноту для предотвращения образования кислорода на свету. Экспозиция в атмосфере азота составляла 12 и 24 часа (рис. 7). Контрольные растения находились в темноте в условиях аэрации.



***Рисунок 7.
Анаэробная камера с растениями в условиях аноксии.***

3.2. Предобработка растений салициловой кислотой.

Предобработке подвергались 6-дневные и 9-дневные проростки пшеницы и риса соответственно. Корни проростков помещали в стакан с 20% модифицированным раствором Кнопа, в котором был добавлен раствор

салициловой кислоты (СК) в концентрации 100 мкМ/л. Предобработка длилась 1 сутки, и в этот период растения контрольных и опытных вариантов находились в темноте при комнатной температуре. Через сутки корни предобработанных растений промывали дистиллированной водой, помещали в стаканы со свежеприготовленным питательным раствором и подвергали анаэробному воздействию.

3.3. Определение содержания пероксида водорода.

Количество H_2O_2 определяли спектрофотометрическим методом при помощи ФОх-реактанта с ксиленовым оранжевым (Sigma). Для этого заранее готовили два реактива. Первый из них состоял из 25 мМ FeSO_4 и 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, которые растворяли в 2,5 М серной кислоте. 1 мл этого раствора добавляли к 100 мл другого, содержащего 0,1 М сорбит и 125 мкМ ксиленового оранжевого [8]. Для определения содержания пероксида водорода отрезки растительной ткани длиной 30 мм помещали в питательный раствор без железа и микроэлементов на 30 минут в темноту. Далее 1 мл раствора смешивали с 1 мл ФОх-реактанта и оставляли еще на 30 минут для развития окраски. Об уровне продукции судили на основании изменения оптической плотности раствора при 560 нм на спектрофотометре UNICO 2800H UV/VIS (США). Для определения абсолютных значений содержания H_2O_2 была построена калибровочная кривая по стандартным растворам пероксида водорода.

Специфичность пробы была подтверждена ингибированием продукции H_2O_2 добавлением 500 ед. каталазы на 1 мл среды инкубации.

3.4. Оценка выхода электролитов из растительной ткани.

Выход электролитов определяли измерением электропроводности раствора с помощью кондуктометра Анион-7020 (Россия).

По окончании срока экспозиции в анаэробной среде (1 сутки) корни и побеги 10 растений опытных и контрольных вариантов промывали,

обсушивали, отделяли от зерновки и помещали в пробирки с дистиллированной водой ($V=20$ мл). Штатив с пробирками помещали в темноту. Через 3 часа инкубационного периода измеряли электропроводность раствора, указывающую на выход электролитов из тканей. В каждом опыте определяли исходную электропроводность дистиллированной воды, которую вычитали из опытной пробы. Далее растения помещали обратно в раствор, кипятили на водяной бане в течение 30 мин и остужали, после чего измеряли общее содержание электролитов в растительной ткани. Выход электролитов из побегов и корней рассчитывали в процентах от общего содержания.

3.5. Тетразолиевый тест.

Для тетразолиевого анализа использовали 5 отрезков побегов (3 см от основания побега) контрольных и опытных вариантов растений после окончания срока экспозиции в атмосфере азота. После взвешивания отрезки помещали в пробирки с 5 мл раствора 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (8 г/л), приготовленного на 0,1 М фосфатном буфере ($pH=6,9$). Далее в течение 15 минут раствор с отрезками растительной ткани подвергали вакуумной инфильтрации (-75 кПа), после чего пробирки оставляли на ночь в термостате ($27-30^{\circ}C$). На следующий день проводили экстракцию трифенилформазана (восстановленная форма 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида красного цвета). Для этого трехкратно промытые дистиллированной водой отрезки растительных органов заливали 4 мл 96% этилового спирта и кипятили в течение 5 минут на водяной бане. Доводили экстракт трифенилформазана до 4 мл. Измерение оптической плотности полученного спиртового экстракта проводили при 485 нм на спектрофотометре Unico 2800H UV/VIS (США). Жизнеспособность оценивали в единицах оптической плотности A_{485} на 1 г сырой массы.

3.6. Определение перекисного окисления липидов мембран.

Растительный материал (1 г) гомогенизировали в 10 мл 0,1 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) с кварцевым песком, после чего пробы фильтровали для отделения мезги и песка. Из полученного экстракта отбирали 2,5 мл, к нему добавляли 1,25 мл воды и 1,25 мл 0,5% раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 10% ТХУ. Полученную смесь встряхивали и кипятили на водяной бане 30 минут до появления окраски (рис. 8).



Рисунок 8. Кипячение проб на водяной бане

Полученные пробы охлаждали и центрифугировали (20 мин, 5500g) для осаждения взвеси и определяли в них содержание малонового диальдегида (МДА) на спектрофотометре UNICO 2800H UV/VIS (США).

Содержание малонового диальдегида рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{D \cdot \omega}{m \cdot 2,5 \cdot l}$$

где С – содержание малонового диальдегида;

D - оптическая плотности;

ω – общее разведение ферментной вытяжки;

m - навеска растительного материала, г;

l - длина оптического пути, 1 см;

2,5 - коэффициент миллимолярной экстинкции тиобарбитуровой кислоты, 1/мм·см.

Результаты обработаны статистически, на графиках приведены средние значения величин и среднеквадратичные ошибки среднего.

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии растений биологического факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

4.1. Генерация пероксида водорода в условиях аноксии и постаноксической реаэрации.

Мы рассмотрели также влияние аноксии и постаноксической аэрации на продукцию пероксида водорода в побегах и корнях проростков пшеницы и риса. Оказалось, что исходный уровень продукции пероксида у риса, также, как и супероксидного анион-радикала, был выше, чем у пшеницы (рис. 9).

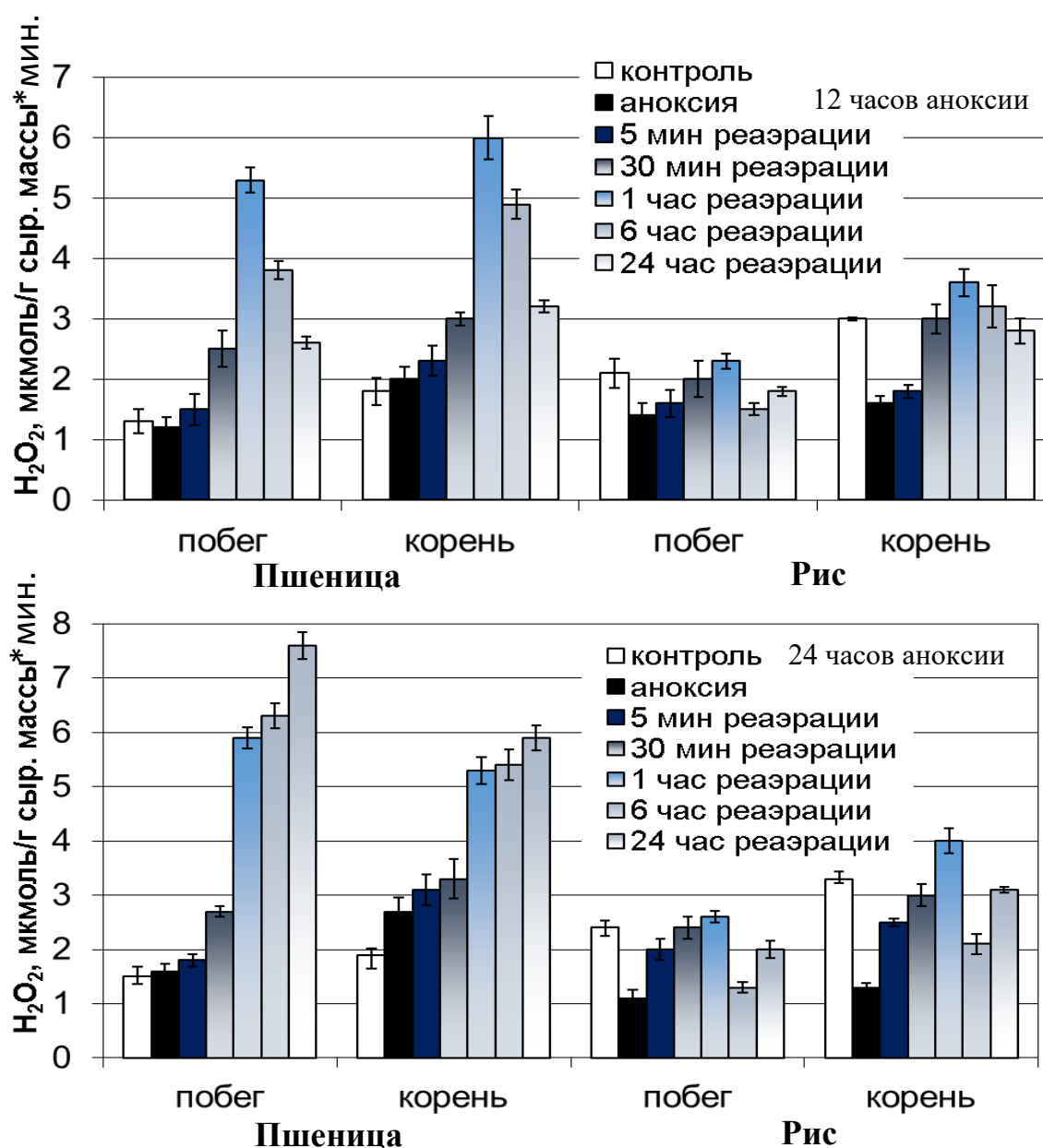


Рис. 9. Генерация H_2O_2 после 12 и 24 ч. аноксии и последующей реаэрации.

У проростков пшеницы аноксия не приводила к существенному изменению в содержании пероксида водорода. У риса, в отличие от пшеницы, аноксическое воздействие значительно снижало уровень продукции, причём тем больше, чем длительнее была экспозиция в атмосфере азота (*рис. 9*).

Во время реоксигенации у обоих растений уровень продукции пероксида водорода повышался. У пшеницы как в побегах, так и в корнях после 12 и 24 ч аноксии происходило резкое (5-кратное) увеличение продукции через 1 час пребывания на воздухе, после чего количество пероксида снижалось до контрольного уровня (*рис. 9*).

Несмотря на более высокое исходное содержание H_2O_2 у риса, по сравнению с пшеницей, значительного ее накопления при реаэрации у него не происходило. Полученные данные могут свидетельствовать о более эффективной работе у риса как систем продукции АФК, так и антиоксидантной системы, в частности каталазы и пероксидаз, участвующих в распаде пероксида водорода.

Итак, результаты проведённой работы показали, что в условиях нормальной аэрации устойчивое к гипоксии растение (рис) продуцирует большее количество пероксида водорода, чем неустойчивое – пшеница (*рис. 9*). Однако в условиях аноксии и постаноксической аэрации у риса ее накопление практически отсутствовало (*рис. 9*). В то же время в проростках пшеницы и в побегах, и в корнях наблюдалось значительная аккумуляция H_2O_2 , особенно хорошо заметная после часовой реаэрации. Меньшее накопление H_2O_2 устойчивым растением, может быть связано с большей эффективностью работы антиоксидантных ферментов именно у устойчивых к гипоксии растений. В пользу последнего предположения говорит и тот факт, что исходный уровень АФК в тканях риса выше, чем у пшеницы. По-видимому, антиоксидантная система клеток риса, находится в большей

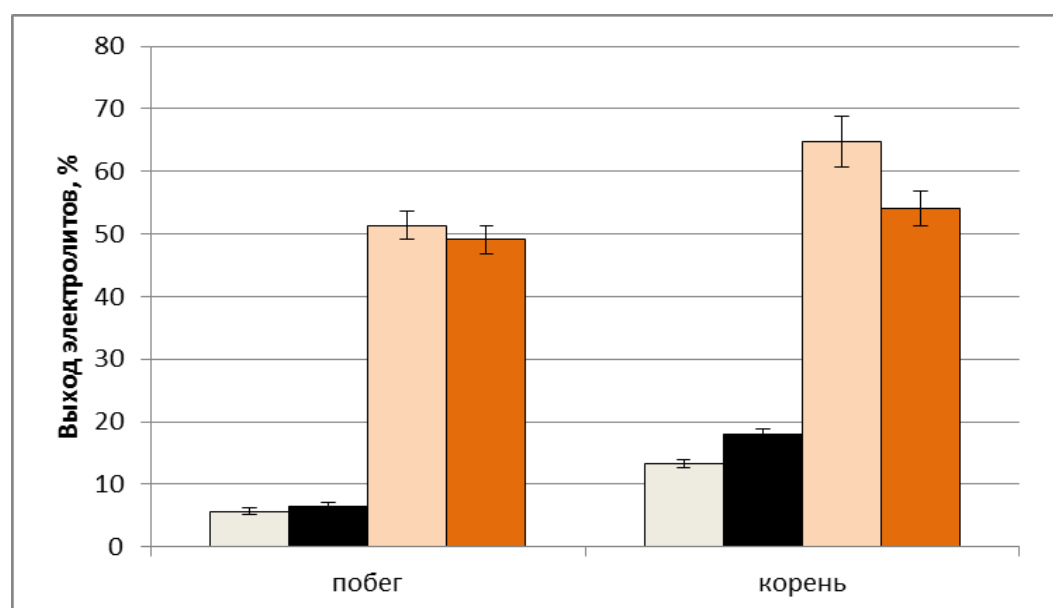
готовности к разрушению АФК, тогда как ткани пшеницы не нуждаются в постоянной работе ферментов этих систем в нормальных условиях.

Показано, например, возрастание активности супероксид-дисмутазы (СОД), превращающей супероксидный анион-радикал в пероксид водорода, в корневищах ирисов в аноксический и постаноксический периоды, особенно у устойчивого вида, которое связывали с синтезом её белка *de novo* [17]. Однако снижение уровня пероксида водорода у риса может быть результатом не только ограничения его образования в реакции СОД, но и более интенсивной переработкой его в реакциях, катализируемых, каталазой и пероксидазами – ферментами, отвечающими за разрушение H_2O_2 или использующими её в качестве одного из субстратов для получения фенольных полимеров.

4.2. Влияние аноksии и предобработки салициловой кислоты на выход электролитов из тканей растений.

На рисунке 10 представлены результаты воздействия аноksии и обработки 100 мкМ салициловой кислоты на выход электролитов из тканей растений пшеницы и риса.

А



Б

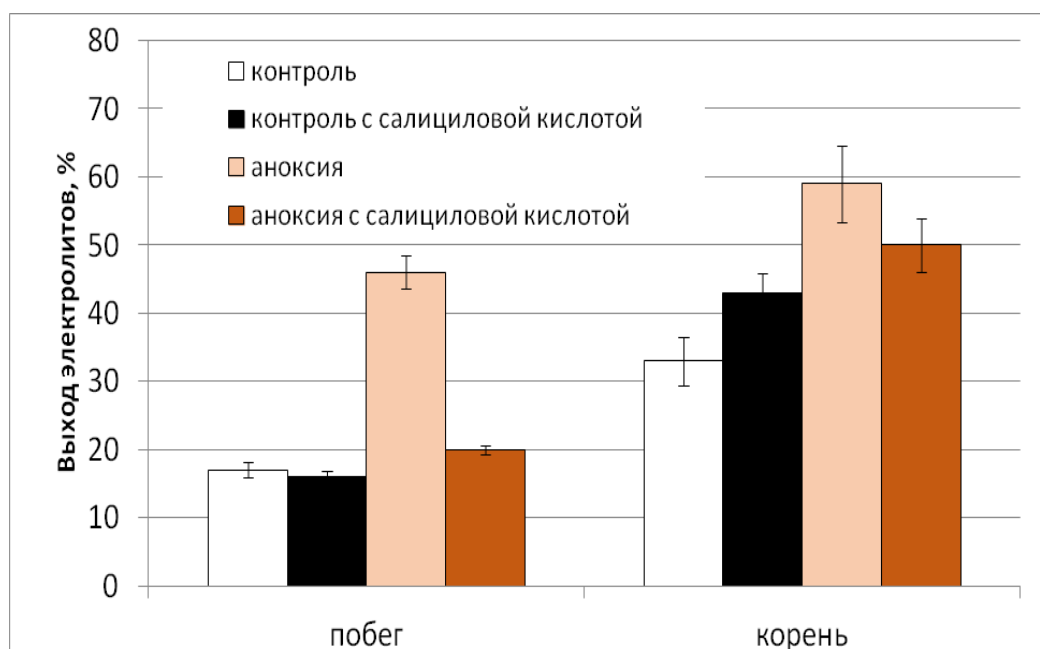


Рисунок 10. Действие аноксии и предобработки салициловой кислотой (100 мкМ) на выход электролитов из клеток растений пшеницы (А) и риса (Б).

Выход электролитов из тканей у обоих растений преобладал в корнях. У пшеницы контрольные значения выхода электролитов были меньше, чем у риса. Воздействие аноксии значительно повышало выход электролитов как в побегах, так и в корнях, относительно контроля, что, по-видимому, связано со снижением стабильности клеточных мембран в бескислородных условиях. При этом у пшеницы утечка электролитов возрастала в 10 раз в побегах и в 5 раз в корнях, тогда как ткани риса повреждались в меньшей степени (в 2 раза в корнях и в 2,5 раза в побегах). Обработка салициловой кислотой (СК) в контрольных условиях не оказывала влияния на выход электролитов. Во время аноксии салицилат, в целом, благотворно воздействовал на растения. Однако существенное понижение выхода электролитов было продемонстрировано только в побегах риса.

На рисунке 11 показано влияние экзогенной салициловой кислоты и условий аноксии на общую жизнеспособность растений пшеницы и риса.

Заметно, что условия аноксии незначительно снижают интенсивность метаболических процессов в тканях обоих растений, хотя у пшеницы различия были более выраженными, тогда как обработка салициловой кислотой улучшала общий метаболизм растений, тем самым способствуя повышению жизнеспособности, причем у пшеницы этот показатель достигал контрольных значений (рис.11).

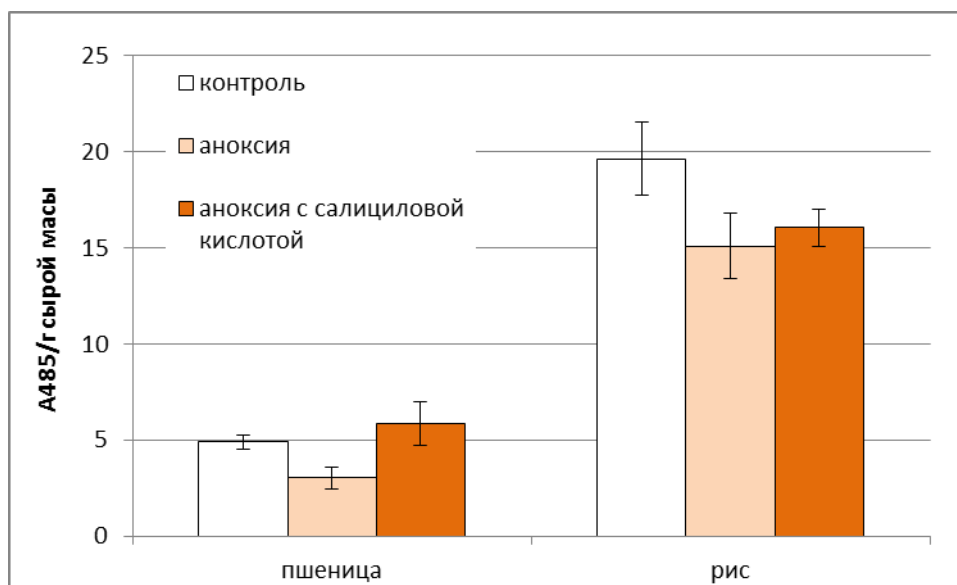
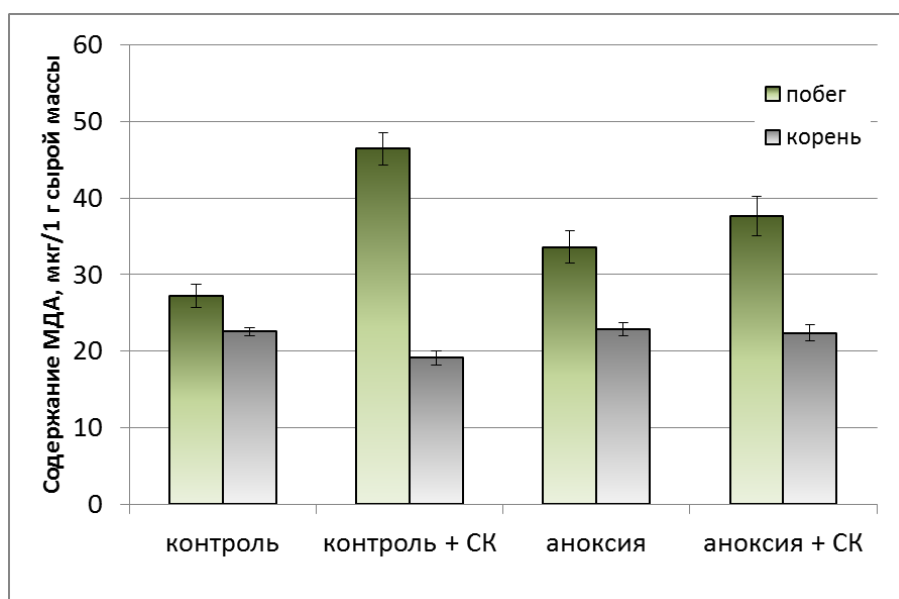


Рисунок 11. Действие аноксии и предобработки салициловой кислотой (100 мкМ) на жизнеспособность растений пшеницы и риса

4.3. Влияние аноксии и предобработки салициловой кислоты на перекисное окисление липидов мембран тканей растений.

Накопление пероксида водорода в условиях пост-аноксии, а также при обработке салициловой кислотой должно было стимулировать процессы перекисного окисления, поэтому нами были изучены эти процессы у растений пшеницы (рис. 12).

А



Б

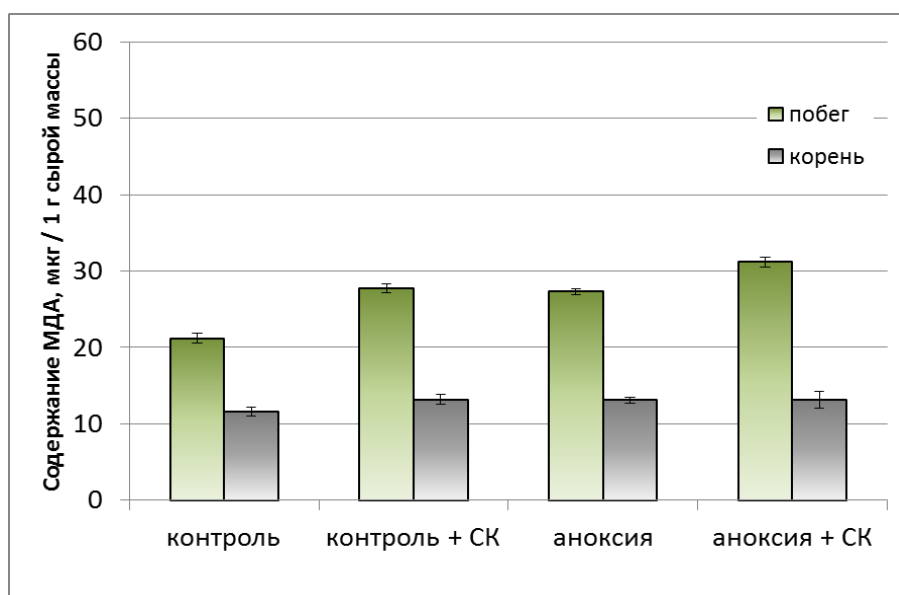


Рисунок 12. Влияние аноксии и предобработки салициловой кислотой на перекисное окисление липидов мембран пшеницы и риса.

Так, в побегах растений пшеницы наблюдалось некоторое увеличение перекисного окисления, которое коррелировало с накоплением пероксида водорода в его тканях в первые минуты пребывания на воздухе (рис. 9, 12). В

корнях же никаких изменений в накоплении малонового диальдегида (МДА) практически не наблюдалось.

Обработка салициловой кислотой не приводила к заметным изменениям в активности перекисного окисления (ПОЛ) в корнях растений, что, по-видимому, связано с отсутствием достаточного количества пероксида водорода (*рис. 9, 12*). В побегах же имела место тенденция к усилению ПОЛ после предобработки салицилатом, однако оно было более заметно в контрольных условиях (*рис. 12А*). По всей видимости, действие салициловой кислоты, как антипатогенного гормона направлено на активацию процесса ПОЛ, а также на генерацию некрозов, поэтому в условиях аэрации и запускается процесс перекисного окисления.

В свою очередь, нарушение метаболических процессов в условиях аноксии даже не смотря на обработку салицилатом и накопление пероксида, не способствует запуску защитных реакций клетки пшеницы, поэтому уровень ПОЛ сохраняется относительно постоянным.

Обработка СК риса практически не повлияла на реакцию ПОЛ в корнях растений (*рис. 10Б*). У побегов содержание МДА увеличилось в растениях, которые были помещены в аноксигенную среду и тех, которые были обработаны салицилатом. Наибольшее содержание МДА в побегах риса было у растений, помещенных в аноксию и обработанных салицилатом совместно, что логично, ведь аноксия без салицилата незначительно повышала активацию перекисного окисления липидов относительно контроля, также, как и салициловая кислота без аноксии.

Если сравнивать влияние аноксии и предобработки СК на ПОЛ мембран растений пшеницы и риса, то сразу можно заметить некоторое отличие (*рис. 12*). Содержание МДА в корнях и побегах пшеницы немного больше чем у риса, что означает меньшую устойчивость пшеницы к реакциям ПОЛ.

Из литературы также известны примеры накопления пероксида в период аноксии и постаноксической аэрации. Так, аккумуляцию H_2O_2 при гипоксических и аноксических условиях как в корнях, так и в листьях различных растений отмечали Калашников с соавторами и Biemelt с соавторами [2, 28]. Накопление пероксида водорода в апопласте и в связи с плазматической мембраной устойчивых и неустойчивых к недостатку кислорода растений при аноксии и особенно в период постаноксической аэрации показано при помощи трансмиссионной микроскопии Блохиной с соавторами [3]. Авторы продемонстрировали, что в корнях и корневищах у устойчивых к гипоксии растений (рис, болотный ирис - *Iris pseudacorus*) во время аноксии и, особенно, постаноксической реоксигенации аккумуляция перекиси водорода происходила в основном в апопласте, а у неустойчивых (пшеница и ирис германский - *I. germanica*) – в цитоплазме клеток.

При взаимодействии АФК с компонентами мембранных липидов, а также белков и ДНК образуются различные гидропероксиды, что свидетельствует о возникновении процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые ведут к нарушению целостности мембран клеток [36]. В литературе известны доказательства того, что у приспособленных к гипоксии объектов уровень ПОЛ ниже, чем у неприспособленных, как при аноксии, так и, главным образом, при аэрации в постаноксический период. Об этом судили по меньшему накоплению конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) [5]. Данные об ограничении ПОЛ у устойчивых растений свидетельствуют о большей стабильности мембран устойчивых к кислородной недостаточности растений. Это хорошо согласуется с нашими данными о меньшем накоплении у риса АФК при аноксии и реоксигенации, что может указывать на более эффективную регуляцию у риса поставки и использования АФК.

Поскольку пшеница не является устойчивым растением, то наблюдаемые эффекты, по-видимому, связаны с разбалансировкой метаболизма растения под действием недостатка кислорода.

ВЫВОДЫ.

1. Уровень продукции пероксида водорода в тканях побегов растения пшеницы в условиях аноксии возрастает сразу по окончании воздействия, тогда как у риса остаётся практически неизменным.
2. Воздействие аноксии способствует незначительной активации перекисного окисления липидов.
3. Предобработка салициловой кислотой способствует повышению жизнеспособности растений, которое, однако, не отражается на снижении перекисного окисления мембран растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Agarwal S., Sairam R.K., Srivastava G.C., Meena R.C. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes // Biol. Plant. – 2005. – V. 49, № 4. – P. 541-550.
2. Biemelt S., Keetman U., Mock H.-P., Grimm B. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. // Plant Cell Environ. –2000. –V.23. –P.135-144.
3. Blokhina O.B., Fagerstedt K.V., Chirkova T.V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. // J. Exp. Bot. -2001. -V. 52, N 359. -P. 1179-1190.
4. Chen Z., Zheng Z., Huang J. et al. Biosynthesis of salicylic acid in plants // Plant Signal. Behav. — 2009. — 4. — P. 493—496.
5. Crawford R.M.M., Walton J.C., Wollenweber-Ratser B. Similarities between post-ischaemic injury to animal tissues and post-anoxic injury in plants. // Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. – Edinburgh, 1994. –V.102b. – P.325-332.
6. Dat J.F., Delgado H.L., Foyer C.H., Scott I.M. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during termotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // Plant Physiol. – 1998. – V. 116. – P. 1351-1357.
7. Drew M.C Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia.//Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.1997.-V.48 –P. 223-250.
8. Gay C., Gebicki J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric xylenol orange hydroperoxide assay. // Anal. Biochem. - 2000. - V. 284, № 2. P. 217-220.
9. Huang Xi, Stettmaier K., Michel C. et al. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana // Planta. – 2004. – V. 218, № 6. – P. 938-946

10. Hunter M.I., Hetherington A.M., Crawford R.M.M. Lipid peroxidation - a factor in anoxia intolerance in *Iris* species // *Phytochemistry*. - 1983. - V.22. - P. 1145-1147.
11. Hussain M., Malik M.A., Farooq M. et al. Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower // *J. Agron. Crop Sci.* – 2008. – V. 194. – P. 193-199
12. Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W. et al. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 136. – P. 4159-4168.
13. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. // *FASEB J.* –1997. -V.11. –P.118-124.
14. Larkindale J., Huang B. Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bent-grass // *Plant Growth Regul.* – 2005. – V. 47. – P. 17-28.
15. Ma J., Yuan Y., Ou J. et al. Influencing of salicylic acid on roots of rice plants at NaCl-stress // *J. Wuhan Univ. Natur. Sci. Ed.* – 2006. – V. 52, № 4. – P. 471-474.
16. Mauch-Mani B., Slusarenko A.J. Production of salicylic acid precursors is major function of phenylalanine-ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica* // *Plant Cell.* – 1996. – V. 93. – P. 203-212.
17. Monk L. S., Fagerstedt K. V., Crawford R. M. M. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. A key factor in recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*. // *Plant Physiol.* -1987. – V.85. -P.1016-1020.
18. Noctor G., Foyer C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* –1998. –V.49. -P.249-279.
19. Popova L.P., Maslennikova L.T., Yordanova R.Y. et al. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings // *Plant Physiol. Biochem.* – 2009. – V. 47. Iss. 3. – P. 224-231.

20. Senaratna T., Merritt D., Dixon K. et al. Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants // *Plant Growth Regul.* – 2003. – V. 39, № 1. – P. 77-81.
21. She X., He J., Zhang J., Zuo Q. Reducing effect of salicylic acid on the growth suppression of cu-cumber plantlets caused by salt stress // *Acta Bot. Boreali-Occident. Sin.* – 2002. – V. 22, № 2. – P. 401-405.
22. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis // *Mol. Plant.* — 2010. — 3. — P. 2—20.
23. Wang H., Feng T., Xixu P. et al. Up-regulation of chloroplastic antioxidant capacity in involved in alleviation of nickel toxicity of *Zea mays* L. by exogenous salicylic acid // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2009. V. 72, № 5. P. 1354-1362.
24. Белых Ю. В., Кириллова, Н. В. Спасенков А. И. Влияние салициловой кислоты на антиоксидантную и прооксидантную активности в растительных клетках. // *Вестн. СПбГУ* –2009. –Сер.3. –Вып.2. –145-150с.
25. Ван Л.-Ж., Хуан В.-Д., Лю Ю.-П., Чжан Ж.-Ч. Влияние тепловой обработки растений винограда на содержание салициловой и абсцизовой кислот и теплоустойчивость растений // *Физиология растений.* – 2005. – Т. 52, № 4. – С. 578-583.
26. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота // *Прикл. биохимия и микробиология.* — 2007. — 43, № 4. — С. 405— 411.
27. Дмитрієв О.П., Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин // *Цитология и генетика.* – 2005. –Т. 39. - № 4. – С. 64-75.
28. Калашников Ю.Е., Балахнина Т.И., Закржевский Д.А. Эффект почвенной гипоксии на активацию кислорода и систему защиты от окислительной деструкции в корнях и листьях *Hordeum vulgare*. // *Физиол. Раст.* –1994. – Т.41. –С.583-588.

29. Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов // Физиология и биохимия культ. растений. 2013. Т. 45, № 113-126.
30. Колупаев Ю.Є. Можлива роль супероксид-дисмутази у саліцилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. – 2007. – Т. 64, № 2. – С. 270-278.
31. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. – Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2002. – 208 с.
32. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про- /антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биологии. – 2006. - Т. 126, № 3. – С. 250-261.
33. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНТИ. –1989. –Т.6. С.1-168.
34. Полевой В.В. Физиология растений. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.
35. Фенько, А. А. Репкина Н. С., Таланова В. В. Влияние салициловой кислоты на холодоустойчивость проростков огурца // Труды Карельского научного центра Российской академии наук, по. 11, 2015, pp. 26-34.
36. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. // СПб: издательство СПбГУ –2002. –240 с.
37. Чиркова Т.В., Блохина О.Б. Влияние аноксии на уровень эндогенного перекисного окисления липидов в корнях растений, различающихся по устойчивости к недостатку кислорода. // Вестн. ЛГУ. Биология. –1991. – Вып.4. –С.85-90.