

УДК 577.15:581.1.036.2

ДЕЙСТВИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ И ДИКАРБОНОВЫХ АЛИФАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И ОКСАЛАТОКСИДАЗЫ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КОЛЕОПТИЛЯХ ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. Т. О. Ястреб, Ю. Е. Колупаев

*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
(Харьков, Украина)*

Исследовали влияние ароматических (салициловой – СК, бензойной – БК и 4-оксибензойной – 4-ОБК) и дикарбонových алифатических (янтарной – ЯК, яблочной – ЯБК и щавелевой – ЩК) кислот на активность растворимых и ионносвязанных форм пероксидазы и оксалатоксидазы в колеоптилях пшеницы (*Triticum aestivum* L.). СК, 4-ОБК и ЯК вызывали повышение активности ионносвязанной пероксидазы клеточных стенок и тенденцию к небольшому увеличению активности растворимой формы этого фермента. БК, ЯБК и ЩК не оказывали существенного влияния на активность обеих форм пероксидазы. Активность растворимой оксалатоксидазы увеличивалась под действием СК, ЯК и ЩК, другие органические кислоты не влияли на ее величину. Активность ионносвязанной оксалатоксидазы в колеоптилях пшеницы была низкой, что не позволило оценить влияние на нее исследуемых кислот. Обработка колеоптилей СК, 4-ОБК и ЯК вызывала увеличение содержания в них пероксида водорода, под влиянием БК, ЯБК и ЩК его количество существенно не изменялось. После обработки колеоптилей СК, 4-ОБК и ЯК повышалась их теплоустойчивости. Эффект ЩК был небольшим, БК и ЯБК не влияли на теплоустойчивость отрезков колеоптилей. Сделано заключение о том, что одной из существенных причин увеличения содержания пероксида водорода в колеоптилях пшеницы под влиянием исследуемых органических кислот является повышение активности пероксидазы (в особенности ее ионносвязанной формы), вклад оксалатоксидазы в генерацию пероксида водорода менее значительный. Обсуждается связь между усилением генерации активных форм кислорода и индуцированием теплоустойчивости клеток колеоптилей при обработке органическими кислотами.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., пероксидаза, оксалатоксидаза, пероксид водорода, салициловая кислота, бензойная кислота, 4-оксибензойная кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, щавелевая кислота, теплоустойчивость

Активные формы кислорода (АФК) являются продуктами нормального и стрессового метаболизма растительной клетки (Mittler, 2002). Значительную роль в их генерации играют специальные ферментные системы. Одним из важных источников супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) является НАДФН оксидаза (КФ 1.6.3.1), локализованная в плазмалемме (Sagi, Fluhr, 2006; Глянько и др., 2009).

Адрес для корреспонденции: Колупаев Юрий Евгеньевич, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru

К настоящему времени получено немало сведений и о роли других ферментов, в частности пероксидазы и оксалатоксидазы, в генерации АФК растительными клетками (Verna et al., 1999; Bolwell et al., 1999).

Традиционно пероксидазы рассматривают как антиоксидантные ферменты, которые разрушают пероксид водорода и окисляют при этом другие субстраты. Однако кроме такой активности, пероксидазы (КФ 1.11.1.7) могут проявлять и оксидазную активность, связанную с передачей электронов от восстановителей (например, НАДФН) на молекулярный кислород (Chen, Schopfer, 1999; Минибаева, Гордон, 2003). При таком действии пероксидазы обра-

ДЕЙСТВИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ

зуются супероксидный анион-радикал и пероксид водорода. Пероксидаза, для которой характерен подобный механизм действия, может быть локализована в цитозоле и (в большей степени) в клеточных стенках в состоянии, связанном с их полимерами ионными или ковалентными связями. Считается, что при окислительном взрыве пероксидаза клеточных стенок может генерировать большее количество супероксида и, как следствие, H_2O_2 (Bestwick et al., 1997), хотя процесс генерации АФК может осуществляться «танемом» пероксидаза – НАДФН-оксидаза.

Определенный вклад в накопление пероксида водорода растительными клетками может вносить также оксалатоксидаза (КФ 1.2.3.4), катализирующая окисление щавелевой кислоты молекулярным кислородом с образованием CO_2 и H_2O_2 (Berna et al., 1999). Сообщается о роли этого фермента в устойчивости растений к патогенам и изменении его активности при действии абиотических стрессоров (Berna et al., 1999; Яруллина и др., 2003).

Перечисленные ферментные системы принимают участие в реализации эффектов физиологически активных соединений, например, салициловой (2-оксибензойной) кислоты – СК (Minibayeva et al., 2001; Geetha, Shetty, 2002; Трошина и др., 2007). Наряду с СК способностью модифицировать активность пероксидазы обладает и янтарная кислота – ЯК (Minibayeva et al., 2001). В связи со сходным расположением гидроксильных групп по отношению к гидрофобному блоку у молекул СК и ЯК последняя рассматривается некоторыми авторами как миметик СК (Тарчевский и др., 1999). Однако повышение активности пероксидазы в корнях пшеницы зарегистрировано под влиянием не только ЯК, но и других кислот цикла Кребса (Minibayeva et al., 2001). Правда, в указанной работе использовались концентрации органических кислот, значительно превышающие физиологические.

С другой стороны, имеются сведения о повышении устойчивости растений к стрессорам различной природы (в т.ч. абиотическим) под действием экзогенных ароматических (СК, бензойной – БК, 4-оксибензойной – 4-ОБК) (Senaratna et al., 2003; Horvath et al., 2007) и некоторых дикарбоновых алифатических (ЯК, щавелевой – ЩК) (Трошина и др., 2001; Колупаев та ін., 2010) кислот.

В то же время специфичность действия органических кислот на конкретные АФК-

генерирующие ферментные системы и связь влияния этих соединений на устойчивость растений к стрессорам с усилением генерации пероксида водорода исследованы недостаточно. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение влияния ароматических (СК, БК и 4-ОБК) и дикарбоновых алифатических (ЯК, яблочной – ЯБК и щавелевой – ЩК) кислот на активность ионносвязанных и растворимых форм пероксидазы и оксалатоксидазы, содержание пероксида водорода в колеоптилях пшеницы и их теплоустойчивость.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили отрезки колеоптилей, отделенные от четырехсуточных этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, которые являются модельным объектом, чувствительным к действию экзогенных фитогормонов и гормоноподобных соединений, в т. ч. СК. Как было установлено нами ранее, колеоптиль пшеницы реагировала на обработку экзогенной СК быстрым увеличением содержания пероксида водорода, а также повышением теплоустойчивости (Колупаев та ін., 2011).

Подготовка растительного материала описана ранее (Колупаев та ін., 2011). После отделения от проростков колеоптиль инкубировали в чашках Петри на 2% растворе сахарозы в течение 14-16 ч, затем отрезки опытных вариантов выдерживали в течение 2 ч в 10 мкМ растворах СК, БК, 4-ОБК, ЯК, ЯБК или ЩК, приготовленных на 2% растворе сахарозы. Концентрации эффекторов выбирали на основании предварительных опытов. Колеоптиль контрольных вариантов инкубировали в 2% сахарозе.

После окончания инкубации колеоптилей в растворах исследуемых эффекторов часть отрезков из каждого варианта подвергали потенциально летальному нагреву в водном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при температуре $43 \pm 0,1^\circ C$ в течение 10 мин, а затем помещали в чашки Петри с 2% раствором сахарозы. Через 3 сут после нагрева оценивали повреждения колеоптилей по появлению специфического буроватого оттенка и потере тургора. В это же время оценивали состояние колеоптилей, которые не подвергались нагреву. Во всех вариантах опытов, независимо от природы добавляемых в среду эффекторов, выживание не подвергнутых нагреву колеоптилей составляло не менее 95%.

После окончания обработки колеоптилей исследуемыми кислотами определяли активность ионносвязанных и растворимых форм пероксидазы и оксалактоксидазы, активность каталазы, содержание пероксида водорода.

Для определения цитоплазматической (растворимой) фракции пероксидазы и оксалактоксидазы колеоптиль гомогенизировали в 0,01 М Na-фосфатном буфере (рН 6,2). Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин. Супернатант использовали для анализа активности цитоплазматических форм ферментов. Осадок многократно промывали исходным буфером, ионносвязанную с клеточными стенками фракцию пероксидазы и оксалактоксидазы извлекали из осадка 1 М NaCl (Ranieri et al., 1996). После этого экстракт связанных форм ферментов диализировали против исходного буфера в течение 14-16 ч.

Для определения активности пероксидазы (Ridge, Osborne, 1970) супернатант предварительно разбавляли необходимым количеством 0,01 М Na-фосфатного буфера (рН 6,2). В реакционную кювету вносили 0,75 мл 0,07% гваякола, 2,25 мл исходного буфера, 0,75 мл ферментного экстракта. Реакцию начинали добавлением 0,15% пероксида водорода. Оптическую плотность измеряли в течение первых двух минут реакции при длине волны 440 нм.

При определении активности оксалактоксидазы (Трошина и др., 2007) в реакционную кювету к 0,75 мл ферментного экстракта добавляли 2,25 мл 0,05 М сукцинатного буфера (рН 3,8), 0,15% хромогенного субстрата орто-фенилендиамина и 0,75 мл 2,5 мМ щавелевой кислоты. Пробы инкубировали в темноте в течение 5 или 10 мин, после чего измеряли оптическую плотность при длине волны 490 нм. Единица активности соответствовала увеличению оптической плотности за 1 мин.

Активность каталазы анализировали по количеству разложившегося пероксида водорода, экстрагируя фермент 0,1 М Na-фосфатным буфером (рН 7,4) (Филиппович и др., 1982).

Содержание пероксида водорода определяли по образованию комплекса с ксиленолевым оранжевым (Bindschedler et al., 2001). Перед анализом реактив готовили смешиванием 1 мл 25 мМ раствора соли Мора в 2,5 М серной кислоте со 100 мл 125 мкМ раствора ксиленолевого оранжевого в 100 мМ сорбитоле. Для определения содержания H₂O₂ навеску колеоптилей растирали на льду в 0,01 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,2), гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g, супернатант добавляли к 10-кратному объему указанного реактива и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После центрифугирования при 8000 g в течение 10 мин определяли оптическую плотность раствора при длине волны 560 нм.

Повторность независимых опытов при определении влияния исследуемых кислот на теплоустойчивость колеоптилей 5-кратная, при анализе биохимических показателей – 3-кратная. При этом каждый опыт проводили в 3-кратной биологической и 2-кратной аналитической повторности. В работе приводятся средние значения серии опытов и их стандартные отклонения. Кроме случаев, оговоренных специально, обсуждаются различия, достоверные при p ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка колеоптилей пшеницы СК и ЯК вызывала существенное (на 36 и 27% соответственно) повышение активности ионносвязанной формы пероксидазы (табл. 1). Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о повышении активности этой формы фермента под влиянием СК в колеопти-

Таблица 1. Активность пероксидазы и растворимой оксалактоксидазы в колеоптилях пшеницы (усл. ед.·10⁻³/(колеоптиль · мин))

Вариант опыта	Пероксидаза		Оксалактоксидаза
	ионносвязанная	растворимая	
Контроль	4,97±0,17	9,24±0,21	193,2±5,6
Салициловая кислота, 10 мкМ	6,76±0,19	10,08±0,28	230,3±4,9
Бензойная кислота, 10 мкМ	4,70±0,20	9,10±0,21	175,7±7,7
4-оксибензойная кислота, 10 мкМ	5,56±0,13	10,22±0,28	184,4±5,6
Янтарная кислота, 10 мкМ	6,30±0,16	9,94±0,23	216,3±4,2
Яблочная кислота, 10 мкМ	4,83±0,17	9,29±0,47	189,7±5,6
Щавелевая кислота, 10 мкМ	4,95±0,20	8,96±0,42	236,6±7,0

ДЕЙСТВИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ

лях пшеницы другого сорта – Донецкой 48 (Колупасв, Акініна, 2005).

Под влиянием 4-ОБК происходило менее значительное повышение активности ионносвязанной пероксидазы по сравнению с эффектами СК и ЯК (табл. 1). БК, ЯБК и ЩК не оказывали влияния на активность ионносвязанной пероксидазы клеточных стенок колеоптилей.

Тенденция к повышению активности растворимой формы пероксидазы наблюдалась под действием СК, 4-ОБК и ЯК ($p \leq 0,1$), другие исследуемые органические кислоты не влияли на активность фермента в колеоптилях (табл. 1).

Под влиянием СК происходило увеличение активности растворимой формы оксалатоксидазы, эффект ЯК был подобным, но менее выраженным ($p \leq 0,1$). Более существенное повышение активности этого фермента происходило под влиянием экзогенной ЩК, являющейся его субстратом (табл. 1). БК, 4-ОБК и ЯБК не влияли на активность цитоплазматической формы оксалатоксидазы колеоптилей пшеницы.

Активность оксалатоксидазы во фракции клеточных стенок была низкой и составляла лишь 10-15% от активности цитоплазматической фракции. В связи этим установить достоверные изменения активности ионносвязанной оксалатоксидазы под влиянием исследуемых органических кислот не представлялось возможным.

Пероксидаза и оксалатоксидаза могут быть источниками АФК в клетках колеоптилей пшеницы. Ранее нами было показано увеличение активности слабосвязанной апопластной формы пероксидазы колеоптилей пшеницы под влиянием СК и ЯК, которое сопровождалось усилением генерации супероксидного анион-радикала клеточной поверхностью (Колупасв та ін., 2011). Полученные в настоящей работе

результаты показывают увеличение под влиянием СК и ЯК активности и других ферментативных систем, которые могут участвовать в генерации АФК – ионносвязанной пероксидазы клеточных стенок и оксалатоксидазы. При дисмутации супероксидного анион-радикала, образующегося в пероксидазных реакциях, а также за счет повышения активности оксалатоксидазы, в растительных тканях может накапливаться пероксид водорода.

И действительно, при обработке колеоптилей СК, ЯК и, в меньшей степени, 4-ОБК в них происходило повышение содержания пероксида водорода (табл. 2). БК и ЯБК не оказывали влияния на содержание H_2O_2 в отрезках колеоптилей пшеницы. Обработка колеоптилей субстратом оксалатоксидазы ЩК в концентрации 10 мкМ не вызывала достоверного увеличения содержания пероксида водорода (табл. 2), не происходило значительного увеличения содержания H_2O_2 в колеоптилях и под влиянием более высокой (100 мкМ) концентрации ЩК (данные не приведены). Этот результат свидетельствует о том, что вклад оксалатоксидазы в образование пероксида водорода в колеоптилях пшеницы невелик по сравнению с другими ферментными системами.

Как показывают результаты настоящей работы, существенная роль в накоплении пероксида водорода в колеоптилях пшеницы может принадлежать ионносвязанной пероксидазе клеточных стенок. О вкладе пероксидазы в генерацию АФК свидетельствуют и результаты проведенного нами ранее ингибиторного анализа. Усиление генерации колеоптилями супероксидного анион-радикала, происходящее под влиянием СК и ЯК, значительно угнеталось ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой (Колупасв та ін., 2011). В то же время пероксидаза является не единственным ферментом, участвующим в генерации АФК

Таблица 2. Содержание пероксида водорода в колеоптилях пшеницы после обработки органическими кислотами и их выживание после повреждающего нагрева (43°C, 10 мин)

Вариант опыта	Содержание H_2O_2 , пмоль/колеоптиль	Выживание, %
Контроль	476±14	48,7±2,1
Салициловая кислота, 10 мкМ	680±27	67,0±1,7
Бензойная кислота, 10 мкМ	448±27	52,6±3,2
4-оксибензойная кислота, 10 мкМ	549±19	57,9±2,0
Янтарная кислота, 10 мкМ	653±28	64,3±1,8
Яблочная кислота, 10 мкМ	473±34	49,1±2,4
Щавелевая кислота, 10 мкМ	500±22	54,8±2,2

колеоптилями пшеницы. Вызываемый СК и ЯК эффект усиления образования супероксидного анион-радикала также частично подавлялся предварительной обработкой колеоптилей ингибитором НАДФН-оксидазы α -нафтолом (Колупасв та ін., 2011).

Таким образом, можно полагать, что НАДФН-оксидаза и различные (прежде всего, апопластные) формы пероксидазы могут быть основными источниками генерации АФК колеоптилями пшеницы. Повышение активности этих ферментных систем может происходить при обработке колеоптилей некоторыми ароматическими (СК, 4-ОБК) и алифатическими (ЯК) кислотами. Менее значимым («минорным») источником пероксида водорода в тканях колеоптилей может быть также оксалактоксидаза. Не исключено, что этот фермент может иметь определенное значение в накоплении пероксида водорода, вызываемом действием на колеоптили экзогенных СК и ЯК (табл. 1, 2).

В качестве одной из причин накопления пероксида водорода в растительных тканях под влиянием экзогенных СК и ЯК также рассматривается ингибирование каталазы (Панина и др., 2004). Однако в наших экспериментах указанные кислоты, а также 4-ОБК, не вызывали достоверного изменения активности каталазы (результаты не приводятся). При этом, как уже отмечалось, СК, 4-ОБК и ЯК вызывали увеличение содержания пероксида водорода в колеоптилях пшеницы (табл. 2). Отсутствие влияния указанных кислот на активность каталазы свидетельствует о том, что происходящее под их влиянием увеличение количества H_2O_2 в растительных тканях связано в основном с усилением его образования, а не с замедлением разложения.

В настоящее время АФК рассматриваются как посредники, принимающие участие в трансдукции стрессовых сигналов в геном растительных клеток и активации адаптивных реакций (Miller et al., 2010). Показано повышение устойчивости растений к стрессорам, в т.ч. абиотическим, под влиянием экзогенного пероксида водорода и физиологически активных соединений, вызывающих его накопление (Lopez-Delgado et al., 1998). В связи с этим представляло интерес сопоставить влияние на теплоустойчивость колеоптилей органических кислот, вызывающих повышение активности АФК-генерирующих ферментов и накопление пероксида водорода в тканях колеоптилей, с действием кислот, не индуцирующих подобные эффекты.

Достоверное повышение теплоустойчивости колеоптилей происходило под влиянием СК и ЯК, эффект 4-ОБК был менее существенным, но достоверным (табл. 2). Под действием ЩК наблюдалась тенденция к повышению теплоустойчивости колеоптилей. БК и ЯБК не оказывали влияния на теплоустойчивость колеоптилей.

Таким образом, есть основания полагать, что физиологическая активность изученных нами органических кислот в значительной степени зависит от их способности вызывать усиление генерации АФК растительными клетками. СК, ЯК и 4-ОБК, вызывающие повышение активности пероксидазы клеточных стенок и накопление пероксида водорода в колеоптилях пшеницы, индуцировали и развитие теплоустойчивости колеоптилей пшеницы (табл. 1, 2). С другой стороны, обработка отрезков БК и ЯБК, не влияющими на активность ферментов, генерирующих АФК, не сказывалась и на теплоустойчивости колеоптилей. Примечательно, что на теплоустойчивость колеоптилей слабо влияла и ЩК, являющаяся субстратом оксалактоксидазы (табл. 2). Эта кислота не вызывала изменения активности пероксидаз, но под ее влиянием происходило повышение активности оксалактоксидазы. При этом, однако, под действием ЩК не отмечалось заметного изменения содержания пероксида водорода в колеоптилях пшеницы. Вероятно, этот факт свидетельствует о том, что связанный с оксалактоксидазой путь образования пероксида водорода в колеоптилях пшеницы не является основным.

Усиление генерации АФК, вызываемое СК, 4-ОБК и ЯК, по-видимому, может выполнять роль сигнала, индуцирующего различные защитные реакции. В частности, показаны активация антиоксидантных ферментов, накопление низкомолекулярных протекторов (например, пролина), синтез ряда стрессовых белков, белков сигнальных систем под влиянием экзогенной СК (Shakirova et al., 2003; Сахабутдинова и др., 2004; Павлова и др., 2009; Тарчевский и др., 2010). Повышение активности антиоксидантных ферментов происходило при обработке проростков пшеницы структурным аналогом СК 4-ОБК (Horvath et al., 2007). Индуцирование синтеза двух идентичных полипептидов зарегистрировано при обработке проростков гороха СК и ЯК (Тарчевский и др., 1999). В то же время для выяснения участия ферментативных систем, генерирующих АФК, в реализации указанных эффектов органических кислот необходимы специальные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.
- Колупаєв Ю.Є., Акініна Г.Є. Вплив саліцилової кислоти на теплостійкість колеоптилів пшениці у зв'язку зі змінами окиснювального метаболізму // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 6. – С. 524-529.
- Колупаєв Ю.Є., Ястреб Т.О., Мусатенко Л.І. Порівняння впливу саліцилової та янтарної кислот на активність супероксиддисмутази й каталази і теплостійкість проростків проса (*Panicum miliaceum* L.) // Доповіді НАН України. – 2010. – № 10. – С. 154-159.
- Колупаєв Ю.Є., Ястреб Т.О., Швиденко М.В., Карпачев Ю.В. Вплив саліцилової і янтарної кислот на утворення активних форм кисню в колеоптилях пшениці // Укр. біохім. журн. – 2011. – Т. 83, № 5. – С. 82-88.
- Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 459-464.
- Павлова Е.Л., Рихванов Е.Г., Таусон Е.Л. и др. Влияние салициловой кислоты на развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 1. – С. 78-84.
- Панина Я.С., Васюкова Н.И., Озерцовская О.Л. Ингибирование активности каталазы клубней картофеля салициловой и янтарной кислотами // Доклады АН [Россия]. – 2004. – Т. 397, № 1. – С. 131-133.
- Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М. Влияние салициловой кислоты на активность антиоксидантных ферментов у пшеницы в условиях засоления // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 579-583.
- Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. Янтарная кислота – миметик салициловой кислоты // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 1. – С. 23-28.
- Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М. Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений // Прикл. биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 263-275.
- Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Хайруллин Р.М. Использование препаратов щавелевой кислоты против токсического действия ионов меди на проростки пшеницы // Агробиохимия. – 2001. – № 6. – С. 100-102.
- Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Валеев А.Ш., Максимов И.В. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к *Septoria nodorum* Berk. // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – № 5. – С.545-550.
- Филиппович Ю.В., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по биохимии. – М.: Просвещение, 1982. – 312 с.
- Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Максимов И.В., Хайруллин Р.М. Участие оксалатоксидазы в неспецифической защитной активации окисления ортофенилендиамина в проростках пшеницы при стрессе // Агробиохимия. – 2003. – № 12. – С. 55-59.
- Berna A., Bernier F. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme // Plant Mol. Biol. – 1999. – V. 39, № 3. – P. 539-549.
- Bestwick C.S., Brown I.R., Bennett M.H.R., Mansfield J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* // Plant Cell. – 1997. – V. 9. – P. 209-221.
- Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L. et al. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // New Phytol. – 2001. – V. 151. – P. 185-194.
- Bolwell G.P., Blee K.A., Butt V.S. et al. Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells // Free Radic. Res. – 1999. – V. 31. – P. S137- S145.
- Chen S.X., Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase // Eur. J. Biochem. – 1999. – V. 260. – P. 726-735.
- Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment // Plant Sci. – 2002. – V. 163. – P. 653-660.
- Horvath E., Pal M., Szalai G. et al. Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants // Biol. Plant. – 2007. – V. 51, № 3. – P. 480-487.
- Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂ // J. Exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 713-720.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses // Plant Cell Environ. – 2010. – V. 33. – P. 453-467.

- Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V.* Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // *Protoplastasma*. – 2001. – V. 217. – P. 125-128.
- Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 405-410.
- Ranieri A., D'Urso G., Naili C. et al.* Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves // *Physiol. Plant.* – 1996. – V. 97. – P. 381-387.
- Ridge I., Osborne D.J.* Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // *J. Exp. Bot.* – 1970. – V. 21. – P. 843-856.
- Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 336-340.
- 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. – P. 77-81.
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V. et al.* Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity // *Plant Sci.* – 2003. – V. 164, № 3. – P. 317-322.

Поступила в редакцию
03.10.2011 г.

**ACTION OF AROMATIC AND DICARBOXYLIC ALIPHATIC ACIDS
ON ACTIVITY OF PEROXIDASE AND OXALATE OXIDASE
IN ISOLATED WHEAT COLEOPTILES**

T. O. Yastreba, Yu. Ye. Kolupaev

*V.V. Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)*

The influence of aromatic (salicylic – SA, benzoic – BA, 4-oxybenzoic – 4-OBA) and dicarboxylic aliphatic (succinic – SuA, malic – MA, oxalic – OA) acids on the activity of soluble and ion-bound forms of peroxidase and oxalate oxidase in the coleoptiles of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) has been investigated. SA, 4-OBA and SuA caused the increase of activity of ion-bound peroxidase of cellular walls and tendency to the little increase of activity of its soluble form. BA, MA and OA influenced on the activity of both forms of peroxidase insignificantly. The activity of soluble oxalate oxidase was increased under the action of SA, SuA and OA, other organic acids did not influence on this value. Activity of ion-bound oxalate oxidase in wheat coleoptiles was low, that did not allow to estimate influence of the investigated acids on it. Treatment of coleoptiles with SA, 4-OBA and SuA caused the increase of hydrogen peroxide content in them, under the influence of BA, MA and OA its amount did not change substantially. Treatment of coleoptiles with SA, 4-OBA and SuA caused the increase of their heat resistance. The effect of OA was little, BA and MA did not influence on heat resistance of coleoptiles. The conclusion is drawn that the one of substantial reasons of increase of hydrogen peroxide content in the wheat coleoptiles under the influence of investigated organic acids is the increase of peroxidase activity (in particular its ion-bound forms), the contribution of oxalate oxidase to the hydrogen peroxide generation is less considerable. The connection between the increase of reactive oxygen species generation and the inducing of heat resistance of coleoptiles cells under the treatment with organic acids is discussing.

Key words: *Triticum aestivum* L., peroxidase, oxalate oxidase, hydrogen peroxide, salicylic acid, benzoic acid, 4-oxybenzoic acid, succinic acid, malic acid, oxalic acid, heat resistance

ДЕЙСТВИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ

ДІЯ АРОМАТИЧНИХ І ДИКАРБОНОВИХ АЛІФАТИЧНИХ КИСЛОТ НА АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ ТА ОКСАЛАТОКСИДАЗИ В ІЗОЛЬОВАНИХ КОЛЕОПТИЛЯХ ПШЕНИЦІ

Т. О. Ястреб, Ю. Є. Колупаєв

*Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
(Харків, Україна)*

Досліджували вплив ароматичних (саліцилової – СК, бензойної – БК і 4-оксибензойної – 4-ОБК) і дикарбонних аліфатичних (янтарної – ЯК, яблучної – ЯБК і щавлевої – ЩК) кислот на активність розчинних і іоннозв'язаних форм пероксидази й оксалатоксидази в колеоптилях пшениці (*Triticum aestivum* L.). СК, 4-ОБК і ЯК викликали підвищення активності іоннозв'язаної пероксидази клітинних стінок і тенденцію до невеликого збільшення активності розчинної форми цього ферменту. БК, ЯБК і ЩК істотно не впливали на активність обох форм пероксидази. Активність розчинної оксалатоксидази збільшувалася під дією СК, ЯК і ЩК, інші органічні кислоти не впливали на її величину. Активність іоннозв'язаної оксалатоксидази в колеоптилях пшениці була низкою, що не дозволило оцінити вплив на неї досліджуваних кислот. Обробка колеоптилів СК, 4-ОБК і ЯК викликала збільшення вмісту в них пероксиду водню, під впливом БК, ЯБК і ЩК його кількість істотно не змінювалася. Після обробки колеоптилів СК, 4-ОБК і ЯК підвищувалася їх теплостійкість. Ефект ЩК був невеликим, БК і ЯБК не впливали на теплостійкість відрізків колеоптилів. Зроблено висновок про те, що однією з істотних причин збільшення вмісту пероксиду водню в колеоптилях пшениці під впливом досліджуваних органічних кислот є підвищення активності пероксидази (особливо її іоннозв'язаної форми), внесок оксалатоксидази в генерацію пероксиду водню менш значний. Обговорюється зв'язок між посиленням генерації активних форм кисню та індукцією теплостійкості клітин колеоптилів за обробки органічними кислотами.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., пероксидаза, оксалатоксидаза, пероксид водню, саліцилова кислота, бензойна кислота, 4-оксибензойна кислота, янтарна кислота, яблучна кислота, щавлева кислота, теплостійкість