

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1

УЧАСТИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ИНДУЦИРОВАННИИ НАКОПЛЕНИЯ ПРОЛИНА В РАСТЕНИЯХ ПРОСА ПРИ ДЕЙСТВИИ NaCl

© 2013 г. А. А. Вайнер, Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястрем

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

На 10-дневных растениях проса изучали участие пероксида водорода в процессе накопления пролина при действии NaCl. Солевой стресс создавали выдерживанием растений в течение 6 ч на среде с добавлением хлорида натрия в конечной концентрации 500 мМ. Засоление вызывало увеличение содержания пероксида водорода в корнях и (в большей степени) в листьях растений, которое наблюдалось уже через 30 мин после начала обработки. Через 6 ч после воздействия хлорида натрия отмечалось значительное повышение содержания пролина в листьях проса. Предобработка проростков скавенджером пероксида водорода (300 мкМ диметилтиомочевинной) или ингибитором НАДФН-оксидазы (60 мкМ имидазолом) снимала как вызываемое солевым стрессом повышение содержания пероксида водорода в растениях проса, так и накопление пролина. Предстрессовая обработка указанными соединениями снижала и выживание растений после действия потенциально летального засоления. В то же время, если обработку растений диметилтиомочевинной или имидазолом начинали через 3 ч после начала действия хлорида натрия, угнетения накопления пролина не происходило, при этом наблюдалась тенденция к повышению выживания растений после солевого стресса по сравнению с контрольным вариантом. Сделано заключение о роли пероксида водорода, генерируемого с участием НАДФН-оксидазы, в запуске реакций, необходимых для адаптации растений проса к засолению, в частности, в индуцировании накопления пролина.

Ключевые слова: *Panicum miliaceum L., пролин, пероксид водорода, НАДФН-оксидаза, солеустойчивость*

Аккумуляция пролина, относящегося к мультифункциональным протекторам, считается одной из важных защитных реакций растений на действие засоления и ряда других стрессоров (Szabados, Savoure, 2009). Помимо выполнения хорошо известной осмопротекторной функции (Hare, Cress, 1997), пролин может проявлять свойства шаперона, стабилизируя структуру белков при действии стрессоров (Sharma, Dubey, 2005; Mishra, Dubey, 2006), оказывать антиоксидантное действие (Mehta, Gaur, 1999), участвовать в регуляции экспрес-

сии некоторых защитных генов (Chen et al., 2011).

Как известно, синтез пролина у высших растений происходит двумя путями – глутаматным и орнитиновым. Ферменты первого из них локализованы в цитоплазме, второго – в митохондриях (Кузнецов, Шевякова, 1999). Часть реакций, связанных с синтезом пролина глутаматным путем, проходит в хлоропластах (Szabados, Savoure, 2009). Считается, что большая часть пула «стрессового» пролина синтезируется глутаматным метаболическим путем. Ключевым ферментом этого пути является Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтаза (П5КС), катализирующая двойную реакцию превращения глутамата в Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат с участием АТФ и НАДФ⁺ (Кузнецов, Шевякова, 1999). Дальнейшее превращение Δ^1 -пирролин-

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

5-карбоксилата в пролин происходит с участием НАДФН под действием Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатредуктазы.

Несмотря на большое внимание исследователей к механизмам синтеза пролина, процессы индуцирования его накопления остаются слабоизученными. В частности, мало исследованы сигнальные посредники, задействованные в индукции образования пролина. Имеются сведения, указывающие на участие пероксида водорода в процессах АБК-зависимого синтеза пролина у растений арабидопсиса (Verslues et al., 2007). В клетках каллусной культуры галофита *Nitraria tangutorum* Vobr. в ответ на действие NaCl происходило повышение содержания пероксида водорода и пролина (Yang et al., 2013). Обработка культуры скавенджером H_2O_2 диметилтиомочевинной (ДМТМ) препятствовала накоплению пролина и повышению активности орнитин- δ -аминотрансферазы – одного из ключевых ферментов орнитинового пути синтеза пролина. Антагонисты кальция также угнетали вызываемое действием хлорида натрия накопление пролина у *N. tangutorum* (Yang et al., 2013).

Одним из основных ферментативных источников активных форм кислорода (АФК) у растений является НАДФН-оксидаза (Sagi, Fluhr, 2006; Глянько и др., 2009). Показано, что индуцируемое солевым стрессом образование АФК у растений арабидопсиса происходило с участием этого фермента и подавлялось его ингибитором дифенилениодониумом (Leshem et al., 2007). Обработка растений ингибитором НАДФН-оксидазы снижала и их солеустойчивость.

В целом же участие АФК, как сигнальных посредников, а также ферментов, которые их генерируют, в регуляции стресс-протекторных систем, обеспечивающих устойчивость растений к действию засоления, до сих пор изучено слабо. Целью настоящей работы явилось выяснение возможного участия пероксида водорода и НАДФН-оксидазы в индуцировании накопления пролина в растениях проса в условиях солевого стресса.

МЕТОДИКА

В работе использовали растения проса (*Panicum miliaceum* L.) сорта Константиновское. Семена обеззараживали путем 30-минутной обработки 3% пероксидом водорода и проращивали в чашках Петри с добавлением дистиллированной воды при температуре 20°C

в течение 4 сут. Затем проростки переносили в пластиковые кюветы, размещая их на завернутых в марлю стеклянные пластинах. Для исключения возможных артефактов, связанных с вероятным взаимодействием антиоксиданта с компонентами питательной смеси (например с ионами металлов с переменной валентностью), в качестве среды инкубации использовали очищенную водопроводную воду (Колупаев, Карпец, 2007). Растения выращивали при 12-часовом световом периоде и освещенности 15 клк, температура воздуха $25\pm 1^\circ\text{C}$ (днем) и $20\pm 1^\circ\text{C}$ (ночью), относительная влажность воздуха 50/70% (день/ночь).

Часть 10-дневных растений подвергали потенциально летальному солевому стрессу путем добавления NaCl (конечная концентрация 500 мкМ) в среду инкубации. В отдельных вариантах опытов растения обрабатывали скавенджером пероксида водорода диметилтиомочевинной (ДМТМ, конечная концентрация 300 мкМ) (Sung et al., 2009) или ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом (Hung et al., 2006) в конечной концентрации 60 мкМ. Концентрации ДМТМ и имидазола выбирали на основании предварительных опытов.

Варианты опыта: 1) контроль (очищенная водопроводная вода); 2) NaCl (6 ч); 3) ДМТМ (24 ч); 4) ДМТМ (21 ч) → ДМТМ + NaCl (3 ч) → NaCl (3 ч); 5) имидазол (24 ч); 6) имидазол (21 ч) → имидазол + NaCl (3 ч) → NaCl (3 ч); 7) NaCl (3 ч) → NaCl + ДМТМ (3 ч) → ДМТМ (21 ч); 8) NaCl (3 ч) → NaCl + имидазол (3 ч) → имидазол (21 ч). Во всех случаях соответствующие эффекторы добавляли в очищенную водопроводную воду, а после прекращения их действия растения переносили на воду без добавок.

Через определенные промежутки времени после начала действия хлорида натрия отбирали пробы корней и листьев для биохимических анализов. Выживание растений оценивали через 4 сут после стрессового воздействия. Мертвыми считали растения, необратимо потерявшие тургор.

Содержание пероксида водорода определяли ферроцианидным методом, экстрагируя его из растертых на холоде корней или листьев 5% ТХУ (Sagisaka, 1976). Пробы центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин при температуре не более 4°C и в супернатанте определяли концентрацию H_2O_2 с использованием соли Мора и тиоцианата аммония. Оптическую

УЧАСТИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

плотность раствора измеряли при длине волны 480 нм (Sagisaka, 1976).

Содержание пролина в корнях и листьях определяли по методу Бейтса и соавт. (Bates et al., 1973) с модификациями. Пролин экстрагировали из растительного материала дистиллированной водой с последующим 10-минутным кипячением, экстракт фильтровали и к порциям фильтрата добавляли равные объемы нингидринового реактива и ледяной уксусной кислоты и кипятили пробы в течение 1 ч на водяной бане. Оптическую плотность окрашенного продукта определяли при длине волны 520 нм. Как стандарт использовали L-пролин.

Было проведено три независимых опыта, каждый из которых в трехкратной биологической повторности. Для биохимических анализов использовали среднюю пробу из 15 растений. При определении выживания каждая биологическая повторность состояла из 30 растений. В таблицах приведены средние величины и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие хлорида натрия вызывало увеличение содержания пероксида водорода в корнях и листьях проса (табл. 1). Такой эффект наблюдался уже через 0,5 ч после начала солевого воздействия. Через 1,5 ч экспозиции на среде с NaCl содержание H_2O_2 в корнях снижалось, приближаясь к значениям контроля, в то время как в листьях продолжало возрастать. К окончанию солевой экспозиции содержание пероксида водорода в корнях уменьшалось и приближалось к значениям контроля. При этом в листьях количество H_2O_2 оставалось несколько выше, чем в контроле (табл. 1).

Обработка скавенжером пероксида водорода ДМТМ (вариант 3) вызывала снижение содержания H_2O_2 в корнях и листьях проса, через 3 ч после прекращения его действия (6 ч от начала наблюдений) количество АФК в растениях несколько возросло (табл. 1).

Обработка растений ДМТМ перед солевым воздействием (вариант 4) нивелировала вызываемый действием хлорида натрия эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях и листьях растений. Обработка ДМТМ через 3 ч после начала инкубации растений на среде с добавлением соли (вариант 5) снижала содержание H_2O_2 в листьях и корнях по сравнению с вариантом 2 (действие NaCl) (табл. 1).

Обработка растений ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом (вариант 6) вызывала тенденцию к снижению содержания пероксида водорода в органах растений на всех временных точках наблюдений (табл. 1).

Воздействие имидазола до солевого стресса (вариант 7) угнетало эффект повышения содержания H_2O_2 в растениях, вызываемый хлоридом натрия. При обработке растений имидазолом через 3 ч после начала воздействия NaCl (вариант 8) в листьях также наблюдалось меньшее содержание пероксида водорода по сравнению с соответствующим «солевым» вариантом 2 (табл. 1).

После солевого воздействия количество пролина в листьях существенно увеличивалось, а в корнях существенно не изменялось (табл. 2).

В органах растений, обработанных ДМТМ (вариант 3), содержание пролина достоверно не отличалось от величин контроля. В то же время обработка растений ДМТМ, предшествовавшая действию хлорида натрия (вариант 4), в значительной степени нивелировала увеличение содержания пролина в листьях, вызываемое действием солевого стресса. В корнях при действии ДМТМ отмечалось более низкое содержание этой аминокислоты по сравнению с контролем и вариантом с засолением. В то же время обработка проростков ДМТМ через 3 ч после начала солевого воздействия (вариант 5) препятствовала увеличению содержания пролина в листьях в меньшей степени. В корнях в варианте 5 оно также было выше, чем в варианте 4 (табл. 2).

Обработка растений имидазолом (вариант 6) существенно не влияла на содержание пролина в корнях и листьях проса. В то же время предобработка имидазолом (вариант 7) в значительной степени угнетала вызываемое действием хлорида натрия повышение содержания пролина в листьях. В корнях растений этого варианта количество пролина было ниже, чем в контроле и варианте с действием хлорида натрия. Если же обработку растений имидазолом проводили через 3 ч после начала действия хлорида натрия (вариант 8), вызываемое солевым стрессом накопление пролина в листьях не угнеталось. В корнях в варианте 8 оно также превышало величины варианта 7.

Влияние ДМТМ и имидазола на солеустойчивость растений (выживание после действия NaCl) также зависело от времени обработки. Обработка этими соединениями до воздействия хлорида натрия (варианты 4 и 7) сни-

Таблица 1. Содержание пероксида водорода (мкмоль/г сухого вещества) в растениях проса

Вариант	Время от начала наблюдений, ч					
	0,5		1,5		6,0	
	корни	листья	корни	листья	корни	листья
1. Контроль	1,36±0,04	1,38±0,05	1,29±0,04	1,46±0,05	1,26±0,06	1,41±0,06
2. NaCl (3%)	1,64±0,07	1,63±0,06	1,43±0,06	1,89±0,07	1,22±0,04	1,60±0,05
3. ДМТМ (300 мкМ)	1,06±0,06	1,13±0,05	1,08±0,06	1,18±0,06	1,03±0,06	1,32±0,05
4. NaCl (3%) + предобработка ДМТМ (300 мкМ)	1,24±0,07	1,43±0,06	0,90±0,09	1,20±0,07	1,14±0,05	1,36±0,06
5. NaCl (3%) + постобработка ДМТМ (300 мкМ)	-	-	-	-	1,01±0,07	1,21±0,07
6. Имидазол (60 мкМ)	1,22±0,06	1,17±0,05	1,08±0,06	1,14±0,04	1,17±0,06	1,20±0,05
7. NaCl (3%) + предобработка имидазолом (60 мкМ)	1,46±0,05	1,41±0,06	1,09±0,05	1,12±0,06	1,21±0,05	1,29±0,06
8. NaCl (3%) + постобработка имидазолом (60 мкМ)	-	-	-	-	1,08±0,06	1,19±0,05

Таблица 2. Содержание пролина в растениях проса и их выживание после действия NaCl

Вариант	Пролин (мкмоль/г сухого вещества)		Выживание (%)
	корни	листья	
1. Контроль	5,65±0,19	10,26±0,27	-
2. NaCl (3%)	5,57±0,26	14,43±0,34	57,2±2,9
3. ДМТМ (300 мкМ)	5,74±0,22	10,60±0,31	-
4. NaCl (3%) + предобработка ДМТМ (300 мкМ)	4,17±0,25	9,74±0,26	39,0±3,2
5. NaCl (3%) + постобработка ДМТМ (300 мкМ)	5,85±0,28	11,92±0,22	63,8±3,6
6. Имидазол (60 мкМ)	5,69±0,23	11,08±0,24	-
7. NaCl (3%) + предобработка имидазолом (60 мкМ)	4,77±0,21	10,80±0,23	41,5±3,1
8. NaCl (3%) + постобработка имидазолом (60 мкМ)	5,31±0,22	14,68±0,20	62,9±3,4

жала солеустойчивость растений (табл. 2). В то же время внесение ДМТМ или имидазола в среду через 3 ч после начала действия соли (варианты 5 и 8) не только не снижало солеустойчивость растений, но даже, наоборот, вызывало небольшую тенденцию к увеличению их выживания.

ОБСУЖДЕНИЕ

Действие хлорида натрия на растения проса вызывало повышение в них содержания пероксида водорода и пролина (табл. 1, 2). Эти эффекты были более выраженными в листьях. В корнях нам удалось зафиксировать только небольшое увеличение содержания пероксида водорода через 0,5 ч после солевого воздействия. Возможно, низкое содержание пероксида водорода и пролина в корнях растений, подвергнутых солевому стрессу, связано с поврежде-

ниями мембран клеток корней, которые непосредственно контактировали с раствором, содержащим хлорид натрия.

Увеличение содержания пероксида водорода в листьях под действием солевого стресса происходило раньше, чем накопление пролина, что позволяет предполагать участие H_2O_2 как сигнальных молекул в индуцировании накопления пролина. Эксперименты с использованием скавенжера пероксида водорода ДМТМ свидетельствуют в пользу этого предположения. Предобработка растений ДМТМ, снижающая содержание в них пероксида водорода, препятствовала накоплению пролина в листьях, вызываемому солевым стрессом (табл. 2, вариант 4). Для индуцирования накопления пролина, по-видимому, важно увеличение содержания пероксида водорода в клетках растений на начальной стадии действия хлорида натрия. Так,

УЧАСТИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

в наших экспериментах обработка скавенджером H_2O_2 через 3 ч после начала солевого воздействия уже не угнетала эффект накопления пролина (табл. 2, вариант 5).

Образование АФК в растительной клетке может происходить в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах, а также в апопласте (Del Rio, 2002; Mittler, 2002). По мнению ряда исследователей, именно в апопласте локализованы первичные сенсоры стрессовых сигналов, и в нем функционирует механизм их декодирования и передачи к белкам-регуляторам (Пиотровский и др., 2011). Предполагается, что восприятие сигнала активирует ферменты-генераторы АФК, следствием чего может быть активация MAP-киназного каскада и соответствующих факторов регуляции транскрипции (ApeI, Hirt, 2004). В связи с этим можно полагать, что особую роль в клеточном сигналинге играют именно АФК, образуемые ферментами, локализованными в плазмалемме и клеточных стенках. К ним относятся в первую очередь интегральный белок плазматической мембраны НАДФН-оксидаза (Sagi, Fluchr, 2006) и секретруемые пероксидазы класса III (Torres et al., 2005).

Результаты ингибиторного анализа позволяют полагать, что индуцируемое солевым стрессом накопление пероксида водорода в растениях проса связано с активностью НАДФН-оксидазы. Ингибитор этого фермента имидазол снимал увеличение содержания H_2O_2 в органах растений, вызываемое действием хлорида натрия (табл. 1, вариант 7). Можно полагать, что связанное с активацией НАДФН-оксидазы увеличение содержания пероксида водорода вызывает последующее накопление пролина в листьях проса. Этот эффект угнетался предобработкой растений имидазолом (табл. 1, вариант 7). В то же время при обработке растений имидазолом через 3 ч после начала действия NaCl угнетения накопления пролина не происходило (табл. 1, вариант 8), что указывает на формирование сигнала с возможным участием НАДФН-оксидазы на начальной стадии действия солевого стресса.

Предположение о роли АФК в реакциях накопления пролина согласуется с результатами других исследований. Так, накоплению пролина в проростках пшеницы под действием салициловой кислоты предшествовало увеличение количества пероксида водорода. При этом салицилатиндуцируемое накопление пролина подавлялось обработкой проростков антиоксидантом ионолом (Колупаев та ін., 2007). Увели-

чение содержания пролина в растениях под действием АФК может быть связано с их влиянием на комплекс ферментов, задействованных в его синтезе, в частности на Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтазу (Verslues et al., 2007). Однако в контексте нашей работы для выяснения этого вопроса необходимы специальные исследования.

О значении АФК в индуцировании защитных реакций растений проса на солевой стресс свидетельствуют и результаты прямого определения солеустойчивости. Обработка растений поглотителем пероксида водорода или ингибитором НАДФН-оксидазы перед воздействием солевого стресса отрицательно сказывалась на их выживании (табл. 2). В то же время при внесении ДМТМ или имидазола в среду инкубации растений через 3 ч после начала солевого воздействия не только не снижало показатель выживания растений, но даже немного (не достоверно при $p \leq 0,05$) увеличивало его. Можно полагать, что уменьшение количества пероксида водорода под влиянием ДМТМ или имидазола на начальной стадии действия солевого стресса препятствовало формированию АФК-зависимого сигнала, индуцирующего защитные реакции. В то же время на более поздних стадиях солевого воздействия снижение количества АФК под влиянием ДМТМ или имидазола могло уменьшать развитие окислительных повреждений, являющихся вторичным эффектом действия высоких концентраций NaCl на растения.

В настоящей работе изучено участие АФК в индуцируемом солевым стрессом накоплении пролина в растениях проса. Вполне естественно, что эта не единственная защитная реакция, происходящая с участием АФК. Так, показано, что двойные мутанты арабидопсиса по генам НАДФН-оксидазы *Atrboh D* и *Atrboh F* были более чувствительны к солевому стрессу и накапливали большее количество ионов натрия в клетках (Ma et al., 2012). Обработка растений экзогенным пероксидом водорода приводила к уменьшению накопления натрия в условиях солевого стресса. Авторы делают вывод о том, что АФК, производимые НАДФН-оксидазой, функционируют как сигнальные посредники, участвующие в регуляции Na^+/K^+ -гомеостаза в растительных клетках.

Таким образом, есть основания полагать, что АФК, в том числе генерируемые с участием НАДФН-оксидазы, являются важными участниками трансдукции сигнала солевого стресса у растений. В то же время спектр стресс-

протекторных реакций, индуцируемых АФК-зависимым путем, выяснен далеко не полностью.

ЛИТЕРАТУРА

- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. НАДФН-оксидаза растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2009. – Вип. 2 (17). – С. 6-18.
- Колупаєв Ю.Є., Карнець Ю.В. Активні форми кисню як посередники в індукуванні теплостійкості проростків пшениці саліциловою кислотою // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 242-248.
- Колупаєв Ю.Є., Карнець Ю.В., Мусатенко Л.І. Участь активних форм кисню в індукуванні солестійкості проростків пшениці саліциловою кислотою // Доповіді НАН України. – 2007. – № 6. – С. 154-158.
- Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролін при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.
- Пиотровский М.С., Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. Активация НАДФ-Н-оксидазы плазмалеммы при действии низких положительных температур на этиолированные проростки кукурузы // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 234-242.
- Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – V. 55. – P. 373-399.
- Bates L.S., Walden R.P., Tear G.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. – 1973. – V. 39. – P. 205-210.
- Chen J., Zhang Y., Wang C., Lu W., Jin J.B., Hua X. Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling // Amino Acids. – 2011. – V. 40. – P. 1473-1484.
- Del Rio L.A., Corpas J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1255-1272.
- Hare P., Cress W. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants // Plant Growth Regul. – 1997. – V. 21. – P. 79-102.
- Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // Physiol. Plant. – 2006. – V. 127. – P. 293-303.
- Leshem Y., Seri L., Levine A. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance // Plant J. – 2007. – V. 51. – P. 185-197.
- Ma L., Zhang H., Sun L., Jiao Y., Zhang G., Miao C., Hao F. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress // J. Exp. Bot. – 2012. – V. 63, № 1. – P. 305-317.
- Mehta S.K., Gaur J.P. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris* // New Phytol. – 1999. – V. 143. – P. 253-259.
- Mishra S., Dubey R.S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant // J. Plant Physiol. – 2006. – V. 163. – P. 927-936.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 405-410.
- Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. – 2006. – V. 141. – P. 336-340.
- Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. – 1976. – V. 57. – P. 308-309.
- Sharma P., Dubey R.S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant // J. Plant Physiol. – 2005. – V. 162. – P. 854-864.
- Sung M., Hsu Yi., Hsu Yu. Hypersalinity and hydrogen peroxide upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress // Mar Biotechnol. – 2009. – V. 11. – P. 199-209.
- Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2009. – V. 15, № 2. – P. 89-97.
- Torres M.A., Dangel J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development // Curr. Opin. Plant Biol. – 2005. – V. 8. – P. 397-403.
- Verslues P.E., Kim Y.S., Zhu J.K. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant // Plant Mol. Biol. – 2007. – V. 64. – P. 205-217.
- Yang Y., Yang F., Li X., Shi R., Lu J. Signal regulation of proline metabolism in callus of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. grown under salinity stress // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. – 2013. – V. 112, Is. 1. – P. 33-42.

Поступила в редакцию
14.05.2013 г.

УЧАСТИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

PARTICIPATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN INDUCTION OF PROLINE ACCUMULATION IN MILLET PLANTS UNDER ACTION OF NaCl

A. O. Vayner, Yu. E. Kolupaev, T. O. Yastreba

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

The participation of hydrogen peroxide in the proline accumulation under the action of NaCl has been studied on 10-days-old millet plants. Salt stress was created by the treatment of plants with the 500 mM sodium chloride medium for 6 h. Hypersalinity caused the increase in hydrogen peroxide content in the roots, and (mostly) in the leaves. These effects were observed within 30 min after the start of treatment. After 6 h after the sodium chloride influence a significant increase in proline level leaves millet was distinguished. Pretreatment of seedlings with the scavenger of hydrogen peroxide (300 μ M dimethylthiourea), or an inhibitor of NADPH oxidase (60 μ M imidazole), removed elevated levels of hydrogen peroxide as well as the accumulation of proline caused by salt stress in millet plants. Prestress treatment of these compounds also decreased the survival of plants after exposure to potentially lethal salinity. At the same time, if the treatment of the plants with both dimethylthiourea and imidazole started in 3 h after the start of the sodium chloride action the inhibition of proline accumulation did not occur and at the same time, the survival after plant salt stress compared to the control tended to improve. The conclusion about the role of hydrogen peroxide generated with the participation of NADPH oxidase in the initiation of reactions that are necessary for millet plants adaptation to salinity, in particular in inducing of the accumulation of proline was made.

Key words: *Panicum miliaceum L., proline, hydrogen peroxide, NADPH oxidase, salt tolerance*

УЧАСТЬ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ В ІНДУКУВАННІ НАКОПИЧЕННЯ ПРОЛІНУ В РОСЛИНАХ ПРОСА ЗА ДІЇ NaCl

A. O. Вайнер, Ю. Є. Колупаєв, Т. О. Ястреб

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

На 10-денних рослинах проса вивчали участь пероксиду водню в процесі накопичення проліну за дії NaCl. Сольовий стрес створювали витриманням рослин протягом 6 год на середовищі з додаванням хлориду натрію в кінцевій концентрації 500 мМ. Під впливом NaCl відбувалося збільшення вмісту пероксиду водню в коренях і (більшою мірою) в листках рослин, яке спостерігалось вже через 30 хв після початку обробки. Через 6 год після дії хлориду натрію відзначалося істотне підвищення вмісту проліну в листках проса. Передобробка проростків скавенжером пероксиду водню (300 мкМ диметилтіосечовиною) або інгібітором НАДФН-оксидази (60 мкМ імідазолом) знімала як підвищення вмісту пероксиду водню в рослинах проса, так і накопичення проліну, спричинюване сольовим стресом. Передстресова обробка вказаними сполуками знижувала і виживання рослин після дії потенційно летального сольового стресу. В той же час, якщо обробку рослин диметилтіосечовиною або імідазолом починали через 3 год після початку дії хлориду натрію, пригнічення накопичення проліну не відбувалося, при цьому спостерігалася тенденція до підвищення виживаності рослин після сольового стресу порівняно з контрольним варіантом. Зроблено висновок щодо ролі пероксиду водню, що генерується з участю НАДФН-оксидази, в запуску реакцій, необхідних для адаптації рослин проса до засолення, зокрема, в індукуванні накопичення проліну.

Ключові слова: *Panicum miliaceum L., пролін, пероксид водню, НАДФН-оксидаза, солестійкість*