

УДК 581.1

АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ПРИРОДНИХ УМОВ ЗАГАРТУВАННЯ

П.С. МАЙОР, В.П. ЗАХАРОВА, Л.Г. ВЕЛИКОЖОН

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджували динаміку вмісту пероксиду водню й активності супероксиддисмутази, аскорбат- і гваяколпероксидази у листках рослин озимої пшениці 12 генотипів упродовж загартування у природних умовах. Виявлено монотонне зростання активності аскорбатпероксидази та коливальний характер змін решти досліджених показників, що пояснюється мінливістю температурного чинника. Між активністю супероксиддисмутази і гваяколпероксидази на дослідженому часовому відрізку та між активністю супероксиддисмутази й аскорбатпероксидази впродовж періоду загартування з мінусовими температурами виявлено тісну позитивну кореляцію, що може свідчити про високу збалансованість антиоксидантного захисту в клітинах рослин озимої пшениці під час адаптації до холоду.

Ключові слова: озима пшениця, загартування, пероксид водню, супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза.

Дія холоду на рослини восени спричинює виникнення компенсаторних й адаптивних реакцій, що призводять до зміни низки фізіологічних, генетичних і біохімічних процесів, які й зумовлюють загартування до низьких температур [7, 14]. На клітинному рівні у процеси адаптації рослин до цього чинника безпосередньо залучені мембранні структури. Усталилася думка, що плазматична мембрана в клітині в умовах гіпотермії є первинним сайтом пошкоджень, які відбуваються внаслідок зростання вмісту активних форм кисню (АФК), таких як супероксидний аніон-радикал, гідроксильний радикал, синглетний кисень та пероксид водню [3, 17]. АФК виконують також сигнальну функцію у клітинах і сприяють адаптивним перебудовам за дії знижених температур. Підтримання фізіологічно допустимих концентрацій АФК у клітині забезпечується функціонуванням складної та високоспецифічної системи їх детоксикації, що включає ферменти й низькомолекулярні антиоксиданти. До найважливіших ферментів антиоксидантного захисту, які інактивують супероксидний аніон-радикал та пероксид водню, належать супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6), пероксидаза (КФ 1.11.1.7), аскорбатпероксидаза (АПО; КФ 1.11.1.11) [1, 3, 17, 18].

Дослідженню антиоксидантної системи злакових культур за дії низьких температур присвячено низку праць [2, 3, 8, 9, 11, 15, 20], проте роль окремих її складових у механізмах адаптації рослин до холоду залишається остаточно нез'ясованою. У наших попередніх працях [5, 6] представлено результати вивчення за контрольованих умов загартування динаміки вмісту в рослинах озимої пшениці кінцевого продукту перок-

сидного окиснення ліпідів (малонового діальдегіду) і пероксиду водню (однієї з АФК) та активності ферментів, пов'язаних з його метаболізмом: СОД, каталази, АПО і гваяколпероксидази (ГПО).

Метою цієї роботи було вивчення особливостей динаміки вмісту пероксиду водню та активності антиоксидантних ферментів (СОД, АПО, ГПО) під час осіннього загартовування рослин озимої пшениці у природних умовах для з'ясування їх ролі у формуванні морозостійкості.

Методика

Об'єктами дослідження були 9 сортів (Альбатрос одеський, Безоста 1, Донська напівкарликова, Експромт, Київська 7, Крижинка, Миронівська 808, Подолянка, Циганка) та 3 селекційні лінії (УК 324, УК 364, УК 384) озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. Морозостійкість сортів варіювала від нижчої за середню (Безоста 1) до високої (Миронівська 808). Рослини вирощували на дослідних ділянках на території ІФРГ НАН України в умовах дрібноділянкового експерименту 2008 р. Посів проводили 15 вересня. Також рослини вирощували у вегетаційному будиночку в пластмасових ящиках. Після загартовування у природних умовах осінньо-зимового періоду їх проморожували у камері низьких температур та після подальшого відростання визначали морозостійкість сортів за часткою живих рослин.

Для досліджень відбирали другий листок з кількох рослин кожного генотипу дрібноділянкового експерименту. У зразках, отриманих для кожного аналізу з наважки (по 2—3 листки), із застосуванням спектрофотометричних методів визначали вміст пероксиду водню [19], активність СОД [16], ГПО й АПО [10] та гравіметричним методом — вміст сухої речовини. Активність СОД визначали з використанням реакційного середовища, що містило 0,1 мМ трилону Б, 63 мкМ нітросинього тетразолію, 13 мМ метіоніну і 2 мкМ рибофлавіну, до якого добавляли сирий ферментний екстракт (отриманий після центрифугування гомогенату). Реакцію розпочинали експонуванням суміші під флуоресцентною лампою (22 Вт) протягом 10 хв. Оптичне поглинання проб визначали за довжини хвилі 560 нм. Одиницею активності СОД вважали кількість ферменту, яка на 50 % знижувала швидкість відновлення нітросинього тетразолію.

Пероксидазну активність визначали у реакційних середовищах із пероксидом водню, відновлювальним агентом слугував гваякол або аскорбат. Швидкість окиснення останніх обчислювали за змінами оптичного поглинання розчинів упродовж 1,5 хв, яке реєстрували за довжини хвилі 470 (коефіцієнт екстинкції $26,6 \text{ (мМ} \cdot \text{см)}^{-1}$) або 290 нм (коефіцієнт екстинкції $2,8 \text{ (мМ} \cdot \text{см)}^{-1}$) [10]. Наведені в роботі результати визначення активності ГПО відображають середні значення у реакційних середовищах із рН 7,2 і 5,0 [5]. Вміст пероксиду водню та ферментативну активність наведено в розрахунку на 1 г сирової речовини. Активність ферментів перераховували також на одиницю вмісту білка, який визначали з бромфеноловим синім за методом Бредфорда [12].

Дані щодо температури повітря протягом періоду досліджень отримано з інтернет-сайту «Розклад погоди» (архів погодних даних для м. Києва http://gp5.ua/archive.php?wmo_id=33345).

Аналіз та статистичну обробку експериментальних даних проводили на комп'ютері з використанням програми Microsoft Excel. На рисунках подано розмах варіювання досліджених показників та їх середні значення для всієї групи сортів.

Результати та обговорення

Морозостійкість — складна кількісна ознака зимівних рослин помірної зони, яка проявляється після їх загартування до холоду. В пшениці її розглядають як кумулятивний процес, що ініціюється в рослинах за температури нижчої від 10 °С [13]. Зазвичай зміни у рослинах, що забезпечують морозостійкість, вивчають у контрольованих умовах, коли їх із температурних умов, сприятливих для росту і розвитку, переносять в умови дії холоду. Навіть коли зниження температури (до значень 2—6 °С, що викликають загартування) проводять поступово, такі експериментальні умови суттєво відрізняються від природних, де спостерігаються значні нестабільність температури та її добові коливання. Крім того, для різних компонентів захисних систем температурний поріг індукції та динамічні характеристики можуть істотно відрізнятись, як це встановлено нами для розчинних цукрів і вільного проліну [4].

Зазначені обставини здатні великою мірою впливати на перебіг процесів загартування і досягнутий рівень морозостійкості рослин у природних і модельованих умовах. Тому поряд із дослідженням антиоксидантних ферментів рослин озимої пшениці у факторостатних дослідах [5, 6] ми вивчили динаміку їх активності в дрібноділянковому експерименті з тим самим набором генотипів.

Колівання температури повітря протягом періоду досліджень ілюструє рис. 1, а. До дати першого відбору зразків для визначення активності антиоксидантних ферментів (14.11.2008) спостерігались значні добові коливання температури з амплітудою до 10 град. Середньодобова температура поступово знижувалась від 11—12 °С на початку листопада і впродовж експерименту (14.11—24.12.2008) варіювала в межах $-1...+9$ °С (за винятком періоду морозів $-3...-5$ °С у другій половині грудня, але на той час рослини були вкриті шаром снігу, під яким температура була близькою до 0 °С). Отже, за температурними умовами період 14.11—20.11.2008 можна вважати першою фазою загартування. Температурні умови 27.11 (цій даті передувало зниження температури до -2 °С) і 24.12.2008 відповідали другій фазі загартування. Дещо виділяється точка, якій відповідає дата 03.12.2008 (від дати попереднього відбору зразків температура повітря зросла, але не перевищила порогових значень, за яких втрачається загартування). Зазначений поділ часового відрізка проведення експерименту дає підставу порівнювати отримані результати з даними наших попередніх праць [5, 6].

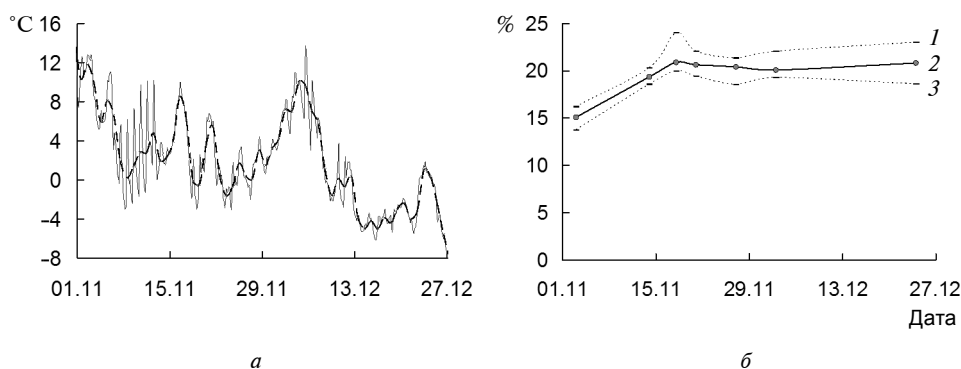


Рис. 1. Зміна температури повітря, °С (а) та вмісту сухої речовини у листках рослин озимої пшениці досліджених сортів, % (б). Тут і на рис. 2:

1, 2, 3 — максимальні, середні та мінімальні значення показників

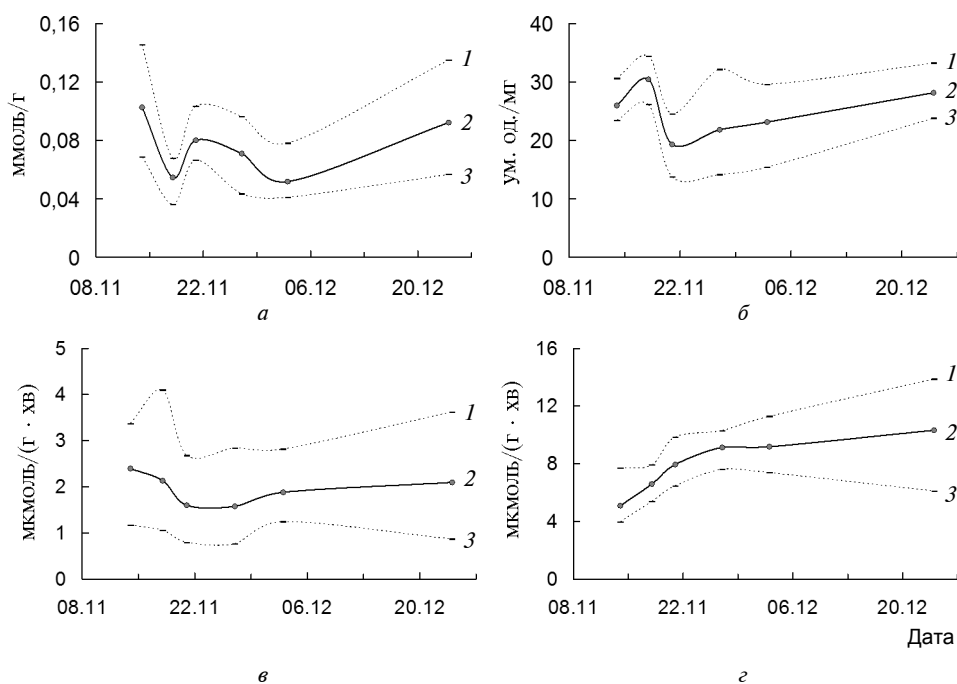


Рис. 2. Зміни вмісту перексиду водню та активностей СОД, ГПО, АПО у другому листку рослин озимої пшениці досліджених сортів:

a — вміст перексиду водню, ммоль/г сирової речовини; *б* — активність СОД, ум. од./мг білка; *в* — активність ГПО, мкмоль гваяколу/(г сирової речовини · хв); *г* — активність АПО, мкмоль аскорбату/(г сирової речовини · хв)

На рис. 1, б наведено дані щодо частки сухої речовини в листках рослин озимої пшениці. Впродовж усього експерименту значення цього показника майже не змінювались, а розмах варіювання (між максимальним і мінімальним значеннями загальної вибірки генотипів) був невисоким, що, на нашу думку, свідчить про незначний вплив температурного чинника. У той же час для динаміки вмісту перексиду водню та активності СОД і ГПО в листках рослин (рис. 2, *a–в*) відзначено коливальний характер, причому варіабельність цих показників між генотипами була доволі значною. Активність АПО (рис. 2, *г*) протягом першої половини періоду досліджень монотонно зростала з виходом на квазістаціонарний рівень, який вдвічі перевищував початкове значення. Динаміка активності цього ферменту, на відміну від ГПО, подібна до динаміки в експерименті з термостатованими умовами загартування [5] (з урахуванням часового масштабу).

Привертає увагу різний характер зміни активності двох пероксидаз: АПО і ГПО. При цьому за динамікою ферментативної активності ГПО подібна до СОД: досить високі значення у перші дати відбору зразків (14.11 і 18.11) змінились на низькі (на дату 21.11.2008), після чого активність до закінчення експерименту (24.12.2008) поступово зростала. Цей висновок підтвердив високий коефіцієнт кореляції між активністю СОД і ГПО, який становив 0,78. Кореляційним аналізом не виявлено тісної залежності між іншими показниками, за винятком зв'язку між активністю СОД і АПО на часовому відрізьку 18.11—21.12.2008 (коефіцієнт кореляції 0,97). Можливо, тісний зв'язок між активністю цих ферментів у зазначений період пов'язаний із впливом зниження температур до мінусових значень, яке кілька разів фіксували в даний проміжок часу.

Згідно з результатами факторостатних експериментів, активність ферментів каталази, ГПО, АПО, СОД та вміст пероксиду водню можуть істотно відрізнятись між генотипами. Найбільша варіабельність досліджуваних показників у вибірці спостерігалась під час проходження рослинами другої фази загартування та в умовах ремісії за підвищення температури від мінусових до плюсових значень [6]. Як засвідчують результати експерименту з рослинами у природних умовах загартування, найбільші варіабельності вмісту пероксиду водню та активностей ГПО й АПО спостерігались 24.12.2008 (див. рис. 2), що, за нашими оцінками, відповідає другій фазі загартування. Характерною особливістю активності СОД є майже дворазовий розмах варіювання між максимальним і мінімальним значеннями загальної вибірки генотипів для всіх досліджених дат, за винятком перших двох точок. Детальний аналіз результатів показав, що динаміка активності СОД є сортоспецифічною і лише на початку експерименту (до зниження температури до мінусових значень) зміни активності цього ферменту в листках різних генотипів були дуже подібними. Для ГПО також відзначено меншу подібність динаміки активності для різних генотипів. На відміну від СОД і ГПО активність АПО змінювалась аналогічно для різних генотипів, тому цей фермент мав менший ступінь варіювання. Слід зазначити, що й динаміка вмісту пероксиду водню у листках досліджених генотипів озимої пшениці була подібною для різних генотипів. Можливо, це пов'язано з сигнальною роллю цієї АФК [1, 3, 17], зміни вмісту якої відображають фізіолого-біохімічні перебудови метаболізму у відповідь на мінливість оточення, в тім числі температурного чинника.

Отже, на підставі отриманих результатів можна зробити висновок про високу збалансованість антиоксидантного захисту у клітинах рослин озимої пшениці під час адаптації до холоду.

1. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 2. — С. 95—108.
2. Кучеренко В.П., Капустян А.В. Фермент пероксидаза і зимостійкість рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 116 с.
3. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. — Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. — 208 с.
4. Майор П.С. Взаємозв'язок між вмістом вільного проліну, розчинних цукрів та обводненістю тканин у рослинах озимої пшениці протягом осінньо-зимового періоду // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — 42, № 4. — С. 298—305.
5. Майор П.С., Великожон Л.Г., Захарова В.П. Вплив загартування на пероксидне окиснення ліпідів й активність пероксидаз у рослинах озимої пшениці різних сортів // Там само. — 2010. — 42, № 6. — С. 537—543.
6. Майор П.С., Захарова В.П., Великожон Л.Г. Зміна вмісту пероксиду водню та активності супероксиддисмутази і каталази у рослинах різних сортів озимої пшениці при загартуванні // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. — Т. 5. — К.: Логос, 2008. — С. 102—107.
7. Моргун В.В., Майор П.С. Зимо- і морозостійкість озимих злакових культур / Физиология растений: Проблемы та перспективи розвитку. — К.: Логос, 2009. — Т. 2. — С. 105—165.
8. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. — 2004. — 51, № 5. — С. 686—691.
9. Радюк М.С., Доманская И.Н., Шербаков Р.А., Шальго Н.В. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя // Там же. — 2009. — 56, № 2. — С. 193—199.
10. Atako K., Chen G.-X., Asada K. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. — 1994. — 35. — P. 497—504.

11. *Apostolova P., Yordanova R., Popova L.* Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars // *Gen. Appl. Plant Physiol.* — 2008. — **34**, N 3—4. — P. 281—294.
12. *Bradford M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — **72**. — P. 248—254.
13. *Fowler D.B., Limin A.E., Ritchie J.T.* Low-temperature tolerance in cereals: model and genetic interpretation // *Crop Sci.* — 1999. — **39**. — P. 626—633.
14. *Guy C., Kaplan F., Kopka J., Hincha D.K.* Metabolomics of temperature stress // *Physiol. plant.* — 2008. — **132**. — P. 220—235.
15. *Janda T., Szalai G., Rios-Gonzalez K. et al.* Comparative study of frost tolerance and antioxidant activities in cereals // *Plant Sci.* — 2003. — **164**, N 2. — P. 301—306.
16. *Madamanchi N.R., Donahue J.L., Cramer C.L. et al.* Differential response of Cu,Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide // *Plant Mol. Biol.* — 1994. — **26**, N 1. — P. 95—103.
17. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* — 2002. — **7**, N 9. — P. 405—410.
18. *Mittler R., Vanderauwera S., Gallery M., Van Breusegem F.* Reactive oxygen gene network of plants // *Ibid.* — 2004. — **9**, N 10. — P. 490—498.
19. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // *Plant Physiol.* — 1976. — **57**. — P. 308—309.
20. *Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C.* Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation // *Physiol. Plant.* — 1998. — **104**. — P. 747—752.
21. *Soltész A., Kocsy G., Szalai G. et al.* Comparison of the antioxidant capacity in cold-treated recombinant wheat lines // *Acta Biol. Szegediensis.* — 2005. — **49**, N 1—2. — P. 117—119.

Отримано 27.12.2010

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ ЗАКАЛИВАНИЯ

П.С. Майор, В.П. Захарова, Л.Г. Великожон

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали динамику содержания пероксида водорода и активности супероксиддисмутазы, аскорбат- и гваяколпероксидазы в листьях растений озимой пшеницы 12 генотипов в течение закаливания в естественных условиях. Обнаружено монотонное возрастание активности аскорбатпероксидазы и колебательный характер изменений остальных исследованных показателей, что объясняется изменчивостью температурного фактора. Между активностью супероксиддисмутазы и гваяколпероксидазы на исследованном временном отрезке и между активностью супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы в течение периода закаливания с минусовыми температурами выявлено тесную положительную корреляцию, что может свидетельствовать о высокой сбалансированности антиоксидантной защиты в клетках растений озимой пшеницы при адаптации к холоду.

ACTIVITY OF SOME ANTIOXIDANT ENZYMES IN WHEAT PLANTS UNDER NATURAL CONDITIONS OF HARDENING

P.S. Major, V.P. Zakharova, L.G. Velykozhon

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The dynamics of the content of hydrogen peroxide and activity of superoxide dismutase, ascorbate and guaiacol peroxidases in leaves of 12 winter wheat genotypes under natural conditions of hardening were studied. Monotonic increase in the activity of ascorbate peroxidase and oscillatory changes of the other investigated indices were found, which is explained by the variability of the temperature factor. Between the activity of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase during investigated time and between the activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase during the period of hardening with subzero temperatures a close positive correlations were revealed, suggesting a high balance of the antioxidant defense in plant cells of winter wheat during cold adaptation.

Key words: *Triticum aestivum* L., cold acclimation, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase.