



УДК 581.1.036.2:577.15

© 2008

Ю. В. Карпець, Ю. Є. Колупаєв, член-кореспондент НАН України
Л. І. Мусатенко

Роль активних форм кисню в підвищенні термостабільності антиоксидантних ферментів коренів пшениці після теплового загартування

The influence of short-term high-temperature hardening (42 °C, 1 min) of wheat plantlets on the activity and the thermostability of catalase and peroxidase has been studied. Hardening caused an increase of the activity and the thermostability of both enzymes. The pretreatments of plantlets with the inhibitor of protein biosynthesis, cycloheximide, or with the antioxidant, ionol, substantially levelled the stated changes. The conclusion about the role of the reactive oxygen species as signal intermediates and the induced protein biosynthesis in changes of the activity and the thermostability of antioxidative enzymes of plantlets after the heat hardening has been made.

Ефекти температурного загартування рослин значною мірою пов'язані зі зменшенням інтенсивності синтезу конститутивних білків та індукцією утворення стресових білків [1]. У переважній більшості досліджень ролі індукованого білкового синтезу в адаптивних процесах вивчався відносно тривалий вплив на рослини помірних загартовувальних температур, менш досліджені зміни білкового синтезу за короткочасної дії високих температур [2]. Ефект теплового загартування рослин короткочасною (від кількох секунд до кількох хвилин) дією ушкоджувальних (сублетальних) температур пов'язують передусім зі швидкими змінами конформації вже існуючих білків [3]. Проте наявність лаг-періоду між короткочасним впливом сублетальної температури і розвитком теплостійкості [2] дає підстави припускати можливу роль індукованого білкового синтезу у формуванні терморезистентності за короткочасного загартування. Необхідно відзначити, що поява білків теплового шоку може бути індукована й іншими впливами, зокрема дією прооксидантів [4]. Водночас відомо, що і нагрівання може спричиняти окиснювальний стрес [5]. Раніше нами показане явище короткочасного підвищення вмісту пероксидів у коренях пшениці після одноквилинної дії загартовувальної температури 42 °C [6]. Висловлюється припущення, що підвищення вмісту активних форм кисню (АФК) може виконувати роль сигналу в запуску формування теплостійкості [5].

Відомо, що надмірне утворення АФК може спричиняти розвиток ушкоджень рослин за дії несприятливих чинників. Так, показано, що ефекти окиснювального стресу, які спостерігалися при тепловому ушкодженні рослин, пов'язані з інактивацією високою температурою антиоксидантних ферментів, передусім каталази [7, 8]. У зв'язку з цим виникає питання: чи відбувається при короткочасному тепловому загартуванні рослин індукція синтезу більш термостабільних форм антиоксидантних ферментів і чи можуть АФК бути посередниками в запуску такої адаптивної реакції? З'ясування цього питання і було метою нашого дослідження.

Об'єктом дослідження були 4-добові етіоловані проростки озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48. Умови пророщування насіння та підготовки проростків до експерименту описані раніше [9]. Короткочасне загартування здійснювали шляхом однохвилинного прогріву проростків у ванні водного ультратермостата при $(42,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ [6].

Обробку проростків інгібітором білкового синтезу на 80S рибосомах циклогексимідом (ЦГ, 20 мкМ) або антиоксидантом іонолом (бутилгідрокситолуол, 150 мкМ) починали за 24 год до загартування. Після загартування протягом 24 год кореневу систему проростків відповідних варіантів також витримували на розчинах ЦГ або іонолу. Концентрації цих речовин, які, не виявляючи ознак фітотоксичної дії, нівелювали розвиток теплостійкості у фізіологічно нормальних кількостях, вибирали на підставі результатів попередніх дослідів.

Теплостійкість проростків оцінювали за їх виживанням через 3 доби після нагрівання у водному термостаті при 45°C протягом 10 хв. Тестуюче нагрівання проводили через 24 год після загартування, коли спостерігалася максимальна теплостійкість проростків [6].

Активність розчинних форм каталази і пероксидази (гваяколпероксидази) в коренях пшениці визначали як описано раніше [9]. Для оцінки термостабільності ферментів їх екстракти прогрівали в ультратермостаті протягом 10 хв при значеннях температури від 38 до 75°C , після чого визначали залишкову активність.

У спеціальних дослідях оцінювали вплив ЦГ та іонолу на активність і термостабільність каталази і пероксидази *in vitro*. Ці сполуки *in vitro* у концентраціях, еквівалентних робочим концентраціям, що використовувалися у дослідях *in vivo*, достовірно не впливали на активність і теплостійкість обох ферментів (результати не наводяться).

На рис. 1–3 наведені середні значення чотирьох незалежних експериментів та їх стандартні відхилення. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються різниці, достовірні при $p \leq 0,05$.

Як показали результати дослідження, обробка проростків ЦГ повністю нівелювала ефект теплового загартування (рис. 1). Отже, можна стверджувати, що формування теплостійкості проростків пшениці після впливу на них сублетальної температури відбувалося за участю індукованого білкового синтезу.

Ефект теплового загартування проростків також майже повністю усувався антиоксидантом іонолом. Нівелювання ефектів загартування антиоксидантом свідчить про можливу причетність АФК до підвищення теплостійкості (див. рис. 1).

У подальших експериментах з'ясовували, чи відбуваються після короткочасного загартування зміни активності і термостабільності ферментів, що регулюють вміст пероксиду водню, і чи залежать ці зміни від індукованого білкового синтезу та вмісту АФК у тканинах.

За даними попередніх експериментів, термостабільність каталази і пероксидази коренів проростків пшениці істотно відрізняється. Пероксидаза інактивувалася при помітно вищих значеннях температури порівняно з каталазою (рис. 2). У подальших експериментах як

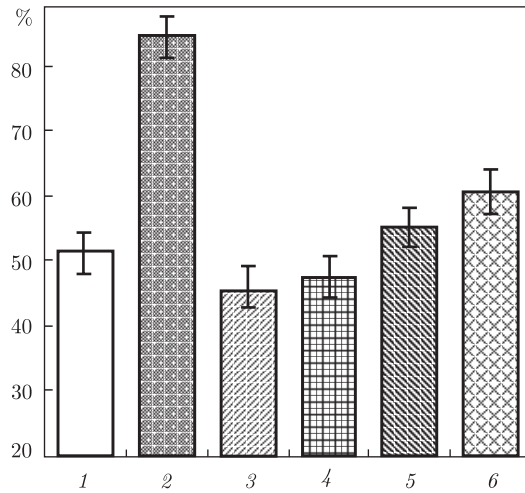


Рис. 1. Вживаність (%) проростків озимої пшениці після ушкоджувального нагрівання: 1 – контроль; 2 – загартування; 3 – ЦГ (20 мкМ); 4 – загартування + ЦГ (20 мкМ); 5 – іонол (150 мкМ); 6 – загартування + іонол (150 мкМ)

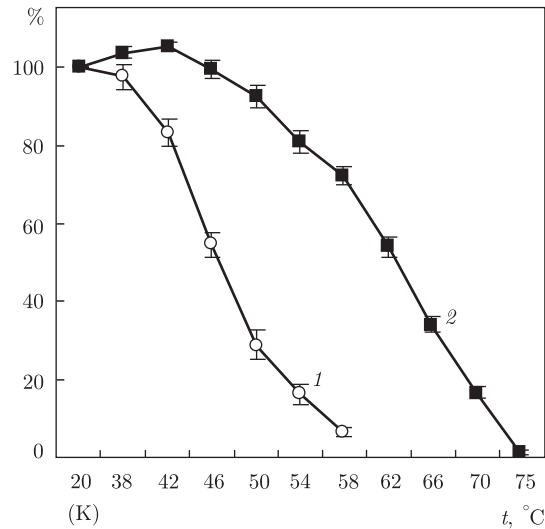


Рис. 2. Залишкова активність (%) каталази (1) і пероксидази (2) коренів пшениці після 10-хвилинного нагрівання екстракту

показники термостабільності ферментів використовували величини залишкової активності після прогріву екстрактів при $(50 \pm 0,1)$ і $(66 \pm 0,1)$ °С для каталази і пероксидази відповідно.

За час спостережень у контрольному варіанті активність каталази істотно не змінювалася. Після загартування відзначалася тенденція до підвищення активності каталази в коренях проростків при загартуванні, що було більш помітним ($p \leq 0,1$) через 24 год після короточасної дії на проростки сублетальної температури (рис. 3, а). ЦГ сам по собі істотно не впливав на активність каталази в коренях, але нівелював підвищення, спричинюване загартуванням ($p \leq 0,1$). Обробка коренів проростків антиоксидантом іонолом достовірно не змінювала активності каталази. При поєднанні загартування та обробки іонолом відзначалася дещо підвищена порівняно з контролем активність каталази через 24 год після дії

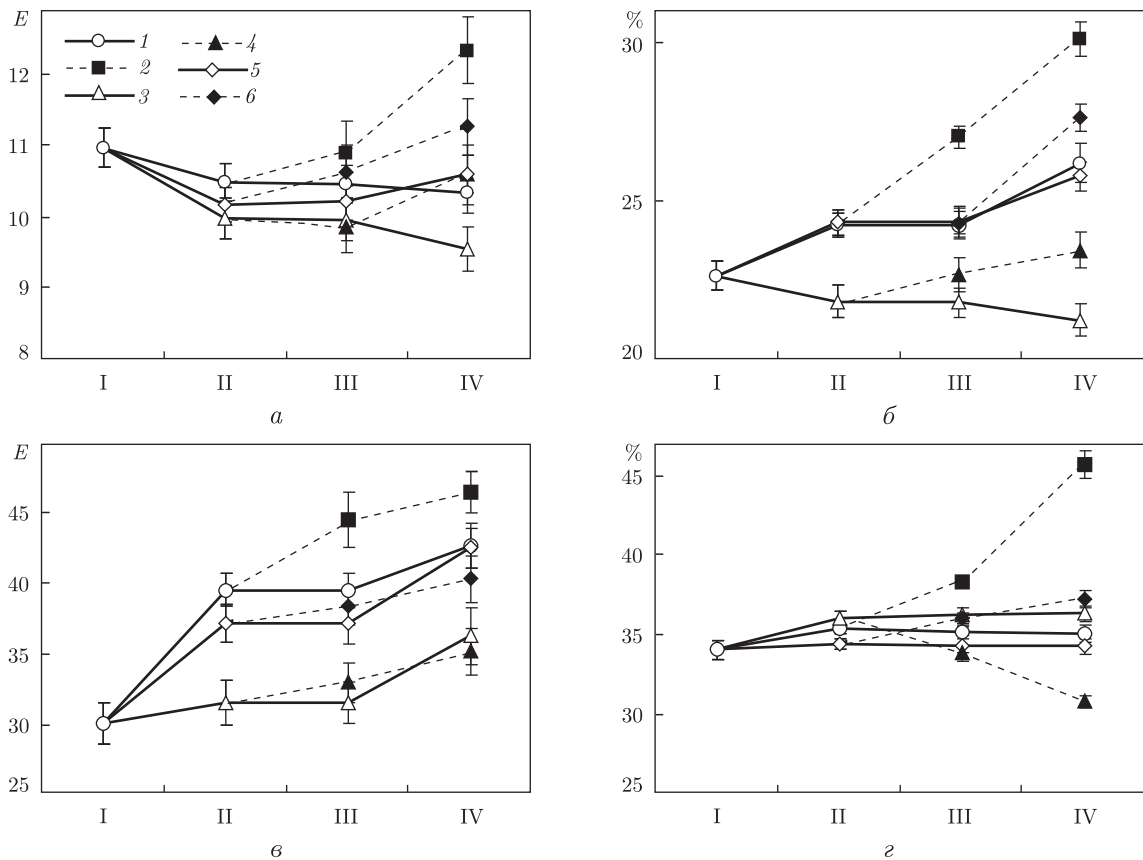


Рис. 3. Активність (а, в) і термостабільність (% залишкової активності після прогріву екстрактів ферменту — б, г) каталази (а, б) і пероксидази (в, г) коренів пшениці за впливу загартування, ЦГ та іонолу. I — до початку експозиції проростків на розчинах ЦГ або іонолу; II — після 24 год обробки проростків ЦГ або іонолом; III, IV — відповідно через 1 і 24 год після дії загартовувальної температури або (та) 25 і 48 год впливу ЦГ або іонолу. 1 — контроль; 2 — загартування; 3 — ЦГ (20 мкМ); 4 — загартування + ЦГ (20 мкМ); 5 — іонол (150 мкМ); 6 — загартування + іонол (150 мкМ)

сублетальної температури, але величина активності достовірно не відрізнялася від такої як у контролі, так і у варіанті за дії лише загартування (див. рис. 3, а).

За короткочасної дії сублетальної температури термостабільність каталази істотно підвищувалася (див. рис. 3, б), цей ефект спостерігався вже через 1 год після теплового загартування і ставав більш помітним через 24 год після дії підвищеної температури. Обробка проростків ЦГ повністю усувала спричинюване загартуванням підвищення термостабільності каталази коренів. Схожий ефект, хоча в дещо меншій мірі, відзначався при обробці проростків антиоксидантом іонолом (див. рис. 3, б).

Активність пероксидази в контрольному варіанті впродовж перших 24 год спостережень підвищувалася (див. рис. 3, в), що може бути пов'язано із залежністю активності ферменту від віку проростків [9]. ЦГ усував такі зміни активності ферменту. Через 1 год після дії на проростки загартовувальної температури активність пероксидази в коренях підвищувалася, а надалі (24 год) стабілізувалася (див. рис. 3, в). Інгібітор білкового синтезу нівелював ефект підвищення активності пероксидази, спричинюваний загартуванням. Антиоксидант іонол так само усував підвищення активності ферменту, що спостерігалось через 1 год піс-

ля загартування. Через 24 год після дії загартовувальної температури активність ферменту у варіанті з іонолом підвищувалася до рівня відповідного контролю, при поєднанні ж загартування і дії іонолу активність пероксидази залишалася незмінною (див. рис. 3, в).

Загартування призводило до підвищення термостабільності пероксидази, більш помітного через 24 год після одноквилинної дії на проростки температури 42 °С (див. рис. 3, г). Ефект зростання термостабільності пероксидази, як і ефект збільшення її активності, що спостерігався після загартування, усувався інгібітором біосинтезу білка ЦГ та антиоксидантом іонолом.

Таким чином, короткочасне (одноквилинне) загартування проростків пшениці призводило до підвищення активності і термостабільності ферментів, які регулюють вміст пероксиду водню, — каталази і пероксидази. Ці ефекти, очевидно, пов'язані з індукованим синтезом більш термостабільних ізоформ цих ферментів, а не з конформаційними змінами, оскільки підвищення термостабільності обох ферментів усувалося інгібітором білкового синтезу, що узгоджується з відомостями про існування різних за термостабільністю ізоформ пероксидази [10] і каталази [11] та про можливість зміни їх ізоферментного складу залежно від умов середовища [12]. Імовірно, у ролі індукторів або месенджерів, які запускають спричинювані загартовувальною температурою зміни активності і термостабільності ферментів, можуть бути АФК. Виявлене нами зняття антиоксидантом ефекту підвищення термостабільності обох ферментів — каталази і пероксидази — свідчить на користь такого припущення.

1. *Войников В. К., Боровский Г. Б., Колесниченко А. В., Рихванов Е. Г.* Стрессовые белки растений. — Иркутск, 2004. — 129 с.
2. *Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В., Топчиева Л. В.* Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. — Москва: Наука, 2006. — 143 с.
3. *Константинова М. Ф., Горбань И. С.* Теплоустойчивость фосфоэнолпируваткарбоксилазы после 10-секундного закалывания листьев кукурузы // *Цитология*. — 1985. — **28**, № 8. — С. 950–952.
4. *McDuffee A. T., Senisterra G., Huntley S. et al.* Proteins containing non-native disulfide bonds generated by oxidative stress can act as signals for the induction of the heat shock response // *J. Cell Physiol.* — 1997. — **171**. — P. 143–151.
5. *Suzuki N., Mittler R.* Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* — 2006. — **126**. — P. 45–51.
6. *Карпець Ю. В., Колупаєв Ю. Є., Ястреб Т. О., Обозний О. І.* Супресія антиоксидантом іонолом ефектів короткочасного теплового загартування рослин: Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин: Матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. — Дніпропетровськ, 2007. — С. 59–60.
7. *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. — **49**. — P. 713–720.
8. *Corpas F. J., Barroso J. B., del Rio L. A.* Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells // *Trends Plant Sci.* — 2001. — **8**, No 4. — P. 145–150.
9. *Колупаєв Ю. Є., Карпець Ю. В.* Індукування саліциловою кислотою тепло- і солестійкості проростків *Triticum aestivum* L. у зв'язку зі змінами прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // *Укр. ботан. журн.* — 2006. — **63**, № 4. — С. 558–565.
10. *Савич И. М.* Пероксидазы — стрессовые белки растений // *Успехи соврем. биологии*. — 1989. — **107**, вып. 3. — С. 406–417.
11. *Семчишин Г. М., Луцак В. І.* Оксидативний стрес і регуляція активності каталаз у *Escherichia coli* // *Укр. біохім. журн.* — 2004. — **76**, № 2. — С. 31–42.
12. *Vakalova S., Nedeva D., Nikolova A.* Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA // *Bulg. J. Plant Physiol.* — 2003. — Spec. Issue. — P. 386.

Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 07.04.2008