

УДК 581.1.036.2

## **ПІДВИЩЕННЯ ТЕРМОСТАБІЛЬНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В КОРЕНЯХ ПШЕНИЦІ ПІСЛЯ КОРОТКОЧАСНОГО ТЕПЛООВОГО ЗАГАРТУВАННЯ: ЗНАЧЕННЯ БІОСИНТЕЗУ БІЛКА І АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ**

© 2008 р. Ю. В. Карпець<sup>1,2</sup>, О. І. Обозний<sup>1</sup>,  
А. О. Вайнер<sup>1</sup>, Г. П. Коц<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Харківський національний аграрний університет ім. В.В.Докучаєва  
(Харків, Україна)*

<sup>2</sup>*Український науково-дослідний інститут лісового господарства  
і агролісомеліорації ім. Г.М.Висоцького  
(Харків, Україна)*

Вивчали вплив короткочасного теплового загартування (1 хв за температури 42°C) на термостабільність супероксиддисмутази (СОД) коренів проростків пшениці. Через 1-24 год після загартування відзначалося підвищення термостабільності СОД. Даний ефект усувався обробкою проростків інгібітором біосинтезу білка циклогексимідом і антиоксидантом іонолом. Зроблено висновок, що теплове загартування спричинює посилення синтезу більш термостабільних форм ферменту, посередниками у цьому процесі можуть бути активні форми кисню.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum L., супероксиддисмутаза, активні форми кисню, теплове загартування, термостабільність, біосинтез білка*

Відомо, що теплове загартування рослин може супроводжуватися підвищенням термостабільності ряду білків, у т.ч. ферментів [1]. У дослідженнях впливу гіпертермії на термостабільність ферментів частіше оцінюється відносно тривала дія на рослини високих температур. Так, показано підвищення термостабільності нітратредуктази пшениці [9] і кислій фосфатази гороху [8] після впливу на рослини температур 41-43°C протягом 2-3 год. Менш досліджений вплив короткочасного загартування на термостабільність ферментів. Існує точка зору, що ефект теплового загартування короткочасною дією ушкоджуючих температур пов'язаний зі змінами конформації вже існуючих білків [1, 7]. Проте наявність лаг-періоду між короткочасним впливом високої температури і розвитком теплостійкості дає підстави припускати участь

індукованого білкового синтезу в формуванні терморезистентності [10].

Відомо, що дія гіпертермії на рослини, як і вплив багатьох інших стресорів, супроводжується проявом ефекту окиснювального стресу – зрушенням окиснювально-відновного балансу у прооксидантний бік [18]. Так, показано, що тепловому ушкодженню рослин може передувати інактивація високою температурою антиоксидантних ферментів [13, 16]. Теплостійкість рослин може досить тісно корелювати з термостабільністю певних ферментів, наприклад, пероксидази [3].

Одним з важливих антиоксидантних ферментів є супероксиддисмутаза (СОД). З ряду рослин виділені надзвичайно термостабільні форми СОД [15, 17]. Є відомості про можливість підвищення термостабільності цього ферменту за рахунок механізмів не пов'язаних з біосинтезом білка, зокрема, шляхом приєднання іонів кальцію [12]. У попередній публікації нами показано підвищення активності СОД в

---

*Адреса для кореспонденції:* Карпець Юрій Вікторович, Харківський національний аграрний університет, п/в «Комуніст-1», Харків, 62483, Україна;  
e-mail: [plant\\_biology@mail.ru](mailto:plant_biology@mail.ru)

коренях і пагонах проростків пшениці після короткочасного теплового загартування [4]. Виникає запитання, чи відбуваються зміни термостабільності СОД після короткочасного теплового загартування і чи пов'язані вони з синтезом більш термостабільних форм за участю активних форм кисню (АФК) як сигнальних посередників? Його з'ясування на прикладі коренів пшениці було метою цієї роботи.

## МЕТОДИКА

Для досліджень використовували 4-добові етіюльовані проростки озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Донецька 48. Умови пророщування насіння та підготовки проростків до експерименту описані раніше [4, 5]. Короткочасне загартування здійснювали шляхом однохвилинного прогріву проростків у ванні водного ультратермостату TGL (Угорщина) за температури  $42,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  [5].

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 нівелювали розвиток теплостійкості, але за фізіологічно нормальних не виявляли ознак фітотоксичної дії, вибирали на підставі попередніх дослідів.

Для визначення активності і термостабільності СОД корені гомогенізували в 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,8). Гомогенат центрифугували протягом 15 хв при 7000 г. Активність ферменту визначали в супернатанті, використовуючи метод, в основі якого здатність ферменту конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН та феназинметасульфату [11]. Для оцінки термостабільності ферменту його екстракти прогрівали в ультратермостаті протягом 10 хв за температур від 38 до  $75^\circ\text{C}$ , після чого визначали залишкову активність.

У спеціальних дослідях оцінювали вплив ЦГ та іонолу на термостабільність СОД *in vitro*. Названі сполуки у концентраціях, еквівалентних робочим, що використовувалися у досліді *in vivo*, достовірно не впливали на активність і теплостійкість ферменту (результати не наводяться).

На рисунках представлені середні значення чотирьох незалежних експериментів та їх стандартні відхилення. Крім випадків, відзначених окремо, обговорюються різниці, достовірні при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Прогрів екстракту СОД незагартованих коренів пшениці за температур 38- $75^\circ\text{C}$  призводив до поступової інактивації ферменту. Достовірне зниження активності виявлялося вже за температури  $38^\circ\text{C}$  (рис. 1). Після 10-тихвилинного прогріву за температур 46- $50^\circ\text{C}$  залишкова активність складала близько 50%. Прогрів за  $75^\circ\text{C}$  майже повністю інактивував фермент. У подальших експериментах як показник термостабільності СОД використовували величину залишкової активності після прогріву екстракту ферменту за температури  $50^\circ\text{C}$ .

Як було показано нами раніше [4], короткочасне загартування спричинювало підвищення активності СОД у коренях проростків пшениці, яке було найбільшим через 24 год після впливу температури  $42^\circ\text{C}$ . При цьому антиоксидант іонол нівелював підйом активності ферменту. Ефект зростання активності СОД знімала і обробка проростків ЦГ, що свідчить про індукований синтез ферменту після дії загартувальної температури [4].

Описані вище зміни активності СОД супроводжувалися і підвищенням термостабільності ферменту (рис. 2). Така тенденція була помітною уже через 1 год, а через 24 год після загартування відзначалося зростання термостабільності приблизно на 25%. Необхідно зауважити, що найвища теплостійкість проростків пшениці після теплового загартування спосте-

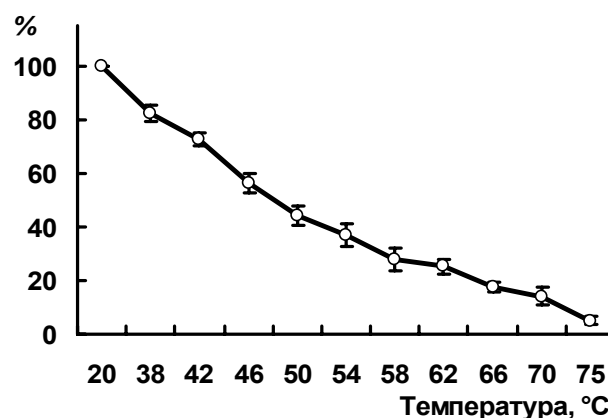
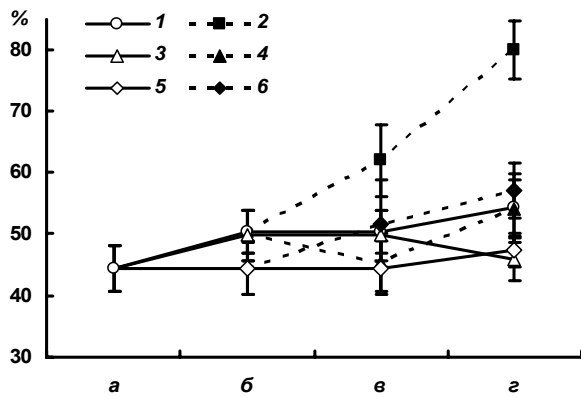


Рис. 1. Залишкова активність (%) СОД коренів пшениці після 10-хвилинного нагрівання екстракту. Контроль – 10-тихвилинна інкубація екстракту за температури  $20^\circ\text{C}$ .

## ПІДВИЩЕННЯ ТЕРМОСТАБІЛЬНОСТІ



**Рис. 2.** Термостабільність СОД (залишкова активність після прогріву екстракту, %) коренів пшениці за дії загартовування, ЦГ та іонолу. 1 – контроль, 2 – загартовування, 3 – ЦГ (20 мкМ), 4 – загартовування + ЦГ (20 мкМ), 5 – іонол (150 мкМ), 6 – загартовування + іонол (150 мкМ); а – до початку експозиції проростків на розчинах ЦГ або іонолу, б – після 24 год обробки проростків ЦГ або іонолом, в, г – відповідно через 1 і 24 год після дії загартовувальної температури або (та) 25 і 48 год впливу ЦГ або іонолу.

рігалася через 24 год і надалі (до 48 год) зростання теплостійкості припинилося [14].

Обробка проростків ЦГ та іонолом достовірно не впливала на термостабільність СОД. При цьому як інгібітор біосинтезу білка, так і антиоксидант, нівелювали спричинюваний загартуванням ефект підвищення термостабільності ферменту (рис. 2).

Таким чином, отримані результати дають підстави стверджувати, що підвищення термостабільності СОД в коренях пшениці після короткочасного теплового загартування не пов'язане з конформаційними змінами існуючих молекул ферменту, а відбувається внаслідок індукованого синтезу його більш термостабільних форм. Такі дані узгоджуються з відомостями про можливість змін ізоферментного спектра СОД у рослин гороху за гіпертермії [2]. Можна припустити, що посередниками у спричинюваному загартуванням синтезі термостабільних форм СОД виступають АФК, адже підвищення термостабільності усувалося антиоксидантом іонолом.

Раніше нами показано підвищення термостабільності розчинної форми пероксидази і каталази коренів пшениці після короткочасного теплового загартування [6]. Методом інгібіторного аналізу доведено, що ці ефекти пов'язані з новоутворенням більш термостабільних форм ферментів. В активації їх синтезу, очевидно,

беруть участь АФК, генерація яких тимчасово посилюється в перші хвилини після впливу загартовувальної температури [5].

Отже, є підстави говорити про можливість індукування короткочасним тепловим загартуванням біосинтезу термостабільних форм основних антиоксидантних ферментів. Одними з учасників такого процесу можуть бути АФК, адже спричинювані загартуванням ефекти підвищення їх термостабільності нівелювалися антиоксидантом.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.
2. Брилкина А.А., Веселов А.П., Курганова Л.Н. и др. Влияние гипертермии на изоферментный состав супероксиддисмутазы листьев гороха // Физиология растений и экология на рубеже веков. – М., 2003. – С. 70-71.
3. Ивакин А.П., Грушин А.А. Термостабильность пероксидазы в связи с жаростойкостью капусты и томатов // Физиология и биохимия культур растений. – 1990. – Т. 22, № 5. – С. 463-468.
4. Карнець Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Влияние кратковременного теплового закаливания и повреждающего нагрева на показатели про-/антиоксидантного равновесия в проростках пшеницы // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 2 (14). – С. 53-59.
5. Карнець Ю.В., Колупаев Ю.Е. Значення окиснювального стресу в індукуванні теплостійкості проростків пшениці короткочасною дією супероптимальної температури // Физиология и биохимия культур растений. – 2008. – Т. 40, № 3. – С. 245-252.
6. Карнець Ю.В., Колупаев Ю.Е., Мусатенко Л.І. Роль активних форм кисню у підвищенні термостабільності антиоксидантних ферментів коренів пшениці після теплового загартування // Доп. НАН України. – 2008. – № 12. – С.
7. Константинова М.Ф., Горбань И.С. Теплоустойчивость фосфоэнолпируваткарбоксилазы после 10-секундного закаливания листьев кукурузы // Цитология. – 1985. – Т. 28, № 8. – С. 950-952.
8. Леонтьева А.Н., Левченкова Н.В. Влияние теплового шока на термостабильность кислых фосфатаз // 4-й Съезд О-ва физиологов раст. России. Междунар. конф. "Физиология растений – наука 3-го тысячелетия", Москва, 4-9 окт., 1999. – М., 1999. – С. 407.

9. Лютова М.И., Каменцева И.Е. Термоиндуцированное увеличение устойчивости нитратредуктазы из листьев пшеницы к инактивирующим воздействиям // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 1. – С. 100-105.
10. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. – М.: Наука, 2006. – 143 с.
11. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
12. Bakardjieva N.T., Christov K.N., Christova N.V. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase // Biol. Plant. – 2000. – V. 43, № 1. – P. 73-78.
13. 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. – V. 8, № 4. – P. 145-150.
14. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.Ye. The participation of reactive oxygen species in the plants heat resistance induction at the short-term hardening by superoptimum temperatures // Materials of Int. Conf. "Bioecological problems and means of solution" (May 15-18, 2008, Saransk, Russia). – Saransk, 2008. – P. 202-203.
15. Khanna-Chopra R., Sabarinath S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in *Chenopodium murale* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 320, № 4. – P. 1187-1192.
16. Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> // J. Exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 713-720.
17. Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E. et al. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C<sub>3</sub>-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Plant, Cell and Environ. – 1998. – V. 21, № 2. – P. 169-179.
18. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // Physiol. Plant. – 2006. – V. 126. – P. 45-51.

Надійшла до редакції  
06.10.2008 р.

## **SUPEROXIDE DISMUTASE THERMOSTABILITY INCREASE IN THE WHEAT ROOTS AFTER THE SHORT-TERM HEAT HARDENING: THE VALUE OF PROTEIN BIOSYNTHESIS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES**

Yu. V. Karpets<sup>1,2</sup>, O. I. Oboznyi<sup>1</sup>, A. O. Vayner<sup>1</sup>, G. P. Kots<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*V.V. Dokuchayev Kharkiv national agrarian university  
(Kharkiv, Ukraine)*

<sup>2</sup>*G.M. Vysotsky Ukrainian research institute of forestry and forest meliorations  
(Kharkiv, Ukraine)*

The influence of short-term heat hardening (1 min at temperature 42°C) on the superoxide dismutase (SOD) thermostability in the roots of wheat plantlets have been studied. In 1-24 hours after hardening the increase of SOD thermostability was registered. The given effect was removed by the treatment of plantlets with the inhibitor of protein biosynthesis cycloheximide and antioxidant ionol. It is drawn the conclusion, that the heat hardening causes the intensifying of synthesis of more thermostable enzyme forms, reactive oxygen species can be the messengers in this process.

**Key words:** *Triticum aestivum L., superoxide dismutase, reactive oxygen species, heat hardening, thermostability, protein biosynthesis*

## **ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В КОРНЯХ ПШЕНИЦЫ ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО**

## ***ПІДВИЩЕННЯ ТЕРМОСТАБІЛЬНОСТІ***

### **ТЕПЛООВОГО ЗАКАЛИВАННЯ: ЗНАЧЕННЯ БІОСИНТЕЗА БЕЛКА І АКТИВНИХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

Ю. В. Карпец<sup>1,2</sup>, А. И. Обозный<sup>1</sup>, А. А. Вайнер<sup>1</sup>, Г. П. Коц<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева  
(Харьков, Украина)*

<sup>2</sup>*Украинский научно-исследовательский институт лесного хозяйства  
и агролесомелиорации им. Г.М. Высоцкого  
(Харьков, Украина)*

Изучали влияние кратковременного теплового закаливания (1 мин при температуре 42°C) на термостабильность супероксиддисмутазы (СОД) корней проростков пшеницы. Через 1-24 ч после закаливания отмечалось повышение термостабильности СОД. Данный эффект снимался обработкой проростков ингибитором биосинтеза белка циклогексимидом и антиоксидантом ионолом. Сделан вывод, что тепловое закаливание вызывает усиление синтеза более термостабильных форм фермента, посредниками в этом процессе могут быть активные формы кислорода.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum L.*, супероксиддисмутаза, активные формы кислорода, тепловое закаливание, термостабильность, биосинтез белка