

УДК 581.13:581.1.036

АКТИВНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2009 г. Ю. В. Карпец^{1,2}, Т. О. Ястреб¹,
А. И. Обозный¹, Ю. Е. Колупаев¹

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева
(Харьков, Украина)

²Украинский научно-исследовательский институт
лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.Н.Высоцкого
(Харьков, Украина)

Изучали влияние экзогенного пероксида водорода на теплоустойчивость этилированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), активность и термостабильность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы. Пероксид водорода в широком диапазоне концентраций вызывал повышение теплоустойчивости проростков. Через 24 ч после одночасовой обработки проростков пероксидом водорода (100 мМ) отмечалось повышение активности СОД и каталазы, в то же время активность пероксидазы снижалась. При этом под действием пероксида водорода происходило существенное повышение термостабильности пероксидазы и отмечалась тенденция к увеличению термостабильности СОД. Обсуждается возможная роль пероксида водорода как интермедиата в формировании теплоустойчивости растений и регуляции ферментативной антиоксидантной системы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., теплоустойчивость, пероксид водорода, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, термостабильность

Эффект повышения теплоустойчивости растений может быть достигнут предварительным действием на них высоких температур (закаливание или акклимация) (Александров, 1985) и разнообразных экзогенных соединений – солей кальция (Gong et al., 1997), салициловой (Dat et al., 1998) и абсцизовой (Колупаев та ін., 2006) кислот, пероксида водорода (Lopez-Delgado et al., 1998) и пр.

Установлено, что воздействие как закалывающих температур, так и указанных соединений вызывает транзиторное увеличение содержания в клетках активных форм кислорода (АФК), в частности, наиболее стабильной из них – пероксида водорода (Larkindale, Huang, 2005). К настоящему времени накоплен довольно большой объем экспериментальных дан-

ных, свидетельствующих о сигнальных функциях H₂O₂ в растительных клетках (Slesak et al., 2007; Suzuki, Mittler, 2006). Так, показано участие пероксида водорода в активации экспрессии генов стрессовых белков (Volkov et al., 2006; Wahid et al., 2007), накоплении пролина (Колупаев и др., 2005), процессах повышения активности антиоксидантных ферментов (Gadjev et al., 2006; Hu et al., 2007; Morita et al., 1999) и других защитных реакций.

Модуляцию активности антиоксидантных ферментов вызывает и тепловое закаливание растений. Так, одноминутное воздействие температуры 42 °С на проростки пшеницы вызывало кратковременное повышение в них содержания пероксидов (Kolupaev et al., 2008) и последующее постепенное повышение активности и термостабильности каталазы, пероксидазы (Карпец та ін., 2008а), СОД (Карпец та ін., 2008б). Данные эффекты закалывающей температуры не проявлялись в случае предварительной обработки проростков антиоксидантом

Адрес для корреспонденции: Карпец Юрий Викторович, Харьковский национальный агроуниверситет, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru

АКТИВНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ

и ингибитором биосинтеза белка, что можно рассматривать как свидетельство участия АФК в индуцировании синтеза более термостабильных форм антиоксидантных ферментов.

Возникает вопрос: может ли обработка растений экзогенным пероксидом водорода вызывать комплекс эффектов, идентичных действию закаливающих температур? В литературе нам не удалось найти данных о влиянии экзогенного H_2O_2 на термостабильность антиоксидантных ферментов в растениях, сведения же о влиянии пероксида водорода на активность упомянутых ферментов весьма противоречивы (Колупаев, Карпец, 2007; Bakalova et al., 2004; Sairam, Srivastava, 2000). В связи с этим в настоящей работе исследовали действие экзогенного пероксида водорода в концентрации, повышающей теплоустойчивость растений, на динамику активности и термостабильности трех антиоксидантных ферментов корней проростков пшеницы – СОД, каталазы и пероксидазы.

МЕТОДИКА

Объектом исследования были этиолированные четырехсуточные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные при температуре 20°C. Проростки опытных вариантов обрабатывали растворами пероксида водорода в концентрациях 1, 10, 100 мМ или 1 М, экспозиция – 1 мин, 10 мин, 1 ч или 24 ч. Контрольные проростки выдерживали на дистиллированной воде. После окончания экспозиции в H_2O_2 проростки, которые испытывали 1, 10 мин или 1 ч обработку пероксидом водорода, переносили на 23-24 ч на дистиллированную воду, после чего определяли их теплоустойчивость. Теплоустойчивость проростков, которые подвергались 24 ч воздействию H_2O_2 , определяли сразу после обработки пероксидом.

Для оценки теплоустойчивости проростки подвергали тестирующему прогреву в водном термостате при 45°C в течение 10 мин (Колупаев et al., 2008). Выживание проростков оценивали через 4 сут после прогрева.

Активность и термостабильность СОД (КФ 1.15.1.1), каталазы (КФ 1.11.1.6) и пероксидазы (КФ 1.11.1.7) корней определяли через определенное время после начала обработки проростков пероксидом водорода (см. ниже).

Для определения активности и термостабильности СОД корни гомогенизировали в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7,8). Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 7000

g. Активность фермента определяли, используя метод, в основе которого способность СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксид-анионы, которые образуются в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата (Чевари и др., 1985). Оптическую плотность определяли при длине волны 530 нм. Для оценки термостабильности фермента его экстракты прогревали в ультратермостате в течение 10 мин при температуре 50°C, после чего определяли остаточную активность (Карпец та ін., 2008b).

Активность каталазы определяли по методике, описанной Королюком и соавт. (1988), с некоторыми модификациями. Навеску корней гомогенизировали в 0,1 М Трис-НСl-буфере (рН 7,8). Гомогенат центрифугировали 15 мин при 7000 g. Для анализа в пробирки отбирали 3 мл супернатанта, добавляли 3 мл 0,3%-ного H_2O_2 , перемешивали и инкубировали 10 мин. После этого реакцию останавливали добавлением 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Оптическую плотность раствора определяли при длине волны 410 нм. Содержание пероксида в пробе рассчитывали по калибровочному графику, приготовленному с использованием H_2O_2 . Для определения термостабильности фермента его экстракты прогревали при температуре 50°C в течение 10 мин, после чего анализировали остаточную активность (Карпец та ін., 2008a).

Активность растворимой пероксидазы определяли по методу Риджа и Осборна (Ridge, Osborne, 1970) с некоторыми изменениями. Растительный материал гомогенизировали в 0,06 М К₂Na-фосфатном буфере Серенсена (рН 6,2). Активность фермента определяли в супернатанте после центрифугирования гомогената при 7000 g в течение 15 мин. В качестве донора водорода использовали гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода. Оптическую плотность окрашенного продукта определяли при длине волны 440 нм. Для оценки термостабильности фермента экстракт прогревали при 65°C в течение 10 мин и определяли остаточную активность (Карпец та ін., 2008a).

При определении активности и термостабильности ферментов повторность независимых опытов была трехкратной (в каждом опыте четыре биологические повторности). При оценке теплоустойчивости проростков было проведено шесть независимых опытов в трехкратной биологической повторности (30 проростков в каждой). На рисунках приведены средние ре-

зультаты типичных опытов и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии экспериментов выбирали режим обработки проростков пероксидом водорода, вызывающий максимальное увеличение теплоустойчивости. Одноминутная экспозиция проростков в растворах всего концентрационного диапазона достоверно не влияла на теплоустойчивость проростков (рис. 1). Десятиминутная обработка в 10, 100 мМ и 1 М растворах пероксида водорода вызвала достоверное (на 20-28 %) повышение выживания после трестирующего прогрева, эффект 1 мМ раствора был менее значительным. Одночасовая экспозиция проростков пшеницы вызвала повышение теплоустойчивости при использовании растворов всех рабочих концентраций на 24-28 % (рис. 1). При увеличении времени обработки проростков в растворах пероксида водорода до 24 ч достоверного изменения их выживания после повреждающего прогрева не наблюдалось по сравнению с одночасовой экспозицией, хотя при использовании 1 М раствора была зарегистрирована тенденция к некоторому снижению теплоустойчивости (рис. 1). По-видимому, такое воздействие пероксида превышает оптимум и близко к токсическому. В последующих сериях экспериментов по изучению влияния обработки пероксидом водорода на активность и термостабильность антиоксидантных ферментов использовали концентрацию 100 мМ при экспозиции 1 ч.

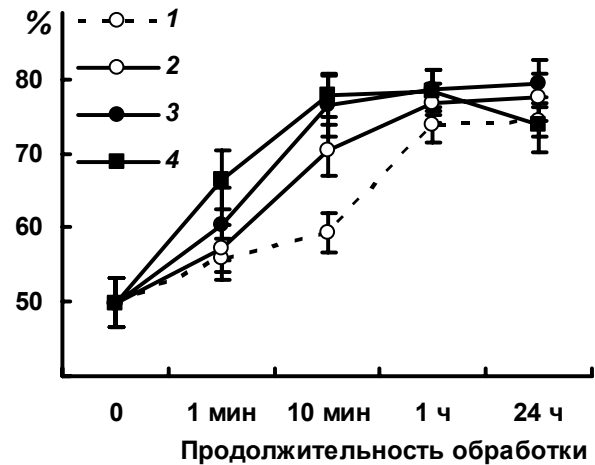


Рис. 1. Влияние обработки пероксидом водорода на выживание (%) проростков пшеницы после повреждающего нагрева (45 °С, 10 мин). 1-4 – соответственно: 1, 10, 100 мМ и 1 М H_2O_2 .

Активность СОД в корнях проростков контрольного варианта в течение 24 ч наблюдений достоверно не изменялась (рис. 2.А). Воздействие пероксида водорода вызывало постепенное повышение активности фермента. Такой эффект был достоверным через 6 ч после обработки проростков H_2O_2 , а через 24 ч активность СОД в корнях проростков, обработанных пероксидом, повышалась более чем на 70 %. Одновременно отмечалась тенденция к некоторому повышению термостабильности фермента ($p \leq 0,1$ через 24 ч после обработки проростков пероксидом водорода) (рис. 2.Б).

Активность каталазы в контрольном ва-

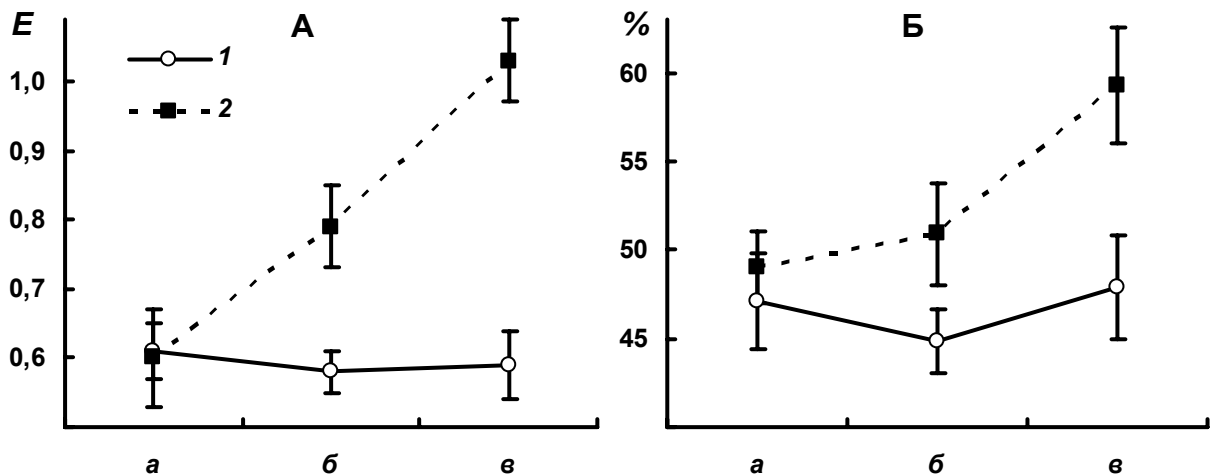


Рис. 2. Активность (E , усл. ед./г сухого вещества · мин) (А) и термостабильность (остаточная активность после прогрева экстракта фермента, %) (Б) СОД корней проростков пшеницы.

Здесь и на рис. 3, 4: а-в – соответственно через 1, 6 и 24 ч после обработки H_2O_2 . 1 – контроль, 2 – H_2O_2 (100 мМ).

АКТИВНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ

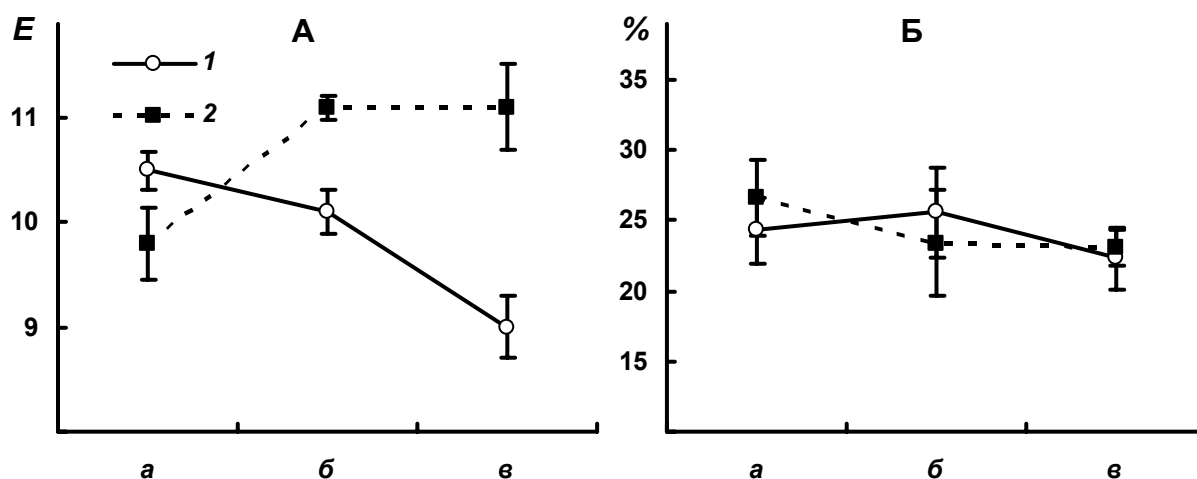


Рис. 3. Активность (E , $\text{mM H}_2\text{O}_2/(\text{г сухого вещества} \cdot \text{мин})$) (А) и термостабильность (остаточная активность после прогрева экстракта фермента, %) (Б) каталазы корней проростков пшеницы.

Остальные обозначения, как на рис. 2.

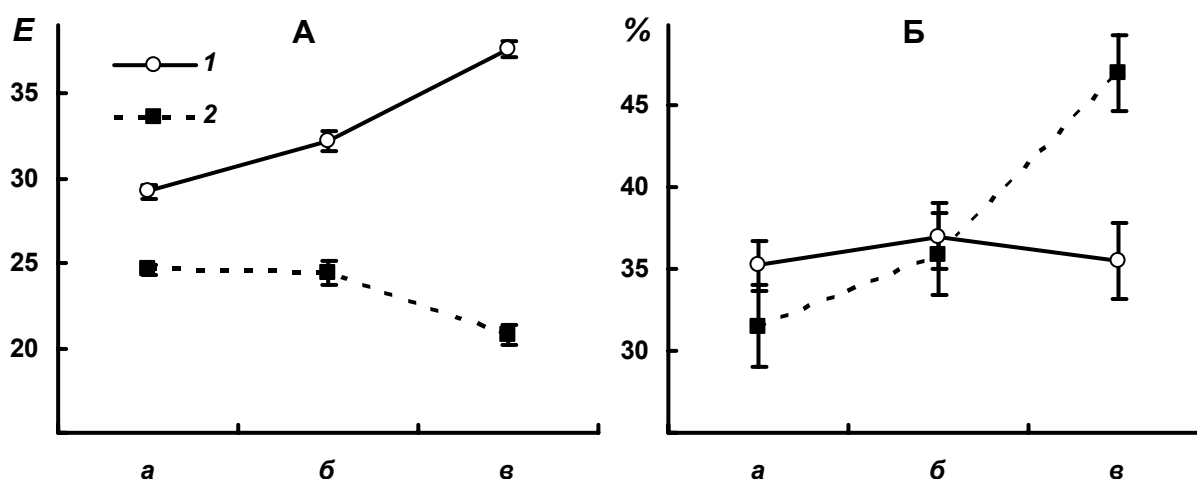


Рис. 4. Активность (E , усл. ед./ $(\text{г сухого вещества} \cdot \text{мин})$) (А) и термостабильность (остаточная активность после прогрева экстракта фермента, %) (Б) пероксидазы корней проростков пшеницы.

Остальные обозначения, как на рис. 2.

рианте несколько уменьшалась в течение периода наблюдений (рис. 3.А). Через 1 ч после обработки проростков пероксидом водорода активность фермента достоверно не изменялась, а через 6-24 ч отмечалось повышение активности фермента. При этом обработка проростков пероксидом водорода не вызывала изменений термостабильности каталазы (рис. 3.Б).

В течение 24 ч наблюдений отмечалась тенденция к повышению активности пероксидазы в корнях проростков контрольного варианта (рис. 4.А). Обработка проростков пероксидом водорода вызывала заметное снижение активности пероксидазы, которое было достовер-

ным уже через 1 ч после обработки, данный эффект сохранялся и через 6-24 ч после воздействия экзогенного пероксида. В то же время через 24 ч после обработки проростков H_2O_2 наблюдалось достоверное увеличение термостабильности пероксидазы (рис. 4.Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Способность экзогенного пероксида водорода повышать теплоустойчивость зарегистрирована на различных растительных объектах (Dat et al., 2000; Lopez-Delgado et al., 1998). На примере отрезков coleoptилей пшеницы нами показано, что проникновение H_2O_2 довольно

строго регулируется растительными клетками и содержание пероксида в тканях после экзогенной обработки хотя и повышается, но остается в физиологических пределах (Колупаев, Карпещ, 2007). По-видимому, этим объясняются защитные эффекты довольно высоких концентраций экзогенного пероксида – порядка 10 мМ для изолированных колеоптилей пшеницы (Колупаев, Карпещ, 2007) и 100 мМ для интактных проростков (см. рис. 1).

Экзогенный пероксид водорода оказывает существенное модифицирующее влияние на комплекс антиоксидантных ферментов. Ранее установлено повышение активности СОД и каталазы в колеоптилях пшеницы под влиянием экзогенного H_2O_2 . Повышенный уровень активности этих ферментов в колеоптилях сохранялся в течение нескольких часов после обработки пероксидом (Колупаев, Карпещ, 2007). В целом характер влияния пероксида водорода на активность СОД и каталазы в корнях интактных проростков (см. рис. 2.А, 3.А) был похож на эффекты, зарегистрированные на примере колеоптилей пшеницы (Колупаев, Карпещ, 2007). Однако, в корнях эти эффекты были существенными лишь через некоторое время после обработки H_2O_2 . Так, повышение активности СОД и каталазы отмечалось через 6-24 ч после воздействия пероксида водорода.

Снижение активности пероксидазы в корнях проростков пшеницы (см. рис. 4.А), как и в изолированных колеоптилях (Колупаев, Карпещ, 2008), происходило практически сразу после обработки H_2O_2 . Такое снижение активности фермента в колеоптилях было обратимым: уже через 1-4 ч после их переноса на среду без H_2O_2 активность пероксидазы соответствовала величинам контрольного варианта. В то же время дальнейшая инкубация интактных проростков в среде без пероксида в течение 24 ч не приводила к восстановлению уровня активности пероксидазы до контрольного варианта (см. рис. 4.А). Возможно, это связано с меньшей «реактивностью» интактных проростков по сравнению с изолированными органами, изменяющими свои характеристики даже в результате небольших воздействий.

Повышение активности СОД и каталазы в корнях проростков пшеницы, происходящее под влиянием H_2O_2 , по-видимому, связано с активацией синтеза этих ферментов. Так, известно, что в условиях *in vivo* под влиянием пероксида водорода возможно усиление синтеза этого фермента (Hu et al., 2007; Sairam, Srivastava, 2000). В то же время Cu/Zn-СОД ингибируется

пероксидом водорода в условиях *in vitro* (Alscher et al., 2002). Повышение активности СОД в корнях проростков спустя определенное время после обработки H_2O_2 (см. рис. 2.А) косвенно свидетельствует о влиянии пероксида на новообразование фермента, а не на активность уже существующих молекул.

На некоторых объектах зарегистрировано ингибирование каталазы под влиянием пероксида водорода (Bakalova et al., 2004), хотя в ряде работ показано увеличение активности этого фермента при действии экзогенного H_2O_2 (Колупаев, Карпещ, 2008; Sairam, Srivastava, 2000). В наших экспериментах отмечалось повышение активности каталазы, однако оно существенно проявлялось лишь через 24 ч после обработки проростков H_2O_2 (см. рис. 3.А), что позволяет предполагать индукцию пероксидом синтеза данного фермента, а не влияние его на активность уже существующих молекул.

Сложнее объяснить физиологический смысл снижения активности пероксидазы в корнях проростков пшеницы после их обработки экзогенным пероксидом водорода (см. рис. 4.А). Такой эффект ингибирования пероксидазы под действием H_2O_2 зарегистрирован и на других объектах – колеоптилях кукурузы (Шарова, 1999), пшеницы (Колупаев, Карпещ, 2008), гипокотиллях *Lupinus albus* (Hernandez-Ruiz et al., 2000). Одной из возможных причин угнетения пероксидазной активности под действием пероксида водорода может быть ее переключение на каталазную (Mika et al., 2004). В наших экспериментах снижение активности пероксидазы в корнях проростков пшеницы отмечалось практически сразу после одночасовой обработки пероксидом водорода, а существенное увеличение активности каталазы лишь через 6-24 ч после воздействия экзогенным H_2O_2 , что не позволяет рассматривать переключение пероксидазной активности на каталазную в качестве основной причины снижения активности пероксидазы. Известно, что разные формы пероксидазы в определенных условиях (прежде всего, при избытке восстановителей) могут выступать в роли генератора АФК – супероксидного радикала и пероксида водорода (Часов, 2002; Kawano, Muto, 2000). Возможно, снижение активности пероксидазы под действием пероксида водорода является защитной реакцией растений, направленной на предотвращение развития окислительного стресса, эффект которого вызывает сам экзогенный H_2O_2 . Не исключено, что в нашем случае происходило ингибирование синтеза отдельных форм пе-

роксидазы или изменение ее локализации (в экспериментах определялась только растворимая форма этого фермента). Если пероксидаза действительно причастна к генерации АФК в корнях пшеницы, то ее ингибирование экзогенным пероксидом водорода может быть одним из механизмов корректировки про-/антиоксидантного равновесия.

Действие экзогенного пероксида водорода, как и кратковременное действие гипертермии (Kolupaev et al., 2008), повышало теплоустойчивость проростков пшеницы. При этом влияние закаливающих температур, как и H_2O_2 , вызывало увеличение активности ключевых антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы (Kolupaev et al., 2008, Карпец та ін., 2008б). Активность пероксидазы изменялась по-разному: повышалась в ответ на действие закаливающей температуры (Kolupaev et al., 2008) и снижалась после обработки пероксидом водорода (см. рис. 4.А). По-видимому, влияние закаливания и обработки растений H_2O_2 на функционирование про-/антиоксидантных ферментов имеет как сходство, так и различия. Обработка растений экзогенным H_2O_2 является более жестким способом изменения про-/антиоксидантного равновесия по сравнению с действием закаливающих температур.

Как уже упоминалось, воздействие закаливающих температур на проростки пшеницы повышало термостабильность СОД, каталазы и пероксидазы и данный эффект нивелировался при обработке проростков антиоксидантом (Карпец та ін., 2008а, б). Это позволяет предполагать участие АФК в процессах, обеспечивающих изменение термостабильности ферментов. В настоящей работе показано, что воздействие экзогенного пероксида водорода на проростки пшеницы достоверно повышало термостабильность пероксидазы и вызывало тенденцию к повышению термостабильности СОД (см. рис. 2.Б, 4.Б). Данные изменения, по-видимому, связаны с индуцированием синтеза новых изоформ ферментов, поскольку они проявлялись лишь спустя довольно продолжительное время после обработки проростков пероксидом водорода. В то же время для более однозначного вывода об индуцировании синтеза новых изоформ пероксидазы и СОД в корнях проростков пшеницы под действием экзогенного H_2O_2 необходимо исследование электрофоретических спектров этих ферментов.

Эффект повышения термостабильности каталазы, который наблюдался в корнях проростков пшеницы под влиянием закаливающей те-

мпературы, воспроизвести действием экзогенного пероксида водорода нам не удалось. Следует отметить, что повышение термостабильности каталазы под влиянием закаливающей температуры было менее существенным по сравнению с изменениями термостабильности СОД и пероксидазы (Карпец та ін., 2008а, б). Возможно, что нам не удалось установить незначительные флуктуации термостабильности этого фермента, которые могли быть вызваны экзогенным H_2O_2 . В то же время вполне вероятно, что вызываемое закаливанием изменение термостабильности этого фермента связано не только (либо не столько) с действием пероксида водорода как сигнальной молекулы, а с эффектами других посредников, задействованных в передаче сигнала закаливающей температуры в геном.

Таким образом, нами показано повышение теплоустойчивости проростков пшеницы под действием экзогенного пероксида водорода, которое сопровождалось изменением активности СОД, каталазы и пероксидазы. После воздействия H_2O_2 на проростки выявлены также повышение термостабильности пероксидазы и тенденция к увеличению термостабильности СОД. Такие результаты дают основания рассматривать пероксид водорода (а также другие АФК) в качестве ключевых интермедиатов формирования теплоустойчивости растений. В то же время не все эффекты закаливания и действия экзогенного пероксида на изученные антиоксидантные ферменты являются тождественными: воздействием экзогенного H_2O_2 не удалось достичь повышения термостабильности каталазы, которое наблюдалось под влиянием закаливающей температуры (Карпец та ін., 2008а).

В настоящей работе предпринята попытка изучения влияния обработки проростков пшеницы экзогенным пероксидом водорода на термостабильность трех антиоксидантных ферментов. В то же время, если допустить, что H_2O_2 как сигнальная молекула участвует в индуцировании синтеза термостабильных форм по крайней мере некоторых ферментов, возникает вопрос о влиянии пероксида водорода на термостабильность различных энзимов, в том числе тех, функционирование которых прямо не связано с окислительным метаболизмом. Как известно, тепловое закаливание и ряд других воздействий вызывают изменения термостабильности многих ферментов, относящихся к разным классам (Александров, 1985). Исследование роли АФК в таких процессах, по нашему мнению, в дальнейшем позволит получить новую информацию о механизмах изменений термостабильности

белков у растений под влиянием закалывающих температур и других внешних факторов.

ЛИТЕРАТУРА

- Александров В.Я.* Реактивность клеток и белки. – Л.: Наука, 1985. – 318 с.
- Карпець Ю.В., Колупаєв Ю.Є., Мусатенко Л.І.* Роль активних форм кисню у підвищенні термостабільності антиоксидантних ферментів коренів пшениці після теплового загартування // Доп. НАН України. – 2008а. – № 12. – С. 136-140.
- Карпець Ю.В., Обозний О.І., Вайнер А.О., Коц Г.П.* Підвищення термостабільності супероксиддисмутази в коренях пшениці після короткочасного теплового загартування: значення біосинтезу білка і активних форм кисню // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008б. – Вип. 3 (15). – С. 41-45.
- Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В., Акинина Г.Е.* Влияние салициловой кислоты и перекиси водорода на содержание пролина в coleoptilyах пшеницы при тепловом и солевом стрессах // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2005. – Вип. 1(6). С. 51-56.
- Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В.* Окислительный стресс и состояние антиоксидантной системы в coleoptilyах пшеницы при действии пероксида водорода и нагрева // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 2 (14). – С. 42-52.
- Колупаєв Ю.Є., Карпець Ю.В.* Активність супероксиддисмутази і каталази у coleoptilyах пшениці за дії пероксиду водню і нагрівання // Физиология и биохимия культ. растений. – 2007. – Т. 39, № 4. – С. 319-325.
- Колупаєв Ю.Є., Мусатенко Л.І., Косаківська І.В., Карпець Ю.В.* Вплив салицилової кислоти і фітогормонів на теплостійкість сім'ядолей *Cicumis sativus* L. у зв'язку зі зрушеннями прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // Укр. ботан. журн. – 2006. – Т. 63, № 6. – С. 837-843.
- Королюк М. А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
- Часов А.В., Гордон Л.Х., Колесников О.П., Минибаева Ф.В.* Peroxidaza клеточной поверхности – генератор супероксид-аниона в корневых клетках пшеницы при раневом стрессе // Цитология. – 2002. – Т. 44, № 7. – С. 691-696.
- Чевари С., Чаба И., Секей Й.* Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
- Шарова Е.Н.* Роль пероксида водорода в регуляции растяжимости первичных клеточных стенок // 4-й Съезд О-ва физиологов растений России. Междунар. конф. «Физиология растений – наука 3-го тысячелетия», Москва, 4-9 октября, 1999: Тез. докл. – М., 1999. – Т. 2. – С. 738-739.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S.* Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress plants // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53, N 372. – P. 1331-1341.
- Bakalova S., Nikolova A., Nedeva D.* Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and aba during germination of wheat seeds // Bulg. J. Plant Physiol. – 2004. – V. 30, N 1-2. – P. 64-77.
- Dat J.F., Delgado H.L., Foyer C.H., Scott I.M.* Parallel changes in H₂O₂ and catalase during termotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // Plant Physiol. – 1998. – V. 116. – P. 1351-1357.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. et al.* Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses // Cell. Mol. Life Sci. – 2000. – V. 57. – P. 779-795.
- Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T.S. et al.* Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis // Plant Physiol. – 2006. – V. 141. – P. 436-445.
- Gong M., Li Y.J., Dai X. et al.* Involvement of calcium and calmoduline in the acquisition of heat-shock induced termotolerance in maize seedlings // J. Plant Physiol. – 1997. – V. 150. – P. 615-621.
- Hernandez-Ruiz J., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F. et al.* Characterization of isoperoxidase-B2 inactivation in etiolated Lupinus albus hypocotyls // Biochem. et Biophys. Acta Protein Struct. and Mol. Enzymol. – 2000. – V. 1478, N 1. – P. 78-88.
- Hu X., Jiang M., Zhang J. et al.* Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants // New Phytologist. – 2007. – V. 173. – P. 27-38.
- Kawano T., Muto S.* Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture // J. Exp. Bot. – 2000. – V. 51. – N 345. – P. 685-693.
- Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V., Kosakivska I.V.* The importance of reactive oxygen species in the induction of plants resistance to the heat stress //

АКТИВНОСТЬ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ

- Gen. Appl. Plant Physiol. – 2008. – V. 34, N 3-4. – P. 251-266.
- Larkindale J., Huang B. Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass // Plant Growth Regul. – 2005. – V. 47. – P. 17-28.
- 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.
- Mika A., Minibaeva F., Beckett R., Luthje S. Induced generation and detoxification of active oxygen species // Phytochem. Rev. – 2004. – V. 3, N 1-2. – P. 173-193.
- Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress signaling // Plant Cell Physiol. – 1999. – V. 40. – P. 417-422.
- Ridge I., Osborne D. J. Hydroxyproline and peroxidases in cell wall of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // J. Exp. Bot. – 1970. – V. 45. – P. 843 – 856.
- Sairam R.K., Srivastava G.C. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes // Biol. Plant. – 2000. – V. 43. – P. 381-386.
- Slesak I., Libik M., Brpinska K. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses // Acta Biochim. Polon. – 2007. – V. 54, № 1. – P. 39-50.
- 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.
- Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schoffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis / R.A. Volkov, // Plant Mol. Biol. – 2006. – V. 61, № 4-5. – P. 733-746.
- Wahid A., Perveen M., Gelani S., Basra S.M.A. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins // J. Plant Physiol. – 2007. – V. 164. – P. 283-294.

Поступила в редакцию
28.04.2009 г.

ACTIVITY AND THERMOSTABILITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES OF ROOTS OF WHEAT PLANTLETS AFTER THE INFLUENCE OF EXOGENOUS HYDROGEN PEROXIDE

Yu. V. Karpets^{1,2}, T. O. Yastreb¹, O. I. Oboznyi¹, Yu. Ye. Kolupaev¹

¹V.V. Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University
(Kharkiv, Ukraine)

²G.M. Vysotsky Ukrainian Research Institute
of Forestry and Forest Meliorations
(Kharkiv, Ukraine)

The influence of exogenous hydrogen peroxide on heat resistance of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) plantlets, activity and thermostability superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidase have been studied. The hydrogen peroxide in wide range of concentration caused increase of plantlets heat resistance. Within 24 hours after one-hour treatment of plantlets with hydrogen peroxide (100 mM) the increase of SOD and catalase activity took place, at the same time the peroxidase activity decreased. Thus under the action of hydrogen peroxide the essential increase of peroxidase thermostability and the tendency to increase of SOD thermostability was registered. The possible role of hydrogen peroxide as the intermediate in the formation of plants heat resistance and regulation of enzymatic antioxidative system is discussed.

Key words: *Triticum aestivum* L., heat resistance, hydrogen peroxide, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, thermostability

**АКТИВНІСТЬ І ТЕРМОСТАБІЛЬНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ
ФЕРМЕНТІВ КОРЕНІВ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ПІСЛЯ
ДІЇ ЕКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ**

Ю. В. Карпець^{1,2}, Т. О. Ястреб¹, О. І. Обозний¹, Ю. Є. Колупаєв¹

¹*Харківський національний аграрний університет ім. В.В.Докучаєва
(Харків, Україна)*

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

Вивчали вплив екзогенного пероксиду водню на теплостійкість етіюльованих проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.), активність і термостабільність супероксиддисмутази (СОД), каталази і пероксидази. Пероксид водню в широкому діапазоні концентрацій викликав підвищення теплостійкості проростків. Через 24 ч після одноденної обробки проростків пероксидом водню (100 мМ) відзначалося підвищення активності СОД і каталази, в той же час активність пероксидази знижувалася. При цьому за дії пероксиду водню відбувалося істотне підвищення термостабільності пероксидази і спостерігалася тенденція до збільшення термостабільності СОД. Обговорюється можлива роль пероксиду водню як інтермедіата у формуванні теплостійкості рослин і регуляції ферментативної антиоксидантної системи.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., теплостійкість, пероксид водню, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, термостабільність