

УДК 581.1

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ КРОСС-АДАПТАЦИИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ К ГИПЕРТЕРМИИ И ОСМОТИЧЕСКОМУ ШОКУ

© 2012 г. А. И. Обозный, Ю. Е. Колупаев,
Н. В. Швиденко, А. А. Вайнер

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

Исследовали влияние кратковременных теплового (одноминутный прогрев при 42 °С) и осмотического (погружение в 1 М раствор сахарозы на 10 мин с последующим переносом в дистиллированную воду на 20 мин) воздействий на активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы – СОД, каталазы и пероксидазы) в корнях и побегах этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Уже через 10 мин после обоих закаливающих воздействий в корнях происходило повышение активности СОД. Ее активность возрастала в течение 6 ч после обоих закаливающих воздействий и затем стабилизировалась на повышенном уровне. В побегах также отмечалось быстрое повышение активности СОД и стабилизация повышенной активности фермента через 6 ч после теплового и осмотического закаливания. Активность каталазы в корнях и побегах повышалась лишь через 6 ч после теплового и через 9 ч после осмотического закаливания. Повышение активности растворимой пероксидазы в корнях и побегах отмечалось через 1 ч после обоих закаливающих воздействий и продолжалось в течение 24 ч. В условиях стрессовых воздействий (повреждающий прогрев или осмотический шок) активность всех трех антиоксидантных ферментов в органах закаленных проростков сохранялась на более высоком уровне. На отдельных стадиях наблюдений проявлялась своеобразная «взаимозаменяемость» каталазы и пероксидазы: при пониженных значениях активности каталазы отмечалась повышенная активность пероксидазы и наоборот. Предполагается, что эффект кросс-адаптации антиоксидантной системы обусловлен повышением содержания в клетках проростков пшеницы под действием разных типов закаливания одинаковых сигнальных посредников – прежде всего активных форм кислорода.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., гипертермия, осмотический шок, кросс-адаптация, активные формы кислорода, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза

Феномен кросс-адаптации – формирования перекрестной (сопряженной) устойчивости к одному стресс-фактору после умеренного (закаливающего) воздействия другого изучается в течение многих десятилетий (Кузнецов и др., 1990). Одной из причин кросс-адаптации может быть полифункциональность ряда стресс-протекторных систем, например, антиоксидантной (Scandalios, 2005; Колупаев, Карпец, 2010).

Изменения в окислительно-восстановительных комплексах относятся к ранним стрессовым реакциям, что позволяет рассматривать образующиеся вследствие этого активные формы кислорода (АФК) в качестве «сигналов тревоги». Так, известно, что супероксидный анион-радикал образуется в электрон-транспортных цепях хлоропластов и митохондрий и этот процесс усиливается при уменьшенном расходе восстановителя – НАДФН (Miller, Mittler, 2006), что вполне возможно в неблагоприятных условиях. При вызванном стрессовыми воздействиями нарушении координации процессов, осуществляемых во внутренних мембранах и процессов, происходящих в матриксе митохон-

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

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

дрий и строге хлоропластов, возрастает вероятность акцептирования электронов от переносчиков электрон-транспортной цепи молекулярным кислородом с образованием АФК (Gill, Tuteja, 2010).

Усиление генерации АФК может быть обусловлено также активацией находящейся в плазмалемме НАДФН-оксидазы (Sagi, Fluhr, 2006; Глянько и др., 2009) и/или внеклеточной пероксидазы класса III (Minibaeva et al., 2001). Изменения активности данных ферментов также могут быть следствием вызванного стрессом нарушения слабых связей в плазмалемме либо связей между плазматической мембраной и клеточными стенками. Генерируемые этими ферментами супероксидные анион-радикалы спонтанно или под действием супероксиддисмутазы (СОД), локализованной не только во внутриклеточных компартментах, но и в апопласте (Ogawa et al., 1997; Miller et al., 2010), легко превращаются в стабильные молекулы пероксида водорода, выполняющие сигнальные функции (Neill et al., 2002). По-видимому, появление такого сигнала индуцирует антиоксидантную и другие стресс-протекторные системы, что может обуславливать формирование устойчивости к ряду стресс-факторов, в т.ч. различной природы.

Так, обработка пероксидом водорода проростков риса индуцировала их антиоксидантную систему и обеспечивала сохранение окислительно-восстановительного баланса при действии токсичных концентраций кадмия (Hu et al., 2009). Предварительное воздействие полиэтиленгликоля на каллусную культуру сахарного тростника вызывало повышение ее солеустойчивости, сопровождающееся увеличением активности антиоксидантных ферментов (Munir, Aftab, 2009). Предобработка прорастающих семян ячменя при температуре 0°C вызывала повышение их теплоустойчивости. При этом происходило увеличение активности СОД, аскорбатпероксидазы, каталазы и глутатионредуктазы (Mei, Song, 2010).

В нашей предыдущей работе было показано повышение устойчивости проростков пшеницы к осмотическому шоку предварительным кратковременным закаливающим прогревом и индуцирование теплоустойчивости умеренным осмотическим воздействием (Обозный и др., 2011). При этом оба закаливающих воздействия вызывали кратковременное увеличение содержания пероксида водорода в тканях. Можно полагать, что транзиторное усиление генерации активных форм кислорода

(АФК) индуцирует антиоксидантную и другие стресс-протекторные системы. В связи с этим возникают вопросы: как связано возможное изменение активности антиоксидантных ферментов с динамикой развития устойчивости проростков пшеницы к тепловому и осмотическому шоку после предварительных закаливающих воздействий; проявляются ли специфические особенности функционирования антиоксидантных ферментов под влиянием закаливающих и повреждающих высокотемпературного и осмотического воздействий. Выяснение этих вопросов и явилось целью настоящей работы, в которой исследовано влияние указанных закаливающих и повреждающих воздействий на динамику активности ключевых антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы и растворимых форм неспецифической пероксидазы.

МЕТОДИКА

Объектом исследования явились этиолированные проростки мягкой озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, выращенные на очищенной водопроводной воде при температуре 20°C.

Четырехсуточные проростки подвергали закаливающим воздействиям – высокотемпературному (одноминутный прогрев в водном термостате при температуре 42,0±0,1°C) или осмотическому (погружение целых проростков в 1 М раствор сахарозы на 10 мин с последующим переносом в дистиллированную воду на 20 мин) (Обозный и др., 2011).

Через определенные промежутки времени после закаливающих воздействий их подвергали потенциально летальным воздействиям – тепловому (прогрев в водном термостате при температуре 45,5±0,1°C в течение 10 мин) или осмотическому (погружение целых проростков в 1 М раствор сахарозы на 2 ч с последующим переносом на дистиллированную воду на 1 ч) (Обозный и др., 2011). Контролями служили проростки, погруженные на соответствующее время в очищенную водопроводную воду.

Устойчивость проростков к повреждающим прогреву и осмотическому шоку была определена ранее по их выживанию через 4 сут после повреждающих воздействий (Обозный и др., 2011).

Для определения активности СОД (КФ 1.15.1.1) и каталазы (КФ 1.11.1.6) корни или побеги проростков пшеницы гомогенизировали на холоде в 0,15 М К₂Na-фосфатном буфере (рН 7,6) с добавлением детергента Тритона X-100

(конечная концентрация 0,1%). Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g. Активность СОД определяли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата (Колупаев и др., 2005). Активность каталазы определяли по количеству разложившегося пероксида водорода (Колупаев и др., 2005).

Активность растворимой пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по методу Ridge, Osborne (1970) с незначительными модификациями. Растительные образцы гомогенизировали на холоде в 0,06 М К₂Na-фосфатном буфере (рН 6,2), гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g и в супернатанте определяли активность фермента. В качестве субстрата использовали пероксид водорода, а в качестве донора водорода – гваякол.

Содержание белка анализировали по методу Бредфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976).

Эксперименты проводили в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторности и воспроизводили независимо не менее трех раз. На рисунках представлены средние значения типичных опытов и их ошибки. Кроме специально оговоренных случаев обсуждаются различия, достоверные при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика устойчивости проростков пшеницы к повреждающему прогреву и осмотическому шоку

Как было показано нами ранее (Обозный и др., 2011), после одноминутного закаливающего прогрева теплоустойчивость проростков в течение первого часа была сниженной, после чего происходило ее постепенное повышение. Максимум теплоустойчивости наблюдался через 24 ч после закаливающего прогрева. В течение первого часа после закаливающего осмотического воздействия осмоустойчивость проростков также снижалась по сравнению с контролем, затем повышалась, достигая максимума через 6 ч (Обозный и др., 2011).

Кратковременное закаливающее осмотическое воздействие приводило к снижению теплоустойчивости проростков пшеницы, наиболее низкой она была через 2 ч после такого воздействия. Затем отмечалось постепенное ее повыше-

ние, максимальных значений она достигала через 24 ч после осмотического закаливания (Обозный и др., 2011).

После закаливающего прогрева проростков их устойчивость к осмотическому шоку была сниженной в течение первого часа наблюдений, затем происходило постепенное ее повышение с максимумом через 6-8 ч после закаливающего прогрева. Однако к 24 ч наблюдений происходило снижение осмоустойчивости как подвергнутых прогреву, так и контрольных проростков (Обозный и др., 2011).

В экспериментах по исследованию активности антиоксидантных ферментов проростки подвергали осмотическому шоку в момент их максимальной осмоустойчивости (через 6 ч после осмотического или теплового закаливающих воздействий). Повреждающий прогрев проростков также осуществляли в период их максимальной теплоустойчивости (через 24 ч после теплового или осмотического воздействий).

Динамика активности СОД

Корни. Активность СОД в корнях проростков контрольного варианта изменялась незначительно, через 24 ч от начала наблюдений отмечалась тенденция к ее увеличению (рис. 1, I, А). Через 3 и 24 ч после повреждающего осмотического воздействия значения активности фермента достоверно не отличались от величин контрольного варианта в соответствующих временных точках. Через 3 ч после повреждающего прогрева активность СОД в корнях немного повышалась, а через 24 ч не отличалась от величины соответствующего контроля.

Уже через 10 мин после закаливающего воздействия высокой температуры происходило существенное повышение активности СОД в корнях (рис. 1, I, Б). К 6-у часу после закаливания наблюдалось дополнительное увеличение активности фермента, а максимальная активность СОД отмечалась через 24 ч после действия закаливающей температуры.

Через 3 ч после осмотического шока в корнях проростков, подвергнутых тепловому закаливанию, активность СОД повышалась (в отличие от реакции на такое воздействие незакаленных проростков). Однако через 24 ч после осмотического шока она снижалась, хотя абсолютные значения активности фермента превышали соответствующую величину для незакаленных проростков, подвергнутых осмотическому шоку.

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

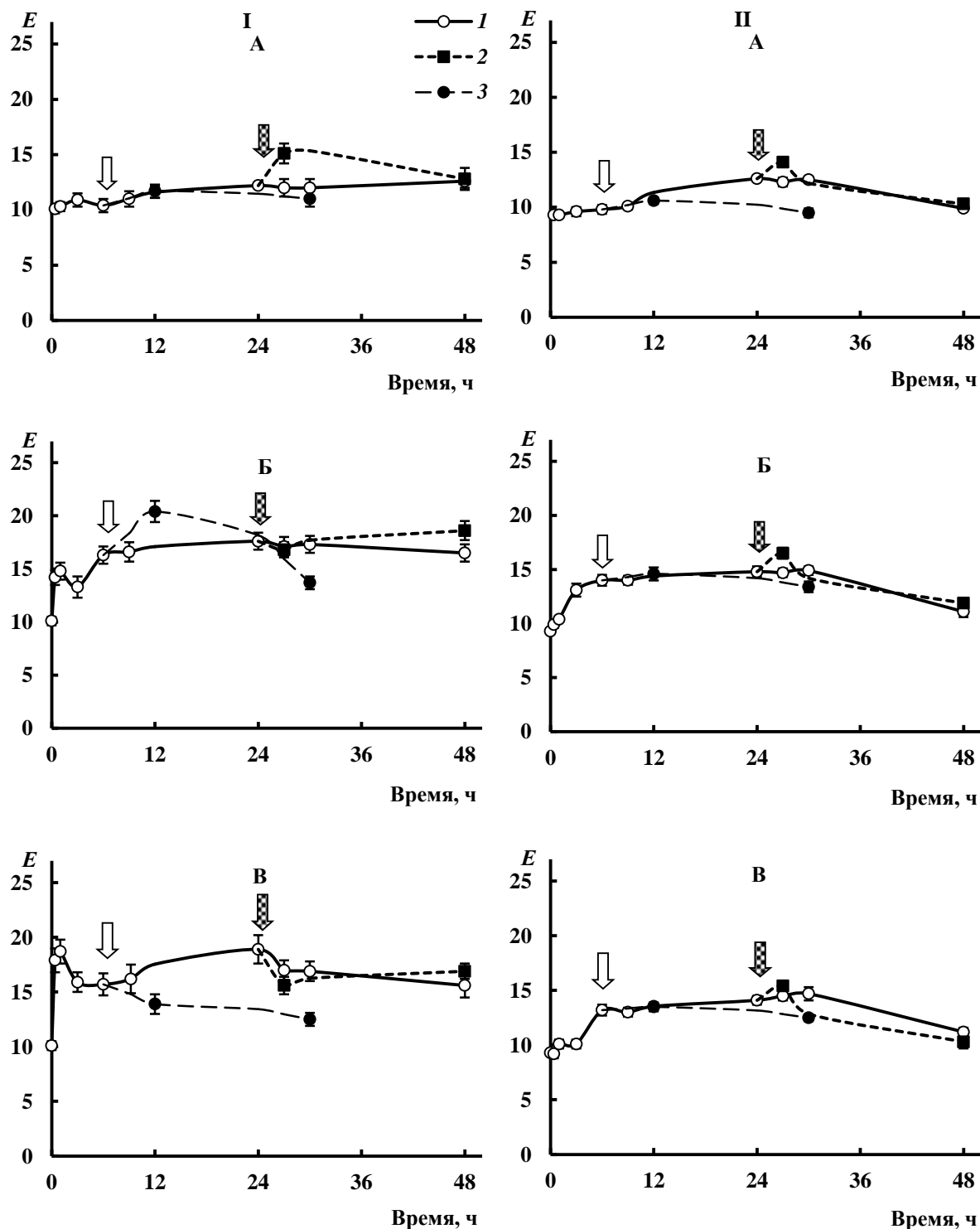


Рис. 1. Активность СОД (E , усл. ед/(мг белка \cdot мин)) в корнях (I) и побегах (II) проростков пшеницы.

Здесь и на рис. 3, 4: А – контроль (без закаливания); Б – тепловое закаливание; В – осмотическое закаливание; 1 – без повреждающих воздействий; 2 – после повреждающего прогрева (10 мин при температуре 45,5°C); 3 – после осмотического шока (двухчасовое воздействие 1 М сахарозы с последующим переносом на дистиллированную воду на 1 ч). Светлой стрелкой показан момент начала нанесения осмотического повреждающего воздействия, заштрихованной – момент повреждающего прогрева.

Через 3 ч после повреждающего прогрева активность СОД в корнях проростков, подвергнутых тепловому закаливанию, существенно не изменялась и незначительно превышала вели-

чину контрольного варианта в соответствующей временной точке. Однако через 24 ч после высокотемпературного стресса активность фермента значительно превышала соответ-

ствующие величины активности в корнях контрольных проростков, как не подвергнутых повреждающему прогреву, так и испытывших такое воздействие (рис. 1, I, Б).

Закаливающее осмотическое воздействие вызывало резкое повышение активности СОД в корнях, уже через 10 мин после такого воздействия активность фермента в опытном варианте превышала значения контроля в 1,8 раза (рис. 1, I, В). Однако затем, через 3-9 ч после осмотического закаливания активность СОД немного уменьшалась, через 24 ч снова увеличивалась, а к моменту окончания наблюдений (48 ч) слегка снижалась.

Корни проростков, подвергнутых осмотическому закаливанию, отвечали на осмотический шок (повреждающее воздействие) некоторым снижением активности фермента, более заметным через 24 ч после воздействия. При этом однако значения активности фермента в корнях закаленных проростков несколько превышали ($p \leq 0,1$) соответствующие величины в корнях незакаленных, но подвергнутых осмотическому шоку проростков (рис. 1, I, В).

Через 3 ч после повреждающего прогрева проростков, закаленных осмотическим воздействием, активность СОД в их корнях изменялась незначительно, а через 24 ч несколько повышалась. При этом ее величины существенно превышали соответствующие значения варианта с контрольными и подвергнутыми повреждающему прогреву проростками (рис. 1, I, В).

Побеги. В побегах проростков контрольного варианта активность СОД в течение первых 9 ч эксперимента существенно не изменялась, к 24 ч несколько повышалась, а к 48 ч снова немного снижалась (рис. 1, II, А). Осмотическое повреждающее воздействие вызывало снижение активности СОД в побегах контрольного варианта, которое наблюдалось через 24 ч. Через 3 ч после теплового повреждающего воздействия активность СОД несколько повышалась, а через 24 ч приближалась к соответствующей величине контрольного варианта (без прогрева).

Закаливающий прогрев проростков вызывал постепенное повышение активности СОД в побегах, при этом повышенные по сравнению с контролем значения активности наблюдались через 6-30 ч после такого воздействия, а к 48 ч активность фермента снижалась (рис. 1, II, Б).

После повреждающего осмотического воздействия активность СОД в побегах проростков, подвергнутых закаливающему прогреву,

существенно не изменялась. Однако абсолютные величины активности СОД в таких проростках существенно превышали соответствующие значения в побегах незакаленных, но подвергнутых осмотическому шоку образцов.

Через 3 ч после повреждающего прогрева в побегах проростков, подвергнутых закаливающему прогреву, отмечалось повышение активности СОД. Через 24 ч она снижалась, однако ее абсолютные значения превышали величины активности в побегах контрольных проростков, подвергнутых повреждающему прогреву (рис. 1, II, Б).

Под влиянием осмотического закаливающего воздействия, как и теплового, в побегах происходило постепенное повышение активности СОД (рис. 1, II, В). Наибольшие величины наблюдались через 6-30 ч от момента закаливающего воздействия.

После повреждающего осмотического воздействия активность СОД в побегах проростков, закаленных действием данного фактора, существенно не изменялась, при этом абсолютные ее величины превышали соответствующие значения активности фермента в побегах контрольных проростков, подвергнутых осмотическому шоку.

Через 3 ч после повреждающего прогрева в побегах проростков, подвергнутых закаливающему осмотическому воздействию, активность СОД слегка повышалась, хотя через 24 ч снижалась и не отличалась от соответствующей величины в побегах контрольного варианта, подвергнутых повреждающему прогреву (рис. 1, II, В).

Таким образом, в целом оба закаливающих воздействия – теплое и осмотическое – способствовали проявлению более высокой активности СОД в побегах и корнях проростков пшеницы в условиях повреждающего действия указанных факторов. Причем положительное влияние закаливающих воздействий на активность СОД было перекрестным.

Динамика активности каталазы

Корни. Активность каталазы в корнях проростков контрольного варианта в период наблюдений изменялась незначительно с тенденцией к небольшому снижению через 48 ч от начала наблюдений (рис. 2, I, А).

Повреждающее осмотическое воздействие вызывало существенное снижение активности каталазы уже через 3 ч, к 24 ч наблюде-

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

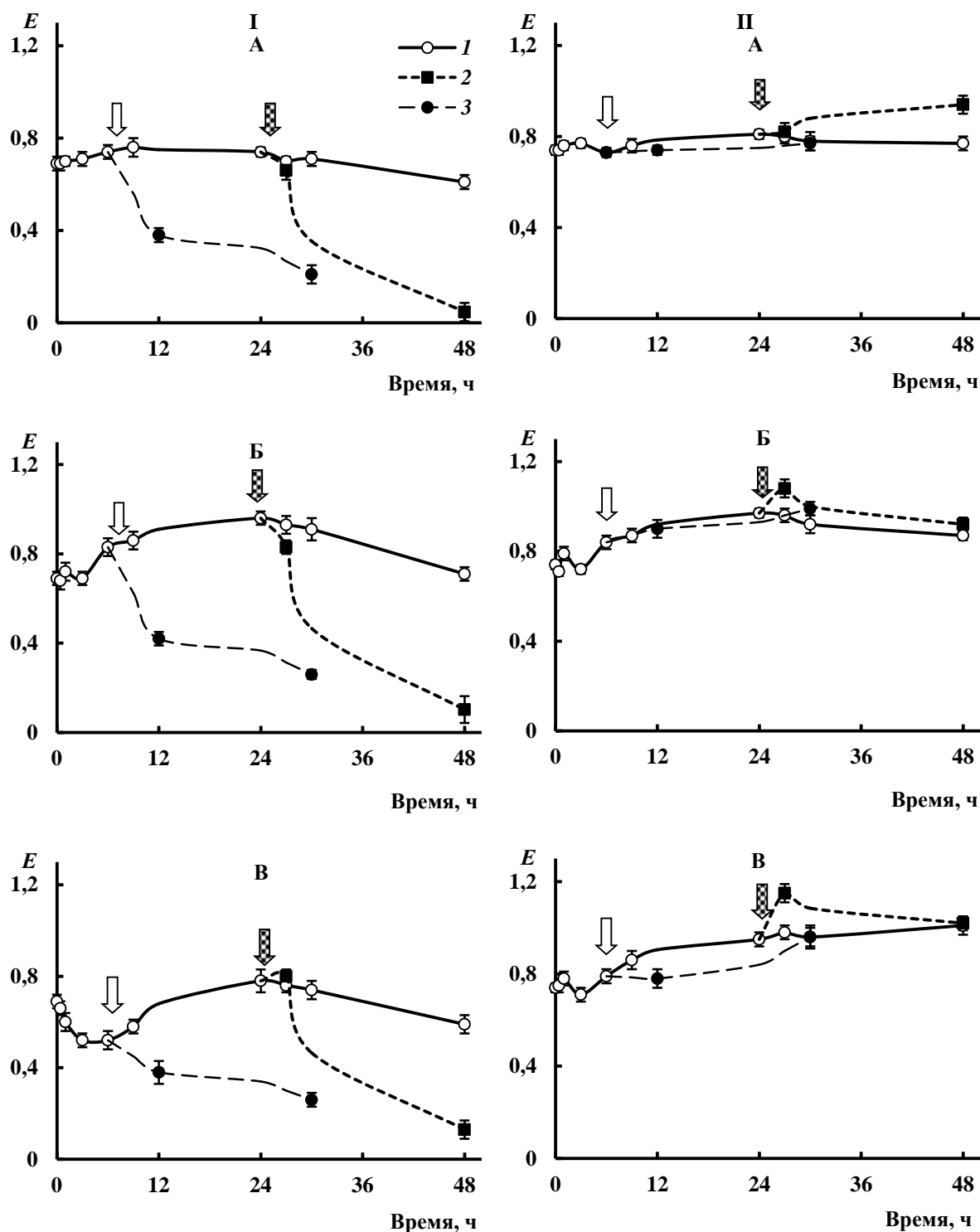


Рис. 2. Активность каталазы (E , ммоль H_2O_2 /(мг белка • мин)) в корнях (I) и побегах (II) проростков пшеницы.

Обозначения как на рис. 1.

ний этот эффект усиливался (рис. 2, I, А). После повреждающего прогрева активность каталазы в корнях незакаленных проростков также падала, очень низкие значения наблюдались через 24 ч после теплового стресса (рис. 2, I, А).

Тепловое закалывающее воздействие на проростки вызывало повышение активности каталазы в корнях, которое отмечалось через 6 ч после закалывания, при этом повышенная активность фермента сохранялась в течение последующих суток (рис. 2, I, Б).

После повреждающего осмотического воздействия на закаленные предварительно прогревом проростки активность фермента в корнях падала, хотя и превышала соответствующие величины контрольных, но подвергнутых воздействию осмотического шока проростков.

Через 3 ч после повреждающего прогрева в корнях предварительно закаленных проростков активность каталазы существенно не изменялась, однако превышала величину активности в корнях проростков контрольного варианта. Через 24 ч после такого воздействия активность каталазы в корнях проростков, подвергнутых закаливающему прогреву, снижалась, однако при этом она в два раза превышала значения, которые наблюдались в корнях контрольных проростков, подвергнутых повреждающему действию высокой температуры (рис. 2, I, сравнить А и Б).

Закаливающее осмотическое воздействие вызывало снижение активности каталазы в корнях, которое отмечалось через 1-6 ч. В дальнейшем величины активности фермента возвращались к значениям контроля (рис. 2, I, В).

Осмотический шок вызывал снижение активности каталазы в корнях проростков, закаленных осмотическим воздействием. Этот эффект был замечен как через 3, так и через 24 ч.

Через 3 ч после повреждающего прогрева проростков, предварительно подвергнутых осмотическому закаливающему воздействию, активность каталазы в корнях существенно не изменялась, а через 24 ч снижалась. Однако абсолютные ее величины в корнях таких проростков существенно превышали значения, наблюдавшиеся в варианте с контрольными, но подвергнутыми повреждающему прогреву проростками (рис. 2, I, В).

Побеги. Активность каталазы в побегах проростков контрольного варианта в период наблюдений существенно не изменялась (рис. 2, II, А). Не происходило значительных изменений активности этого фермента в побегах незакаленных проростков и через 3 и 24 ч после воздействия осмотического шока. Через 3 ч после повреждающего прогрева активность фермента в побегах также не изменялась, а через 24 ч увеличивалась (рис. 2, II, А).

В побегах проростков, подвергнутых тепловому закаливанию, активность каталазы увеличивалась, начиная с 6 ч от момента закаливающего воздействия, достигала максимума через

24 ч и затем, к 48 ч, немного снижалась (рис. 2, II, Б).

Через 3 и 24 ч после воздействия осмотического шока активность каталазы в побегах проростков, повергнутых тепловому закаливанию, оставалась стабильной. При этом она превышала значения активности в побегах проростков контрольного варианта, подвергнутых осмотическому шоку.

Через 3 ч после повреждающего прогрева активность каталазы в побегах закаленных проростков увеличивалась, но в последующем (к 24 ч) немного снижалась. При этом через 3 ч после повреждающего прогрева активность фермента в закаленных проростках существенно превышала соответствующую величину активности в побегах незакаленных, но подвергнутых повреждающему прогреву проростков (рис. 2, II, Б).

Через 9 ч после осмотического закаливающего воздействия активность каталазы в побегах начинала увеличиваться и достигала максимума к 24 ч, такая же повышенная по сравнению с незакаленным контролем активность фермента сохранялась и через 48 ч после осмотического закаливания (рис. 2, II, В). В ответ на осмотический шок активность фермента существенно не изменялась. При этом через 24 ч абсолютные ее величины превышали соответствующие значения активности в побегах незакаленных проростков, подвергнутых осмотическому шоку.

Через 3 ч после повреждающего прогрева отмечалось повышение активности каталазы в побегах проростков, подвергнутых осмотическому закаливанию, через 24 ч активность фермента немного уменьшалась (рис. 2, II, В). При этом как через 3, так и через 24 ч после повреждающего прогрева величины активности каталазы в побегах проростков, закаленных осмотическим воздействием, были выше, чем в соответствующих контрольных.

Таким образом, как в корнях, так и в побегах проростков пшеницы тепловое и осмотическое закаливающие воздействия вызывали повышение активности каталазы. Повреждающие тепловое и осмотическое воздействия вызывали значительное снижение активности фермента в корнях и слабо влияли на ее величины в побегах. При этом предварительные закаливающие воздействия (как тепловое, так и осмотическое) способствовали проявлению более высоких значений активности каталазы после повреждающих воздействий указанных факторов.

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Динамика активности пероксидазы

Корни. Активность растворимой пероксидазы в корнях проростков контрольного варианта в период наблюдений изменялась незначительно (рис. 3, I, А). Под действием осмотического шока происходило снижение активности пероксидазы в корнях проростков контрольного варианта, которое проявлялось через 24 ч.

Через 3 ч после повреждающего прогрева отмечалось повышение активности каталазы в корнях проростков контрольного варианта, затем, через 24 ч, активность фермента снижалась.

Под влиянием закаливающего прогрева происходило повышение активности пероксидазы, которое проявлялось уже через 1 ч (рис. 3, I, Б). Активность этого фермента в дальнейшем возрастала, достигала максимума через 24-27 ч, после чего стабилизировалась.

Осмотический шок вызывал снижение активности пероксидазы в корнях проростков, закаленных прогревом, более заметным это снижение было через 24 ч. В то же время абсолютные значения активности растворимой пероксидазы в корнях проростков, подвергнутых закаливающему прогреву, были выше, чем в корнях незакаленных проростков.

Под действием повреждающего прогрева также происходило снижение активности пероксидазы в корнях проростков, подвергнутых предварительному закаливающему прогреву (рис. 3, I, Б). Однако при этом в корнях закаленных проростков активность пероксидазы сохранялась на более высоком уровне, чем в корнях незакаленных, но подвергнутых повреждающему прогреву проростков.

Закаливающее осмотическое воздействие вызывало повышение активности растворимой пероксидазы, которое проявлялось через 1 ч (рис. 3, I, В). В дальнейшем активность фермента возрастала, достигая максимума через 24 ч, к 48 ч наблюдений происходило снижение активности пероксидазы в корнях проростков, подвергнутых осмотическому закаливанию. При этом, однако, абсолютные ее значения превышали величины соответствующего контроля.

Осмотический шок вызывал снижение активности растворимой пероксидазы в корнях, которое проявлялось через 24 ч. Несмотря на это, абсолютная величина активности фермента в корнях проростков, предварительно закален-

ных осмотическим воздействием, была выше, чем в корнях незакаленных проростков, подвергнутых повреждающему осмотическому воздействию.

Через 3 ч после повреждающего прогрева активность пероксидазы в корнях проростков, подвергнутых осмотическому закаливанию, существенно снижалась. Однако через 24 ч в корнях проростков этого варианта отмечалось повышение активности фермента (рис. 3, I, В). При этом абсолютная величина активности фермента в этой временной точке превышала соответствующее значение, наблюдавшееся в корнях незакаленных проростков, подвергнутых повреждающему прогреву.

Побеги. В побегах проростков контрольного варианта наблюдалось повышение активности растворимой пероксидазы к 24 ч от начала наблюдений (рис. 3, II, А). Такой эффект может быть связан с возрастными флуктуациями активности фермента (Колупаев, Карпец, 2006).

Через 3 ч после осмотического шока активность пероксидазы в побегах незакаленных проростков немного увеличивалась и оставалась стабильной в течение 24 ч, однако на более низком уровне, чем в соответствующем контроле (рис. 3, II, А). После повреждающего прогрева активность пероксидазы в побегах незакаленных проростков снижалась, особенно заметным этот эффект был через 24 ч.

Закаливающий прогрев вызывал повышение активности пероксидазы в побегах проростков пшеницы, такой эффект был достоверным через 6-9 ч после прогрева. Через 24-48 ч различия в активности фермента в побегах закаленных и незакаленных проростков проявлялись менее заметно из-за увеличения активности фермента в побегах контрольных проростков (рис. 3, II, Б).

Под влиянием осмотического шока происходило повышение активности пероксидазы в побегах проростков, закаленных предварительным прогревом. Такой эффект был заметным как через 3, так и через 24 ч после повреждающего осмотического воздействия (рис. 3, II, Б).

Через 3 ч после повреждающего прогрева отмечалось небольшое повышение активности пероксидазы в побегах закаленных проростков пшеницы, а к 24 ч активность фермента снижалась. При этом абсолютные значения активности растворимой пероксидазы в побегах закаленных и подвергнутых повреждающему прогреву проростков были выше, чем в побегах не-

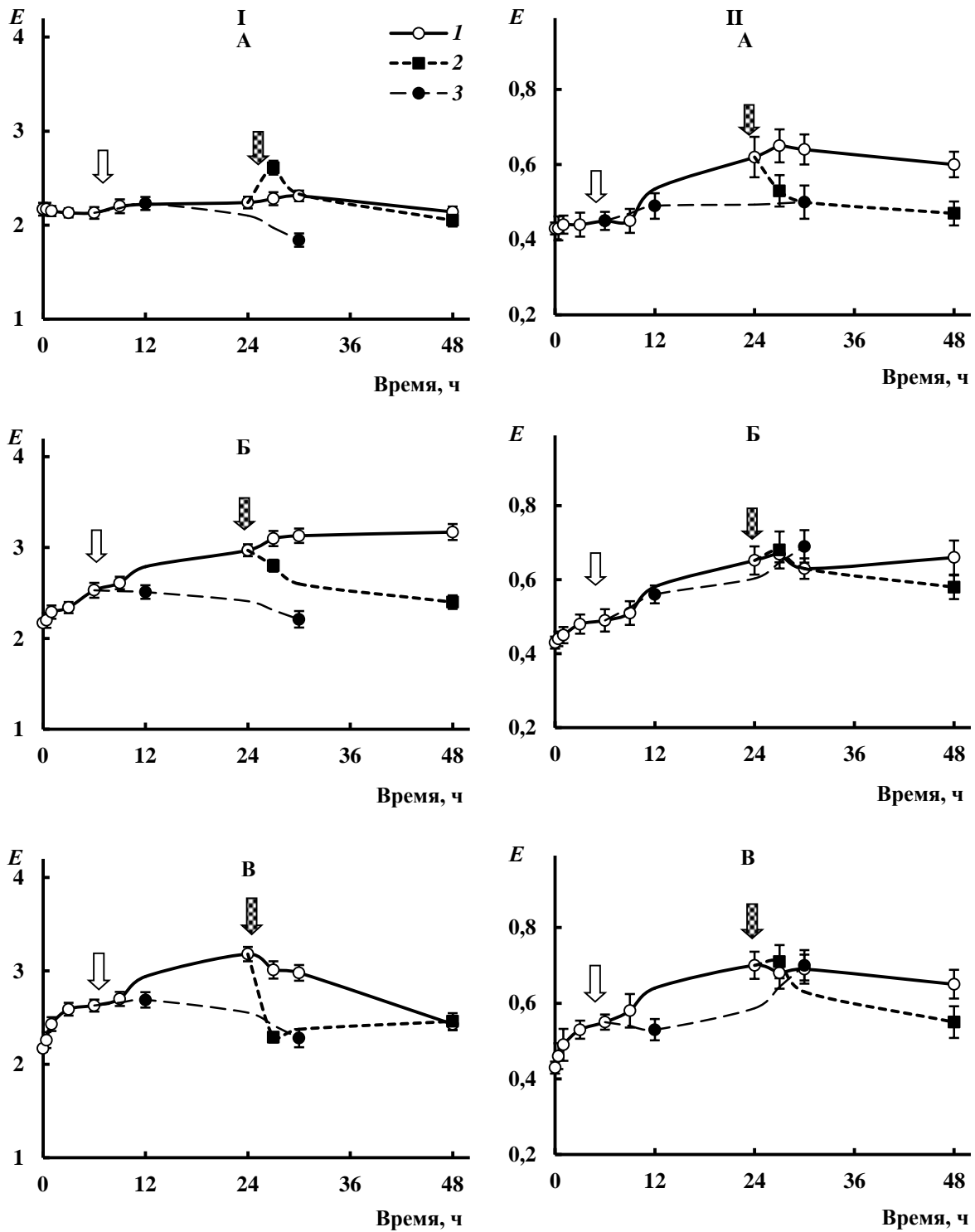


Рис. 3. Активность пероксидазы (E , усл. ед./ $(\text{мг белка} \cdot \text{мин})$) в корнях (I) и побегах (II) проростков пшеницы. Обозначения как на рис. 1.

закаленных проростков, испытывавших действие такого же повреждающего прогрета.

Осмотическое закаливание вызывало повышение активности пероксидазы в побегах проростков пшеницы, такой эффект проявлялся уже через 1 ч после закаливания (рис. 3, II, B). Активность фермента возрастала и в дальней-

шем, достигая максимума через 24 ч. Затем отмечалось небольшое снижение активности пероксидазы в побегах проростков, закаленных осмотическим воздействием.

Через 3 ч после действия осмотического шока активность пероксидазы в побегах проростков, закаленных предварительным осмоти-

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

ческим воздействием, немного снижалась, а через 24 ч возрастала (рис. 3, П, В). При этом абсолютные значения активности фермента в этом варианте превышали соответствующие значения в побегах контрольных проростков, подвергнутых осмотическому шоку.

Под влиянием повреждающего прогрева активность пероксидазы в побегах проростков, закаленных осмотическим воздействием, через 3 ч немного увеличивалась, а затем (к 24 ч) снижалась (рис. 3, П, В). Абсолютные значения активности фермента в побегах этого варианта были выше, чем в побегах контрольных проростков, подвергнутых повреждающему прогреву.

Таким образом, тепловое и осмотическое закаливающие воздействия вызывали повышение активности пероксидазы в корнях и побегах проростков пшеницы. Соответствующие повреждающие воздействия вызывали снижение активности фермента в указанных органах, предварительные закаливающие воздействия (как тепловое, так и осмотическое) способствовали сохранению активности фермента после повреждающих воздействий на более высоком уровне.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тепловое и осмотическое закаливающие воздействия вызывали повышение активности всех трех изученных антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы и пероксидазы – в корнях и побегах проростков пшеницы.

Раньше всего проявлялись изменения активности СОД. Существенное ее повышение в корнях отмечалось уже через 10 мин как после теплового, так и после осмотического воздействий (рис. 1). В побегах подобные изменения происходили медленнее. СОД рассматривается как первичный рубеж против АФК (Alscher et al., 2002). Такую ее функцию связывают с тем, что, элиминируя супероксидные радикалы, СОД опосредованно уменьшает вероятность образования гидроксильных радикалов, синглетного кислорода, пероксинитрита и других АФК, которые в силу высокой реакционной способности не могут быть удалены белковыми катализаторами (Бараненко, 2006). В связи с этим более раннее по сравнению с другими антиоксидантными ферментами повышение активности СОД представляется физиологически целесообразной реакцией.

При этом, однако, необходимо отметить, что в наших экспериментах в течение первого

часа после закаливающих воздействий устойчивость проростков пшеницы к повреждающему прогреву и осмотическому шоку была сниженной. В этот же временной отрезок отмечалось повышение содержания пероксида водорода в органах проростков, подвергнутых тепловому и осмотическому воздействиям (Обозный и др., 2011). Возможно, что СОД в этот период выступает не столько в роли компонента антиоксидантной защиты, сколько как фермент, обуславливающий увеличение содержания пероксида водорода в корнях и побегах проростков пшеницы за счет интенсивного превращения супероксидного анион-радикала. Последний может интенсивно генерироваться тканями за счет вызываемой закаливающими воздействиями активации НАДФН-оксидазы и апопластной пероксидазы (Колупаев и др., 2011). Повышение активности СОД при отсутствии изменений активности каталазы и растворимой (внутриклеточной) пероксидазы должно приводить к увеличению содержания пероксида водорода, что и наблюдалось в наших экспериментах в течение первого часа после закаливающих воздействий (Обозный и др., 2011). В литературе имеются данные о роли активности СОД в стимулируемой агентом окислительного стресса паракватом экспрессии гена аскорбатпероксидазы в эмбриональной культуре риса (Morita et al., 1999). Вызываемая паракватом индукция аскорбатпероксидазы подавлялась ингибитором СОД диэтилдитиокарбаматом натрия и усиливалась действием ингибитора каталазы 3-аминотриазола (Morita et al., 1999).

Естественно, что в нашем случае для более однозначного вывода о роли СОД в формировании пула пероксида водорода в тканях проростков пшеницы сразу после закаливающих воздействий необходимы специальные исследования.

Следует отметить, что повышенная активность СОД в корнях и побегах проростков, подвергнутых тепловому или осмотическому закаливанию, наблюдалась не только в течение первого часа, когда отмечалось снижение устойчивости проростков к стрессорам и повышение содержания пероксида водорода в них (Обозный и др., 2011), но и в дальнейшем, когда наблюдалось уменьшение содержания H_2O_2 и повышение устойчивости проростков к тепловому и осмотическому воздействиям. Следует заметить, что в этот период повышенная активность СОД сочетается с повышенной активностью ферментов, обезвреживающих пероксид водорода – каталазы и пероксидазы (рис. 1-3).

В наших экспериментах через 3 ч после закаливающего прогрева в корнях проростков отмечалось повышение активности пероксидазы, которая возростала и в дальнейшем, а через 6 ч повышалась активность каталазы (рис. 2, 3). В побегах также через 6 ч после воздействия закаливающей температуры происходило повышение активности каталазы и (в меньшей степени) пероксидазы.

Через 3-6 ч после закаливающего осмотического воздействия активность каталазы в корнях проростков пшеницы немного снижалась (рис. 2), но в этот период существенно возростала активность пероксидазы (рис. 3), что могло способствовать нормализации пула пероксида водорода в корнях.

После теплового и осмотического закаливающих воздействий активность СОД в побегах также увеличивалась, однако это увеличение происходило несколько медленнее, чем в корнях, особенно после осмотического закаливания. При этом через 6 ч после обоих закаливающих воздействий активность фермента была существенно выше, чем в контроле (рис. 1). Через 6-9 ч после обоих закаливающих воздействий в побегах повышалась и активность каталазы и пероксидазы (рис. 2, 3), что, по-видимому, способствовало формированию большей антиоксидантной «емкости» закаленных проростков.

После повреждающих теплового и осмотического воздействий активность СОД в корнях и побегах закаленных проростков сохранялась на более высоком уровне по сравнению с незакаленными. При этом положительное влияние теплового закаливания на осмоустойчивость и осмотического на теплоустойчивость было вполне сопоставимым.

Активность каталазы в корнях незакаленных проростков сильно снижалась под влиянием повреждающих осмотического и особенно теплового воздействий (рис. 2). Такие же эффекты наблюдались и в корнях закаленных проростков, однако в них активность фермента после повреждающих воздействий все же сохранялась на более высоком уровне. Следует отметить, что очень низкая активность каталазы после повреждающих воздействий (в т. ч. и в корнях закаленных проростков) могла компенсироваться весьма высокой активностью пероксидазы (рис. 3).

Примечательно, что в побегах после повреждающего действия прогрева и осмотического шока наблюдалась иная картина: активность каталазы в закаленных проростках оставалась на

стабильно высоком уровне (рис. 2). При этом активность пероксидазы через 24 ч после повреждающего прогрева в побегах проростков, закаленных предварительным прогревом или осмотическим воздействием, снижалась (рис. 3).

Таким образом, на отдельных стадиях наблюдений в наших экспериментах проявлялась своеобразная «взаимозаменяемость» каталазы и пероксидазы: при пониженных значениях активности каталазы отмечалась повышенная активность пероксидазы и наоборот. Выявленный эффект согласуется с данными других авторов. В частности, сообщается, что при определенных условиях (при повышенной концентрации пероксида водорода) пероксидаза может проявлять каталазную активность (Mika et al., 2004).

Необходимо отметить, что в целом динамика активности антиоксидантных ферментов согласуется с динамикой развития устойчивости проростков пшеницы к повреждающим тепловому и осмотическому воздействиям после закаливающих воздействий. Высокая устойчивость проростков пшеницы к двум указанным факторам, наблюдавшаяся через 6-24 ч после закаливающих воздействий, проявлялась на фоне повышенной активности всех трех изученных антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы и пероксидазы.

Таким образом, показано индуцирование ферментативной антиоксидантной системы проростков пшеницы после кратковременного теплового и осмотического закаливающих воздействий. При этом проявлялся эффект не только прямого, но и перекрестного закаливания: предварительное тепловое воздействие способствовало сохранению антиокислительного статуса проростков в условиях осмотического шока, а предварительное осмотическое закаливание стабилизировало антиоксидантную активность в проростках, подвергнутых повреждающему нагреву. Возможно, что такой эффект обусловлен повышением содержания под действием разных типов закаливания одинаковых сигнальных посредников – прежде всего АФК (Обозный и др., 2011). Увеличение содержания пероксида водорода, происходящее в тканях проростков в течение первых 10-30 мин после обоих закаливающих воздействий, может выступать в роли сигнала, индуцирующего компоненты антиоксидантной системы, в т.ч. ферменты, изученные в настоящей работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465-474.
- 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.
- Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В. Индукция теплоустойчивости coleoptилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 227-232.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 351 с.
- Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Карпец Ю.В. Супрессия эффекта теплового закаливания растений антиоксидантами и ингибиторами прооксидантных ферментов // Клеточная сигнализация у растений: III-й междунар. симпоз. – Казань, 2011. – С. 81-82.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Індукування саліциловою кислотою тепло- і солестійкості проростків *Triticum aestivum* L. у зв'язку зі змінами прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // Укр. ботан. журн. – 2006. – Т. 63, № 4. – С. 558-565.
- Кузнецов Вл.В., Хыдыров Б.Т., Роцупкин Б.В., Борисова Н.Н. Общие системы устойчивости хлопчатника к засолению и высокой температуре: факты и гипотезы // Физиология растений. – 1990. – Т. 37, № 5. – С. 987-996.
- Обозный А.И., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Ястреб Т.О. Генерация активных форм кислорода корнями проростков пшеницы при развитии перекрестной устойчивости к гипертермии и осмотическому шоку // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2011. – Вип. 2 (23). – С. 66-73.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1331-1341.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
- Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – V. 48. – P. 909-930.
- Hu Y., Ge Y., Zhang C., Ju T., Cheng W. Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxide pretreatment // Plant Growth Regul. – 2009. – V. 59. – P. 51-61.
- Mei Y., Song S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination // J. Zhejiang University. – Sci. B. – 2010. – V. 11. – № 12. – P. 965-972.
- Miller G., Mittler R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? // Ann. Bot. – 2006. – V. 98. – P. 279-288.
- Miller R., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses // Plant Cell Environ. – 2010. – V. 33. – P. 453-467.
- Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // Protoplasma. – 2001. – V. 217. – P. 125-128.
- Morita S., Kaminaka H., Masumura T., Tanaka K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress: the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling // Plant Cell Physiol. – 1999. – V. 40. – P. 417-422.
- Munir N., Aftab F. The role of polyethylene glycol (PEG) pretreatment in improving sugarcane's salt (NaCl) tolerance // Turk. J. Bot. – 2009. – V. 33. – P. 407-415.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1237-1247.
- Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. Generation of superoxide anion and localisation of Cu/Zn-superoxide dismutase in vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification // Plant Cell Physiol. – 1997. – V. 38. – P. 1118-1126.
- 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.
- Sagi M., Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // Plant Physiol. – 2006. – V. 141. – P. 336-340.
- Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2005. – V. 38. – P. 995-1014.

Поступила в редакцию
03.05.2012 г.

**DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES
UNDER THE CROSS-ADAPTATION OF WHEAT SEEDLINGS
TO HYPERTHERMIA AND OSMOTIC SHOCK**

O. I. Oboznyi, Yu. Ye. Kolupaev, M. V. Shvydenko, A. O. Vayner

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

The effects of short-time heat (1 min heating at 42°C) and osmotic (10 min immersion into 1 M sucrose solution with the further transfer to the distilled water for 20 min) influences on the activity of the antioxidative enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase) in the shoots and roots of the etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings have been investigated. The activity of SOD increased in roots no longer than in 10 min after the both types of hardening. Its activity enhanced during the next 6 h after the both types of hardening and then stabilized on the heightened level. A rapid increase of SOD activity and its stabilization on the enhanced level after 6h after heat and osmotic hardening were also fixed in shoots. The activity of catalase both in roots and sprouts increased only in 6 h after heat and in 9 h after osmotic hardening. The enhancing of the soluble peroxidase activity was fixed in an hour after the both types of hardening and lasted during the next 24 h. Under the effect of stress (damaging heating or osmotic shock) the activity of all antioxidative enzymes remained on the higher level. On the separate stages of the observations the distinctive catalase/peroxidase interchangeability was fixed. There was the increase of the activity of peroxidase when the hypoactivity of catalase took place and vice versa. It is supposed that the effect of the cross-reactive adaptation of the antioxidative system is caused by the increase of the amount of the similar signal intermediators (first of all the reactive oxygen species) in the wheat seedlings cells under the influence of different types of hardening.

Key words: *Triticum aestivum* L., hyperthermia, osmotic shock, cross adaptation, reactive oxygen species, superoxide dismutase, catalase, peroxidase

**ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ
ПРИ КРОС-АДАПТАЦІЇ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ
ДО ГІПЕРТЕРМІЇ ТА ОСМОТИЧНОГО ШОКУ**

О. І. Обозний, Ю. Є. Колупаєв, М. В. Швиденко, А. О. Вайнер

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

Досліджували вплив короткочасних загартовуючих теплової (однохвилинний прогрів за температури 42°C) і осмотичної (занурення в 1 М розчин сахарози на 10 хв з подальшим перенесенням у дистильовану воду на 20 хв) обробок на активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази – СОД, каталази і пероксидази) в коренях і пагонах етіюльованих проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.). Уже через 10 хв після обох загартовуючих впливів в коренях відбувалося підвищення активності СОД. Її активність зростала протягом 6 год після загартовуючих обробок і потім стабілізувалася на підвищеному рівні. У пагонах також відзначалося швидке підвищення активності СОД і стабілізація підвищеної активності ферменту через 6 год після теплового і осмотичного загартування. Активність каталази в коренях і пагонах підвищувалася лише через 6 год після теплового і через 9 год після осмотичного загартування. Підвищення активності розчинної пероксидази в коренях і пагонах спостерігалось через 1 год після обох загартовуючих впливів і тривало протягом 24 год. В умовах стресових впливів (ушкоджуючий прогрів або осмотичний шок) активність всіх трьох антиоксидантних ферментів в органах загартованих проростків зберігалася на вищому рівні. На окремих стадіях спостережень виявлялася своєрідна «взаємозамінність» каталази і пероксидази: при зни-

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

жених значеннях активності каталази відзначалася підвищена активність пероксидази і навпаки. Висловлено припущення, що ефект крос-адаптації антиоксидантної системи зумовлений підвищенням вмісту в клітинах проростків пшениці під дією різних типів загартування однакових сигнальних посередників – перш за все активних форм кисню.

Ключові слова: *Triticum aestivum L.*, гіпертермія, осмотичний шок, крос-адаптація, активні форми кисню, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза