

УДК 581.1

## **АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАКАЛИВАЮЩИХ И ПОВРЕЖДАЮЩИХ ТЕПЛОМ И ОСМОТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИЯХ**

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

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

Изучали влияние кратковременных тепловой (одноминутный прогрев при 42°C) и осмотической (погружение в 1 М раствор сахарозы на 10 мин с последующим переносом в дистиллированную воду на 20 мин) закаливающих обработок на активность аскорбатпероксидазы и содержание аскорбиновой кислоты в корнях и надземной части этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.). После теплового закаливающего воздействия в корнях происходило постепенное увеличение активности аскорбатпероксидазы, достигающее максимума через 24 ч, при этом в побегах активность фермента почти не изменялась. Осмотическое закаливающее воздействие вызывало небольшое снижение активности аскорбатпероксидазы в корнях и не влияло на ее величину в надземной части проростков. После повреждающих теплового и особенно осмотического воздействий активность фермента в корнях снижалась. При этом в закаленных образцах она сохранялась на более высоком уровне. После указанных повреждающих воздействий активность фермента снижалась в побегах незакаленных проростков и слабо изменялась у закаленных, при этом отмечался перекрестный положительный эффект закаливающих воздействий на активность аскорбатпероксидазы. Содержание аскорбиновой кислоты в корнях после закаливающих и повреждающих теплового и осмотического воздействий снижалось. Закаливающие обработки слабо влияли на содержание аскорбиновой кислоты в надземной части проростков, однако после повреждающих воздействий в закаленных образцах оно было более высоким. Обсуждается вклад аскорбат-зависимой составляющей антиоксидантной системы в формирование перекрестной устойчивости проростков пшеницы к гипертермии и осмотическому шоку.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., гипертермия, осмотический шок, кросс-толерантность, аскорбатпероксидаза, аскорбиновая кислота, антиоксидантная система, активные формы кислорода

Аскорбиновая кислота (аскорбат) является одним из наиболее стабильных низкомолекулярных антиоксидантов растительных клеток (Chen, Gallie, 2005). Аскорбат задействован в функционировании не только неферментативной и ферментативной составляющих антиоксидантной системы, но и в клеточной сигнализации (Foyer, Noctor, 2011). В то же время связь между содержанием аскорбата и устойчи-

востью растений к стрессорам далеко неоднозначна. Так, показано, что растения, сверхэкспрессирующие дегидроаскорбатредуктазу, были более устойчивы к озону, хлориду натрия и ПЭГ (Chen, Gallie, 2005; Eltayeb et al., 2007). В то же время растения с повышенным редокс-статусом аскорбата в замыкающих клетках отличались большей устьичной проводимостью и меньшей засухоустойчивостью (Chen, Gallie, 2004).

Аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.11) является важным компонентом ферментативной антиоксидантной системы растений. Функция этого фермента – обезвреживание пероксида

---

*Адрес для корреспонденции:* Обозный Александр Иванович, Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева, п/о «Коммунист-1», Харьков, 62483, Украина;  
e-mail: plant\_biology@mail.ru

водорода. Аскорбатпероксидаза высокоаффинна к аскорбату и локализована как в хлоропластах, так и в цитоплазме, митохондриях, пероксисомах и апопласте (Foyer, Noctor, 2009).

Имеются сведения об участии этого фермента в адаптивных реакциях растений на абиотические стрессоры. Так, в клетках суспензионной культуры из прорастающих зародышей риса в ответ на обработку агентом окислительного стресса метилвиологеном или пероксидом водорода происходило увеличение количества транскриптов цитозольной аскорбатпероксидазы (Morita et al., 1999). На растениях арабидопса показано, что тепловое закаливание вызывало активацию транскрипт-фактора HSF21, под контролем которого находится синтез аскорбатпероксидазы (Davletova et al., 2005). В ответ на гипертермию показано появление новых молекулярных форм аскорбатпероксидазы у растений пшеницы (Kumar et al., 2011). Повышение активности этого фермента зарегистрировано и при холодной акклимации пшеницы, кукурузы и растений *Parthenium argentatum* (Sundar et al., 2004; Li et al., 2011; Janmohammadi et al., 2012).

Есть основания полагать, что аскорбатпероксидаза задействована и в формировании эффекта перекрестной устойчивости к нескольким стрессорам. Так, предварительное воздействие на проростки ячменя температуры 0°C повышало в них активность аскорбатпероксидазы и других антиоксидантных ферментов при последующем действии гипертермии (35°C) (Mei, Song, 2010). В то же время работ по исследованию участия аскорбата и аскорбатпероксидазы в формировании кросс-устойчивости растений пока мало.

Ранее нами показано индуцирование активности ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы – СОД, каталазы и гваяколпероксидазы) после кратковременных тепловых и осмотических закаливающих воздействий на проростки пшеницы (Обозный и др., 2012). При этом после повреждающих воздействий в органах закаленных проростков активность указанных ферментов сохранялась на более высоком уровне, наблюдался и эффект перекрестной устойчивости. Целью настоящей работы явилось изучение участия аскорбатзависимой составляющей антиоксидантной системы в формировании тепло- и осмоустойчивости проростков пшеницы после кратковременных закаливающих обработок, а также в

развитии перекрестной устойчивости растений к двум указанным стресс-факторам.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования были этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, выращенные на очищенной водопроводной воде при температуре 20±1°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., 2012).

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., 2012). В случае с осмотическим воздействием проростки контрольного варианта на соответствующее время погружали в очищенную водопроводную воду. Как показано нами ранее, закаливающие воздействия индуцировали развитие устойчивости проростков к гипертермии и осмотическому шоку. Максимальная теплоустойчивость наблюдалась через 24 ч после теплового и осмотического закаливающих воздействий, а максимальная устойчивость к осмотическому шоку через 6 ч после таких воздействий (Обозный и др., 2012).

Для определения активности аскорбатпероксидазы навеску растительного материала гомогенизировали в охлажденной ступке с 0,06 М К<sub>2</sub>Na-фосфатного буфера (рН 7,0) с добавлением ЭДТА (0,1 мМ), дитиотриитола (1 мМ) и фенолметилсульфонилфторида (0,5 мМ). Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатант использовали для определения активности фермента. Активность аскорбатпероксидазы определяли при рН 7,0 по уменьшению светопоглощения при 290 нм в результате окисления аскорбиновой кислоты ( $E = 2,8 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nakano, Asada, 1981).

Содержание белка анализировали по методу Бредфорда, используя в качестве стандар-

та бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976).

Содержание аскорбиновой кислоты в корнях и побегах проростков определяли с использованием гексацианоферрата калия (Сибгатуллина и др., 2011). Навеску растительного материала массой 0,3 г растирали в 3 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 3,7) и центрифугировали 10 мин при 8000 g. Супернатант использовали для измерений. В реакционные пробирки вносили 1 мл 8% HCl, 1 мл супернатанта (буфера – в качестве контроля), 0,5 мл 1% раствора  $K_3[Fe(CN)_6]$ , через 4 мин добавляли 0,5 мл 2% раствора NaF, через 1 мин – 1 мл 2% раствора  $FeCl_3$ . Пробы выдерживали 6 мин, после чего добавляли 2 мл дистиллированной воды и проводили измерение оптической плотности относительно контрольного раствора (реакционная смесь с буфером вместо экстракта) при 680 нм. Концентрацию аскорбиновой кислоты определяли по калибровочному графику, построенному с использованием стандартной L-аскорбиновой кислоты.

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

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### *Динамика активности аскорбатпероксидазы*

*Корни.* Активность аскорбатпероксидазы в корнях проростков контрольного варианта за время наблюдений существенно не изменялась (рис 1, I, А). Уже через 3 ч после повреждающего осмотического воздействия наблюдалось существенное снижение активности фермента, которое усиливалось в последующие часы наблюдений. Повреждающий прогрев проростков также вызывал уменьшение активности аскорбатпероксидазы, однако его эффект был не столь резким.

Закаливающее тепловое воздействие вызывало постепенное увеличение активности аскорбатпероксидазы, максимум которого наблюдался к 24 ч (рис 1, I, Б). В течение последующих суток наблюдений активность фермента в корнях проростков, закаленных действием повышенной температуры, постепенно снижалась и через 48 ч от начала наблюдений приближалась к значениям контрольного варианта.

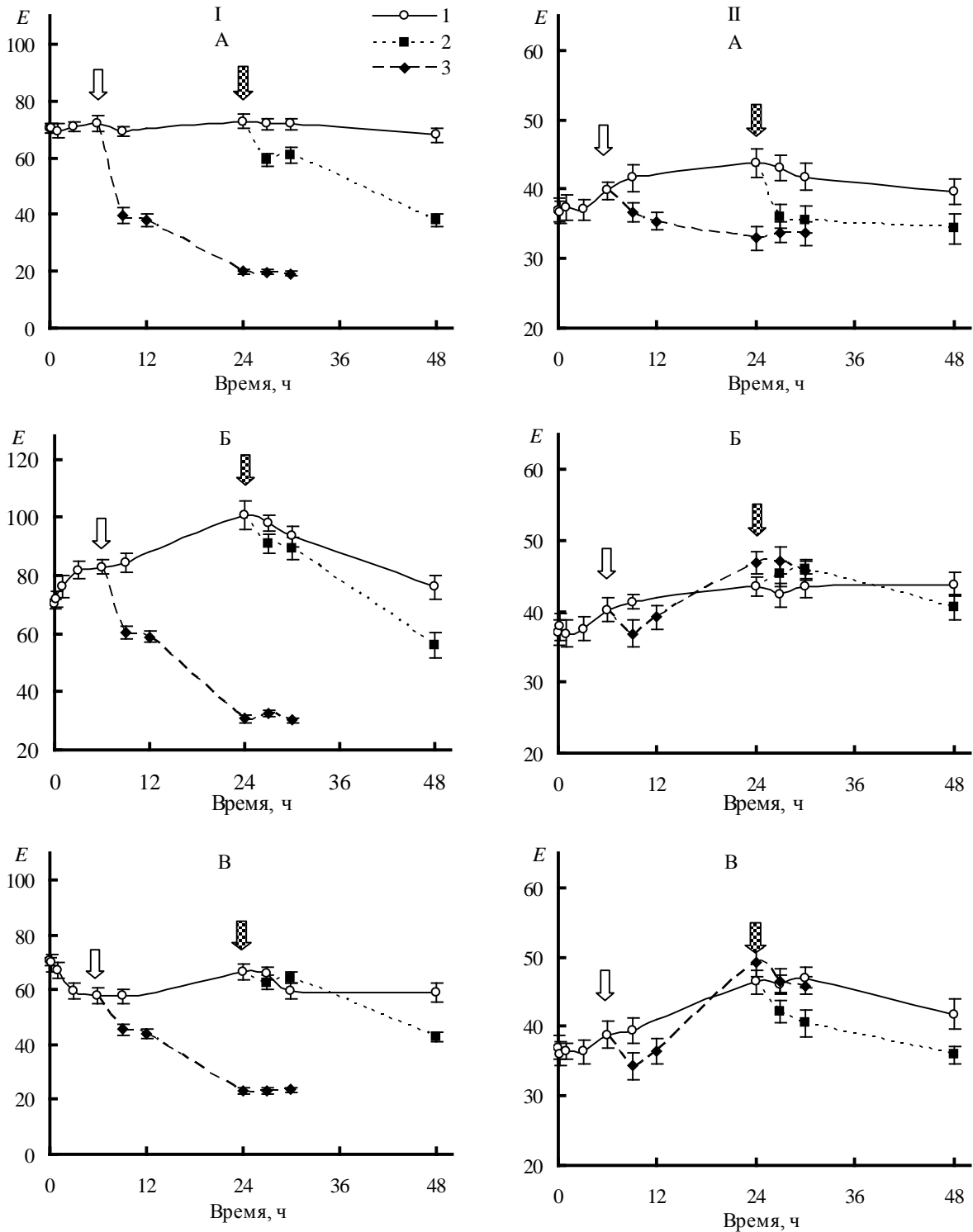
Повреждающее осмотическое воздействие вызывало заметное снижение активности аскорбатпероксидазы в корнях проростков, закаленных действием гипертермии, хотя абсолютные значения активности в этом варианте опыта превышали соответствующие величины, наблюдавшиеся в корнях незакаленных проростков, подвергнутых осмотическому шоку. Повреждающий прогрев проростков, закаленных предварительным тепловым воздействием, также вызывал снижение активности аскорбатпероксидазы в корнях. При этом, однако, на всех точках наблюдений активность фермента в корнях предварительно закаленных проростков была выше, чем у незакаленных и также поврежденных повреждающему прогреву.

В отличие от теплового закаливающего воздействия, осмотическое вызывало небольшое снижение активности аскорбатпероксидазы в корнях (рис 1, I, В). После осмотического шока в корнях проростков, испытавших предварительное закаливающее воздействие, активность фермента уменьшалась, хотя не так резко, как в корнях незакаленных проростков. Через 3-6 ч после повреждающего прогрева активность аскорбатпероксидазы в корнях проростков, закаленных осмотическим воздействием, существенно не изменялась, а к 24 ч снижалась. При этом абсолютные значения активности фермента на всех фазах наблюдений немного превышали соответствующие величины в корнях незакаленных проростков, подвергнутых повреждающему прогреву ( $p \leq 0,1$ ).

*Побеги.* В побегах проростков контрольного варианта активность аскорбатпероксидазы в период наблюдений изменялась незначительно, приблизительно к 24 ч отмечалась тенденция к небольшому ее увеличению (рис. 1, II, А). Под влиянием осмотического шока активность фермента в побегах немного снижалась, такой же эффект наблюдался и после повреждающего прогрева.

Закаливающий прогрев не влиял на активность аскорбатпероксидазы в побегах проростков пшеницы (рис. 1, II, Б). В первые часы после повреждающего осмотического воздействия активность фермента в побегах проростков, предварительно подвергнутых закаливающему прогреву, существенно не изменялась, а затем (24-27 ч наблюдений) даже немного увеличивалась. При этом абсолютные величины активности фермента существенно превышали соответствующие значения, характерные для незакаленных, но подвергнутых осмотическому

**ОБОЗНЫЙ и др.**



**Рис 1. Активность аскорбатпероксидазы ( $E$ , мкмоль аскорбата/(мг белка • мин)) в корнях (I) и побегах (II) проростков пшеницы.**

Здесь и на рис. 2: 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 нанесения осмотического повреждающего воздействия, заштрихованной – момент повреждающего прогрева.

## АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ

шоку контрольных проростков. Тепловое повреждающее воздействие на проростки, закаленные предварительным действием гипертермии, вызывало в них небольшое повышение активности аскорбатпероксидазы. И в этом случае абсолютные величины активности фермента были значительно выше, чем в побегах незакаленных, но подвергнутых повреждающему прогреву проростков.

Закаливающее осмотическое воздействие незначительно влияло на активность аскорбатпероксидазы в побегах, хотя через 24 ч после такой обработки отмечалось небольшое увеличение активности этого фермента (рис. 1, II, В). После повреждающего осмотического воздействия активность в побегах фермента сначала немного уменьшалась, а затем увеличивалась и при этом существенно превышала величины, наблюдавшиеся в побегах незакаленных, но подвергнутых осмотическому шоку проростков (сравнить с рис. 1, II, А). После повреждающего прогрева активность аскорбатпероксидазы в побегах проростков, закаленных осмотическим воздействием, немного снижалась, но была выше, чем в органах незакаленных проростков, подвергнутых повреждающему прогреву.

Таким образом, закаливающие тепловое и осмотическое воздействия почти не изменяли активность аскорбатпероксидазы в побегах, но при этом по разному влияли на активность фермента в корнях проростков пшеницы: тепловое закаливание повышало, а осмотическое закаливающее воздействие снижало активность энзима. В то же время оба закаливающих воздействия способствовали сохранению активности фермента в корнях и побегах после повреждающих теплового и осмотического воздействий. Эффект осмотической и тепловой закаливающих обработок на этот показатель был перекрестным.

### *Динамика содержания аскорбиновой кислоты.*

*Корни.* Содержание аскорбиновой кислоты в корнях контрольных проростков за период наблюдений существенно не изменялось (рис. 2, I, А). Повреждающее осмотическое воздействие вызывало резкое снижение содержания аскорбиновой кислоты в корнях проростков, хотя через 18 ч после такого воздействия (24 ч наблюдений) содержание аскорбата увеличивалось. Повреждающий прогрев вызывал уменьшение содержания аскорбиновой кислоты в корнях проростков контрольного варианта.

После теплового закаливающего воздействия на проростки отмечалось небольшое снижение содержания аскорбата в корнях (рис. 2, I, Б). Последующее осмотическое повреждающее воздействие вызывало резкое уменьшение количества этого антиоксиданта в корнях. После повреждающего прогрева в корнях закаленных проростков отмечалось сначала повышение содержания аскорбиновой кислоты, а затем снижение.

Закаливающее осмотическое воздействие вызывало уменьшение содержания аскорбиновой кислоты в корнях, хотя через 48 ч оно практически возвращалось к исходным величинам (рис. 2, I, В). Последующие осмотическое и тепловое повреждающие воздействия приводили к дополнительному снижению содержания аскорбата.

*Побеги.* В течение 48 ч наблюдений отмечалось постепенное уменьшение содержания аскорбиновой кислоты в побегах незакаленных проростков (рис. 2, II, А), что может быть связано с их возрастными изменениями. Через 18 ч после повреждающего осмотического воздействия (24 ч наблюдений) отмечалось некоторое повышение количества аскорбата в корнях. После повреждающего прогрева также происходило небольшое увеличение содержания аскорбиновой кислоты в побегах относительно соответствующего контроля.

Тепловое закаливание не вызывало существенных изменений содержания аскорбиновой кислоты в надземной части проростков (рис. 2, II, Б). Повреждающее осмотическое воздействие на проростки, закаленные умеренным действием гипертермии, не приводило к заметному изменению содержания аскорбата. После повреждающего прогрева в побегах закаленных проростков отмечалась тенденция к некоторому повышению содержания аскорбиновой кислоты. При этом абсолютные величины этого показателя немного превышали значения, которые наблюдались в побегах незакаленных, но подвергнутых повреждающему прогреву проростков.

Осмотическое закаливающее воздействие, как и тепловое, слабо влияло на содержание аскорбиновой кислоты в побегах проростков пшеницы (рис. 2, II, В). После осмотического повреждающего воздействия на проростки этого варианта содержание аскорбата в них также существенно не изменялось, хотя абсолютные его значения несколько превышали соответствующие величины в побегах незакаленных проростков,

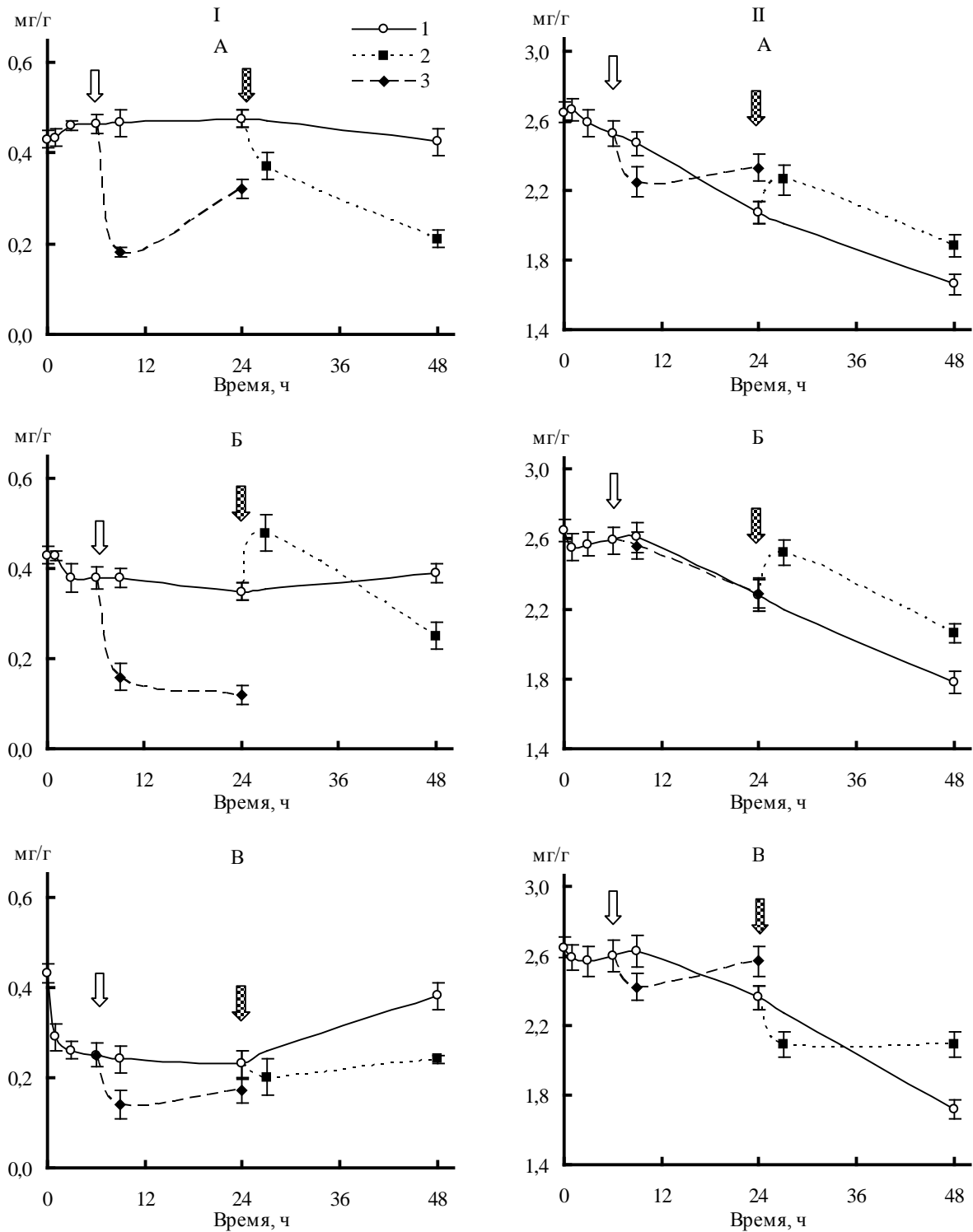


Рис. 2. Содержание аскорбиновой кислоты (мг/г сухого вещества) в корнях (I) и побегах (II) проростков пшеницы.

подвергнутых осмотическому шоку. После повреждающего прогрева содержание аскорбиновой кислоты в побегах проростков, закаленных осмотическим воздействием, существенно не изменялась.

Таким образом, в побегах проростков пшеницы содержание аскорбиновой кислоты после закаливающих теплового и осмотического воздействий в целом изменялось несущественно. Не проявлялось больших изменений

этого показателя и после повреждающих воздействий. В то же время в корнях имело место снижение содержания аскорбата как после закаливающих, так и после повреждающих теплового и осмотического воздействий.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Как было установлено ранее, тепловое и осмотическое закаливающие воздействия на проростки пшеницы вызывали повышение их перекрестной устойчивости к повреждающим воздействиям (Обозный и др., 2012). При этом и в корнях, и в побегах проростков после обоих закаливающих воздействий проявлялось увеличение активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы и гваяколпероксидазы. Характер изменения активности аскорбатпероксидазы в ответ на закаливающие воздействия был не столь однозначным. Так, активность аскорбатпероксидазы в корнях увеличивалась только после теплового закаливания, осмотическое закаливающее воздействие, наоборот, вызывало некоторое снижение активности этого фермента (рис. 1, I). После обоих типов стрессовых воздействий (теплового и осмотического) активность аскорбатпероксидазы в корнях снижалась, при этом в корнях закаленных проростков абсолютные значения активности сохранялись на более высоком уровне. Положительное влияние теплового закаливания на величины активности фермента после повреждающих воздействий было более существенным, чем осмотического.

Снижение активности аскорбатпероксидазы в корнях проростков, подвергнутых теплового и осмотическому повреждающим воздействиям, указывает на меньшую устойчивость этих органов к стрессорам. И действительно, в наших экспериментах, после закаливающего осмотического воздействия визуально отмечалось замедление роста корней (количественный учет не проводили), а после повреждающих воздействий (как осмотического, так и теплового) наблюдалась гибель корней у части проростков. В то же время многие проростки с поврежденной корневой системой в условиях эксперимента сохраняли жизнеспособность, к моменту оценки выживания у некоторых из них отмечалось появление новых корней, что позволяло относить их к категории живых (Обозный, Колупаев, 2012).

Возможно, что в корнях закаленных проростков пшеницы в условиях действия стрессоров основную функцию по детоксикации пероксида

водорода выполняла гваяколпероксидаза, а не аскорбатпероксидаза. В побегах закаленных проростков после повреждающих теплового и осмотического воздействий активность аскорбатпероксидазы сохранялась на достаточно высоком уровне (рис. 1, II). Высокой была в надземной части проростков и активность других антиоксидантных ферментов (Обозный и др., 2012), что позволяет говорить о большей устойчивости антиоксидантной системы побегов.

Следует отметить, что другими авторами при действии стрессоров также обнаружен ряд различий в изменениях активности отдельных ферментов, обезвреживающих пероксид водорода. Так, у гибридов *Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum* при холодном закаливании отмечалось повышение активности неспецифической пероксидазы и аскорбатпероксидазы и сильное снижение активности каталазы (Paciecha et al., 2007). У растений риса при солевом стрессе показано повышение активности аскорбатпероксидазы при снижении активности каталазы (Nguyen et al., 2004). В то же время у растений ячменя при солевом стрессе повышалась активность как аскорбатпероксидазы, так и каталазы, а при осмотическом (создаваемом действием ПЭГ) увеличивалась только активность каталазы (Kim et al., 2004). Таким образом, можно говорить об определенной взаимозаменяемости антиоксидантных ферментов и различиях их вклада в защиту от окислительных повреждений в зависимости от природы стрессоров.

В антиоксидантной защите значительная роль принадлежит низкомолекулярным соединениям, в частности аскорбиновой кислоте, которая может нейтрализовать пероксид водорода непосредственно и в реакции, катализируемой аскорбатпероксидазой, а также участвовать в обезвреживании радикальных АФК. Содержание аскорбиновой кислоты в побегах в условиях наших экспериментов после закаливания и действия стрессоров оставалось достаточно стабильным. В то же время как закаливающие, так и стрессовые воздействия вызывали уменьшение содержания аскорбиновой кислоты в корнях (рис. 2, I). Снижение содержания этого антиоксиданта после теплового закаливания происходило на фоне повышения активности аскорбатпероксидазы (рис. 2, I, A) и могло быть связано с активным использованием аскорбата как субстрата в реакции, катализируемой этим ферментом. Однако при осмотическом закаливании уменьшение содержания аскорбиновой кислоты сопровождалось снижением активности аскорбатпероксидазы. Возможно, в этих условиях аскорбат

активно использовался как антиоксидант в ферментативных процессах, но при этом угнеталась система его восстановления. Следует отметить, что снижение содержания аскорбата при засухе и действии солевого стресса показано и у других видов растений (Fidalgo et al., 2004; Uradhyaya, Panda, 2004). Нельзя исключить, что, по крайней мере частично, снижение содержания аскорбата в корнях в наших экспериментах обусловлено методическими причинами – прогревом проростков в водном термостате и погружением их в воду после действия осмотика при создании осмотического шока, что могло приводить к вымыванию части пула аскорбиновой кислоты из клеток корней. Повышение проницаемости мембран, происходящее при стрессах различной природы, могло усиливать выход низкомолекулярных соединений, в т.ч. аскорбата.

В целом можно полагать, что аскорбат-зависимая составляющая антиоксидантной системы задействована в адаптивных реакциях проростков пшеницы на гипертермию и обезвоживание. Однако ее вклад в адаптацию к указанным факторам, по-видимому, меньший по сравнению с изученными ранее другими ферментативными (Обозный и др., 2012) и, возможно, неферментативными антиоксидантами. При этом, вероятно, участие аскорбат-зависимой системы в адаптации растений к высоким температурам более существенно по сравнению с его участием в приспособлении к обезвоживанию.

## ЛИТЕРАТУРА

- Обозный А.И., Колупаев Ю.Е. Участие ферментативных систем, генерирующих активные формы кислорода, в развитии перекрестной устойчивости проростков пшеницы к гипертермии и осмотическому шоку // Физиология и биохимия культур растений. – 2012. – Т. 44, № 4. – С. 347-354.
- Обозный А.И., Колупаев Ю.Е., Швиденко Н.В., Вайнер А.А. Динамика активности антиоксидантных ферментов при кросс-адаптации проростков пшеницы к гипертермии и осмотическому шоку // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2012. – Вип. 2 (26). – С. 71-84.
- Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Костюкова Ю.А., Никонова Н.А., Румянцева Н.И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие. – Казань, 2011. – 61 с.
- 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.
- Chen Z., Gallie D.R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement // Plant Cell. – 2004. – V. 16. – P.1143-1162.
- Chen Z., Gallie D.R. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance // Plant Physiol. – 2005. – V. 138. – P.1673-1689.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shualaev V., Schlauch K., Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis // Plant Cell. – 2005. – V. 17. – P. 268-281.
- Eltayeb A.E., Kawano N., Badawi G.H., Kaminaka H., Sanekata T., Shibahara T., Inanaga S., Tanaka K. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses // Planta. – 2007. – V. 225. – P. 1255-1264.
- Fidalgo F., Santos A., Santos I., Salema R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants // Ann. Appl. Biol. – 2004. – V. 145. – P. 185-192.
- Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // Antioxid. Redox Signal. – 2009. – V. 11. – P. 861-906.
- Foyer C.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub // Plant Physiol. – 2011. – V. 155. – P. 2-18.
- Janmohammadi M., Enayati V., Sabaghnia N. Impact of cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation on carbohydrate content and antioxidant enzyme activities in spring and winter wheat // Icel. Agric. Sci. – 2012. – V. 25. – P. 3-11.
- Kim D.W., Shim I.S., Usui K. Differential responses of barley to drought and salt stress: Changes in antioxidative enzyme activities and free amino acids // Nippon Shokubutsu Seiri Gakkai Nenkai oyobi Shinpojiumu Koen Yoshishu. – 2004. – V. 45. – P. 307.
- Kumar R. R., Goswami S., Kumar N., Pandey S. K., Pandey V. C., Sharma S. K., Pathak H., Rai R.D. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress // Int. J. Plant Physiol. Biochem. – 2011. – V. 3 (11). – P. 188-194.
- Li H.-Y., Li C.-G. Short-term cold-shock at 1°C induced chilling tolerance in maize seedlings // International Conference on Biology, Environment and Chemistry



## АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ

- IPCBE. – Singapore: IACSIT Press. 2011. – V. 1. – P. 346-349.
- 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.
- 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.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. – 1981. – V. 22, № 5. – P. 867-880.
- Piciecha E., Plazek A., Zwierzykowski Z. Impact of cold-induced antioxidant activity on frost resistance in androgenic *Festulolium* genotypes // J. Appl. Bot. Food Qual. – 2007. – V. 81, № 2. – P. 126-131.
- Sundar D., Chaitanya K.V., Jutur P.P., Ramachandra R.A. Low temperature-induced changes in antioxidative metabolism in rubber-producing shrub, guayule (*Parthenium argentatum* Gray) // Plant Growth Regul. – 2004. – V. 44. – P. 175-181.
- Upadhyaya H., Panda S.K. Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration // Biol. Plant. – 2004. – V. 48. – P. 597-600.

Поступила в редакцию  
10.10.2012 г.

## ASCORBATE PEROXIDASE ACTIVITY AND ASCORBIC ACID CONTENT IN WHEAT SEEDLINGS AT HARDENING AND DAMAGING HEAT AND OSMOTIC INFLUENCES

O. I. Oboznyi, M. V. Shvidenko, G. A. Lugova, Yu. E. Kolupaev

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

The influences of short-term heat (one-minute heating at 42°C) and osmotic (immersion in 1 M sucrose solution for 10 min and then transfer to distilled water for 20 min) hardening treatments on the ascorbate peroxidase activity and ascorbic acid content in the roots and shoots of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) plantlets have been studied. After heat hardening influence in the roots the gradual increase in the ascorbate peroxidase activity had place, reaching a peak after 24 hours, while in the shoots the enzyme activity remained almost unchanged. The osmotic hardening influence causes the slight decrease in the ascorbate peroxidase activity in the roots and does not affect its value in the shoots of seedlings. After damaging heat and, especially, osmotic action the enzyme activity in the roots was reduced. At the same time in the hardened samples it was maintained at the higher level. After the referred above damaging influences the enzyme activity was reduced in the shoots of unhardened seedlings and little changed in hardened, besides the cross-positive effect of hardening influences on the ascorbate peroxidase activity was observed. Ascorbic acid content decreased in roots after hardening and damaging heat and osmotic influences. Hardening treatment has little effect on the content of ascorbic acid in the above-ground parts of seedlings, but after the damaging influences it was higher in the hardened samples. The contribution of the ascorbate-dependent component of the antioxidant system in the formation of cross-resistance of wheat seedlings to hyperthermia and osmotic shock is discussed.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., hyperthermia, osmotic shock, cross-tolerance, ascorbate, ascorbic acid, antioxidant system, reactive oxygen species

**АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ І ВМІСТ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ  
В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦІ ПРИ ЗАГАРТОВУЮЧИХ І УШКОДЖУЮЧИХ  
ТЕПЛОВОМУ І ОСМОТИЧНОМУ ВПЛИВАХ**

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

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

Вивчали вплив короткочасних теплової (однохвилинний прогрів при 42°C) і осмотичної (занурення в 1 М розчин сахарози на 10 хв з подальшим перенесенням в дистильовану воду на 20 хв) загартовуючих обробок на активність аскорбатпероксидази і вміст аскорбінової кислоти в коренях і надземній частині етіолованих проростків пшениці (*Triticum aestivum* L.). Після теплового загартовуючого впливу в коренях відбувалося поступове збільшення активності аскорбатпероксидази з максимумом через 24 год, при цьому у пагонах активність ферменту майже не змінювалася. Осмотична загартовуюча дія викликала невелике зниження активності аскорбатпероксидази в коренях і не впливала на її величину в надземній частині проростків. Після ушкоджуючих теплового і особливо осмотичного впливів активність ферменту в коренях знижувалася. При цьому в загартованих зразках вона зберігалася на вищому рівні. Після вказаних ушкоджуючих впливів активність ферменту знижувалася у пагонах незагартованих проростків і слабо змінювалася у загартованих, при цьому виявлявся перехресний позитивний ефект загартовуючих обробок на активність аскорбатпероксидази. Вміст аскорбінової кислоти в коренях після загартовуючих і ушкоджуючих теплової і осмотичної обробок знижувався. Загартовуючі обробки слабо впливали на вміст аскорбінової кислоти в надземній частині проростків, проте після ушкоджуючих впливів в загартованих зразках він був вищим. Обговорюється внесок аскорбат-залежної складової антиоксидантної системи у формування перехресної стійкості проростків пшениці до гіпертермії і осмотичного шоку.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum* L., гіпертермія, осмотичний шок, крос-толерантність, аскорбатпероксидаза, аскорбінова кислота, антиоксидантна система, активні форми кисню