

УДК 577.25:58

## АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ В УМОВАХ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ

Р.Ю. ПИРІЖОК, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
58012 Чернівці, вул. Коцюбинського, 2

Досліджували вплив теплового стресу на активність пероксидази у проростках кукурудзи. Встановлено, що максимальне її підвищення спостерігається в умовах жорсткого теплового стресу (44 °С), тоді як в умовах помірного теплового стресу (37 °С) ефект був менш виражений. Зростання загальної активності пероксидази корелює зі змінами інтенсивності електрофоретичних смуг кількох ізоферментів. Отримані дані вказують на залучення пероксидази до відповіді на тепловий стрес.

*Ключові слова:* *Zea mays* L., пероксидаза, тепловий стрес.

Активні форми кисню (АФК) постійно генеруються у хлоропластах, мітохондріях, мікросомах та плазматичній мембрані рослинної клітини за нормальних умов, проте їх рівень істотно зростає за стресових впливів [16, 20, 23]. Це пов'язано з порушенням перенесення електронів у електронтранспортних ланцюгах хлоропластів і мітохондрій [9, 18, 26]. Зокрема, тепловий стрес призводить до зростання внутрішньоклітинного рівня пероксиду водню, який здатний пошкоджувати макромолекули та ліпіди, але водночас є сигнальною молекулою в активації стресової відповіді клітини [13, 26, 29]. Рівень АФК у клітині контролюється антиоксидантними системами, які включають низькомолекулярні антиоксиданти й антиоксидантні ферменти [17]. Зокрема, у розщепленні пероксиду водню беруть участь каталази, аскорбатпероксидази (АРХ) і пероксидази класу III (РОД), або так звані «класичні» пероксидази рослин [15, 17, 24, 27].

У наших попередніх дослідженнях було доведено активацію аскорбатпероксидазної системи за умов теплового стресу [22, 29], проте роль РОД у відповіді рослин на тепловий стрес все ще залишається нез'ясованою. Ця група пероксидаз кодується великою кількістю генів, яка становить щонайменше 73 гени в *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. та 138 генів у *Oryza sativa* L., продукти експресії яких виявлено в цитозолі, вакуолях, апопласті, клітинній стінці [27]. Також численні гени РОД знайдено в *Glycine max* (L.) Merr. та *Solanum tuberosum* L. [14]. РОД каталізують двоелектронне відновлення  $H_2O_2$ , використовуючи як донор електронів різноманітні сполуки [1, 17]. Вони задіяні у метаболізмі ауксинів, окисно-відновних процесах на плазматичних мембранах, модифікації клітинних стінок (лігніфікації й суберинізації) [6, 14, 15, 27]. Ізопероксидази специфічно експресуються в різних тканинах та органах рослин; їх екс-

пресія змінюється в онтогенезі [19]. Активність і характер експресії окремих POD змінюються у злаків за дії низьких температур [2, 3, 7, 8], за адаптації винограду до умов перезимівлі [5], а також у *Olea* sp. в умовах водного стресу [25].

Метою нашої роботи було з'ясування участі пероксидаз у реакції проростків кукурудзи (*Zea mays* L.) на тепловий стрес.

### Методика

Об'єктом досліджень були проростки *Zea mays* L. гібрида Молдавський 450. Насіння пророщували у термостаті протягом 72 год за 25 °С. Потім проростки висаджували в перліт і переносили в кліматичну камеру, де вирощували за 22 °С, відносної вологості повітря 60–70 % в умовах 16-годинного світлового дня.

Рослини на стадії одного листка піддавали тепловому стресу. Стрес проводили в інкубаційному буфері, що містив 1 мМ К-фосфатний буфер (рН 6,0) та 1 %-ну цукрозу [22]. Обробку здійснювали у темряві протягом 2 і 4 год за 22, 37 або 44 °С. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазу післястресової репарації, через 2 год після початку стресової обробки зразки переносили в камеру, де підтримувалась кімнатна температура, і продовжували інкубацію ще 2 год.

Для екстракції білків використовували буфер, що містив 50 мМ Na-фосфатний буфер (рН 7,0), 10 %-й гліцерол, 1 мМ аскорбінову кислоту. До 200 мкл охолодженого буфера додавали 100 мг заморожених листків, центрифугували 10 хв за 15 000 g та температури +4 °С, відбирали надосадову рідину і зберігали на льоду до визначення активності POD. При зберіганні на льоду активність ферменту не змінювалась протягом щонайменше 2 год.

Загальну активність POD визначали спектрофотометрично вимірюванням зміни оптичної густини проби за  $\lambda=440$  нм. Реакційна проба складалася з 25 мкл білкового екстракту та 1 мл реакційного буферу, що містив 50 мМ К, Na-фосфатний буфер (рН 5,4), 5 мМ бензидин, 0,2 %-й  $H_2O_2$ . Оптимальне значення рН було встановлене у попередніх експериментах. Активність ферменту виражали як зміну оптичної густини на 1 мг білка в пробі за 1 хв. Кількість білка у надосадовій рідині визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [12]. Отримані результати оброблено статистично [4].

Ізоферментні спектри POD визначали методом електрофорезу в нативних умовах у 10 %-му ПААГ [5]. В одну лунку гелю вносили 10–12 мкг білка. Для виявлення ізоформ POD гель інкубували в охолодженому 5 мМ розчині бензидину в Na-ацетатному буфері (рН 5,4) протягом 10 хв, промивали дистильованою водою і витримували в 0,02 %-му розчині  $H_2O_2$  до появи синього забарвлення.

### Результати та обговорення

**Активність POD за дії температурного стресу.** Інкубація рослин кукурудзи в умовах жорсткого теплового стресу (44 °С) протягом 2 год призводила до зростання активності POD приблизно на 60 % порівняно з контрольними рослинами, які інкубували за кімнатної температури (рис. 1). Вірогідне збільшення активності POD спостерігалось і через 4 год, проте воно становило лише 24 % порівняно з контролем. Це мож-

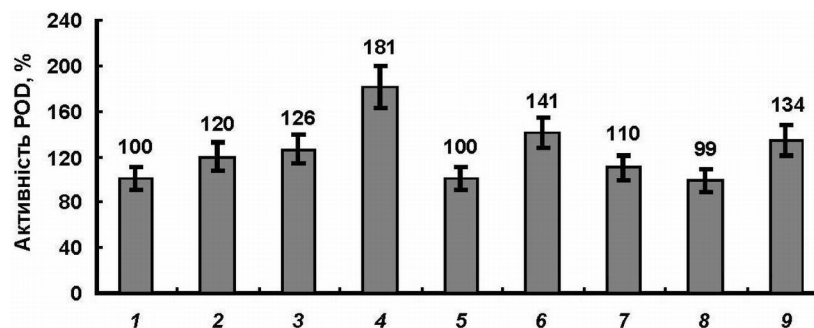


Рис. 1. Активність пероксидази проростків кукурудзи (*Zea mays* L.) за дії теплового стресу: 1 — інтактні рослини; 2 — 2 год 22 °C; 3 — 2 год 37 °C; 4 — 2 год 44 °C; 5 — 2 год 37 °C + 2 год 22 °C; 6 — 2 год 44 °C + 2 год 22 °C; 7 — 4 год 22 °C; 8 — 4 год 37 °C; 9 — 4 год 44 °C

на пояснити частковою температурною денатурацією ферменту і зниженням його активності в умовах тривалої стресової обробки. Відносне зниження активності POD спостерігали і в постстресову фазу, тобто після перенесення рослин, які інкубували за 44 °C, у камеру з кімнатною температурою. Отже, збільшення активності POD за дії жорсткого температурного стресу має тимчасовий характер.

Інкубація рослин кукурудзи за 37 °C приводила до зростання активності POD на 6 % через 2 год та її зниження на 11 % через 4 год порівняно з відповідними контролями. Отже, на відміну від рослин, які зазнавали нагрівання до 44 °C, помірний тепловий стрес не викликав істотних змін активності POD.

Слід також зазначити, що в контрольних рослин кукурудзи, які інкубували в буфері за кімнатної температури, мало місце вірогідне підвищення активності POD порівняно з інтактними рослинами — на 20 та на 11 % відповідно після 2- і 4-годинної експозиції (див. рис. 1). Цей факт може бути пов'язаний зі змінами фізіологічного стану внаслідок перенесення рослин у темряву та їх механічного травмування під час занурення в буфер. Виявлено, що в тютюну транскрипти деяких POD швидко і систематично акумулюються після травмування [15]. Крім цього, інкубація в буферному розчині може викликати помірну гіпоксію, яка, у свою чергу, супроводжується зростанням продукції АФК [11, 28].

**Вивчення ізоферментного спектра POD.** Застосування електрофорезу в нативному гелі з подальшим гістохімічним визначенням активності POD дало змогу виявити 18 ізоформ POD (рис. 2). Відомо, що POD представлена у клітині кислими, нейтральними і лужними ізоформами. За допомогою застосованої гелевої системи ми розділили кислі й нейтральні ізоформи POD, які мігрують до анода, тоді як лужні ізоформи мають рухатись до катода, тобто не входять у гель.

Порівняння отриманих наборів смуг показало, що у рослин, інкубованих за 44 °C, інтенсивність кількох смуг середньої і малої рухливості зростає. Інкубація за 37 °C та за кімнатної температури призводить до ослаблення інтенсивності кількох смуг порівняно з інтактними рослинами. Загалом отримана картина підтверджує дані з визначення загальної активності POD, де максимальний ефект також спостерігався за дії жорсткого стресу.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що помірний тепловий стрес за 37 °C не змінює загальну активність APX у *A. thaliana*.

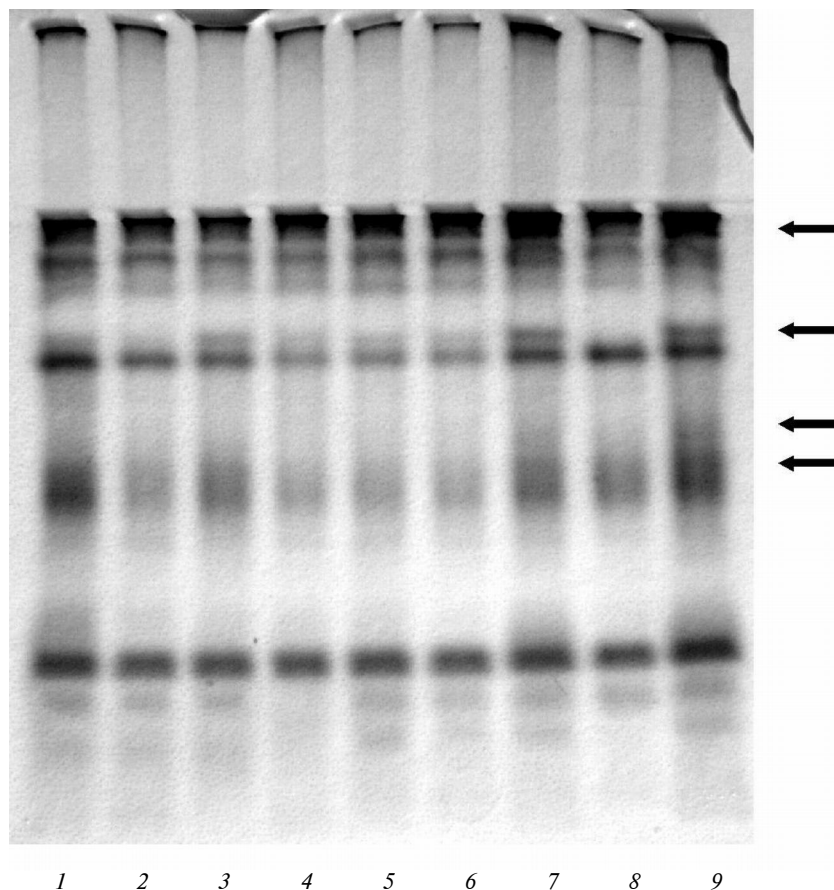


Рис. 2. Ізоферментні спектри пероксидази проростків кукурудзи:

1 — інтактні рослини; 2 — 2 год 22 °С; 3 — 4 год 22 °С; 4 — 2 год 37 °С; 5 — 2 год 44 °С + 2 год 20 °С; 6 — 4 год 37 °С; 7 — 2 год 44 °С; 8 — 2 год 37 °С + 2 год 20 °С; 9 — 4 год 44 °С. Смуги, інтенсивність яких за дії жорсткого теплового стресу збільшується, вказано стрілками

Проте це досягається внаслідок індукції термостабільної ізоформи APX<sup>S</sup> на фоні поступової інактивації термолабільної APX<sup>1</sup> [22]. На відміну від 37 °С за 44 °С APX майже повністю інактивується. Отже, можна припустити, що активація POD за умов жорсткого теплового стресу може компенсувати втрату активності APX.

Індукція реакції клітини за теплового стресу регулюється на транскрипційному рівні за участю транскрипційних факторів із групи HSF (heat shock transcription factors). Зокрема, у наших дослідженнях доведено, що експресія гена *Arx2* у *A. thaliana* є термо- й HSF-залежною [22]. Температурний оптимум стресової відповіді становить близько 37 °С, тоді як за жорсткого теплового стресу за 44 °С гени білків теплового шоку взагалі не транскрибуються [21, 30]. Це пов'язано з порушенням зв'язування HSF із відповідними сигнальними групами у промоторах цих генів [29]. Отже, в активації POD за 44 °С має бути задіяний інший механізм, можливо регуляція на транскрипційному рівні за участю інших транскрипційних факторів. Альтернативно зростання активності POD може бути пов'язане з посттранскрипційними механізмами. Остаточне з'ясування цього питання потребує додаткових досліджень.

1. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. — 2006. — **46**. — С. 303—322.
2. Капустян А.В., Кучеренко В.П., Панюта О.О. Мусієнко М.М. Активність пероксидази та зміна її ізоферментних форм за умов низькотемпературного стресу // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — **36**, № 1. — С. 55—63.
3. Кучеренко В.П., Капустян А.В. Фермент пероксидаза і зимостійкість рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 116 с.
4. Лакін Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Негру П.В., Медведева Т.Н. Электрофоретические спектры легкорастворимых белков, пероксидазы и *o*-дифенолоксидазы в связи с зимостойкостью винограда // Физиология и биохимия культ. растений. — 1990. — **22**, № 5. — С. 469—475.
6. Савич И.М. Пероксидазы — стрессовые белки растений // Успехи соврем. биологии. — 1989. — **107**, № 3. — С. 406—417.
7. Савич И.М., Тажигаева Л.Т., Перуанский Ю.В. Удельная активность изопероксидаз проростков кукурузы и пшеницы в условиях температурного стресса // Физиология и биохимия культ. растений. — 1988. — **20**, № 2. — С. 128—133.
8. Файзуллин А.Д., Лукманова Р.С. Изменение изоферментного состава пероксидазы в узлах кушения озимой ржи в период осеннего закаливания и перезимовки // Там же. — 1987. — **19**, № 5. — С. 444—448.
9. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. — 2004. — **55**. — P. 373—399.
10. Asada K., Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis // Photoinhibition / D.J. Kyle, C.B. Osmond, C.J. Arntzen (eds). — Amsterdam: Elsevier, 1987. — P. 227—287.
11. Blokhina O., Chirkova T., Fagerstedt K. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells // J. Exp. Bot. — 2001. — **52**, N 359. — P. 1179—1190.
12. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analyt. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
13. Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of the motolerance in mustard seedlings // Plant Physiol. — 1998. — **118**. — P. 1455—1461.
14. Delannoy E., Marmey P., Jalloul A. et al. Molecular analysis of class III peroxidases from cotton // J. Cotton Sci. — 2006. — **10**, N 1. — P. 53—60.
15. Hiraga S., Sasaki K., Ito H. et al. A large family of class III plant peroxidases // Plant Cell Physiol. — 2001. — **42**, N 5. — P. 462—468.
16. Karpinski S., Reynolds B., Karpinska B. et al. The role of hydrogen peroxide and antioxidants in systemic acclimation to photooxidative stress in *Arabidopsis* // Plant Responses to Environmental Stress / M.F. Smallwood, C.M. Calvert, D.J. Bowles (eds.) — Oxford: Bios Sci. Publ., 1999. — P. 25—32.
17. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. — 2004. — **9**, N 10. — P. 490—498.
18. Moller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — **52**. — P. 561—591.
19. Nair A.R., Showalter A.M. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots // Biochem. Biophys. Res. Comm. — 1996. — **226**. — P. 254—260.
20. O’Kane D., Gill V., Boyd P., Burdon R. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus // Planta. — 1996. — **198**. — P. 371—377.
21. Panchuk I., Pyrizhok R., Volkov R. Engineering of new plants cultivars with improved abiotic stress tolerance // Ann. Suceava Univ. — 2007. — **6**, N 1. — P. 25—35.
22. Panchuk I., Volkov R., Schoffl F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2002. — **129**, N 6. — P. 838—853.
23. Sairam R.K., Tyagi A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants // Curr. Sci. — 2004. — **86**. — P. 407—421.
24. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**, N 372. — P. 1305—1319.
25. Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes // Functional Plant Biol. — 2005. — **32**, N 1. — P. 45—53.
26. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stress: A delicate balance between signalling and destruction // Physiol. Plant. — 2006. — **126**, N 1. — P. 45—51.

## АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

---

27. *Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P.* Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* // *Gene*. — 2002. — **288**, N 1. — P. 129–138.
28. *Turrens J.F.* Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* — 2003. — **552**, N 2. — P. 335–344.
29. *Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schoffl F.* Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.* — 2006. — **61**, N 4–5. — P. 733–746.
30. *Volkov R.A., Panchuk I.I., Schoffl F.* Heat stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standarts in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR // *J. Exp. Bot.* — 2003. — **54**, N 391. — P. 2343–2349.

Отримано 02.06.2008

## АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА

*Р.Ю. Пырижок, Р.А. Волков, И.И. Панчук*

Черновецкий национальный университет имени Юрия Федыковича

Исследовали влияние теплового стресса на активность пероксидазы в проростках кукурузы. Установлено, что максимальное ее повышение наблюдается в условиях жесткого теплового стресса (44 °С), в то время как в условиях умеренного теплового стресса (37 °С) эффект был выражен слабо. Увеличение общей активности пероксидазы коррелирует с изменениями интенсивности электрофоретических полос некоторых изоферментов. Полученные результаты указывают на вовлечение пероксидазы в ответ на действие теплового стресса.

## PEROXIDASE ACTIVITY IN MAIZE SEEDLINGS UPON HEAT STRESS

*R. Yu. Pyrizhok, R. A. Volkov, I. I. Panchuk*

Yu. Fedkovich Chernivtsy National University  
2 Kotsubynskogo St., Chernivtsy, 58012, Ukraine

Heat stress results in increase of peroxidase activity in maize seedlings. The maximum effect was observed upon severe heat treatment at 44 °C whereas upon moderate heat stress at 37°C the effect was less pronounced. The increase of total peroxidase activity correlates with the changes of the intensity of electrophoretic bands of several isoenzymes. The data demonstrate involvement of peroxidase in heat shock response.

*Key words:* *Zea mays* L., peroxidase, heat stress.