

УДК 577.152.1+577.25

ВПЛИВ ТЕПЛОВОГО СТРЕСУ НА ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗИ У *NICOTIANA TABACUM*

І.М. БУЗДУГА, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

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

Досліджували оксидативні пошкодження, спричинені тепловим стресом, з'ясували функціональну роль аскорбатпероксидази (АРХ) на ранній стадії стресової відповіді *Nicotiana tabacum*. Виявлено, що помірна (37 °С) і ще більшою мірою жорстка (44 °С) тепла стресова обробка протягом 1 год активує пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) у листках тютюну. Проте після теплової обробки упродовж 2 і 4 год піддані стресу й контрольні зразки не відрізнялись. Помірна тепла обробка не впливала на активність АРХ, а жорсткий тепловий стрес інактивував цей фермент. Такий ефект був чітко виражений після обробки протягом 1 год, а продовження обробки до 2 і 4 год призводило до поступового відновлення активності АРХ. Отримані результати підтвердили, що за 2-годинного теплового стресу в листках тютюну індуються захисні механізми, які зменшують оксидне пошкодження мембран і відновлюють активність термочутливих ферментів.

Ключові слова: *Nicotiana tabacum*, тепловий стрес, пероксид водню, пероксидне окиснення ліпідів, аскорбатпероксидаза.

Температура — один із важливих чинників навколишнього середовища, що впливає на рослини [6, 15, 22]. Підвищення температури принаймні на 5 °С порівняно з фізіологічно оптимальною має негативні наслідки для рослинного організму. Залежно від значення стресової температури, тривалості впливу та стадії розвитку рослини тепловий стрес може призводити до сповільнення її росту, пошкодження окремих органів або загибелі організму в цілому. На клітинному рівні за дії підвищених температур відбувається денатурація білків, порушуються функції мембран. Іншим наслідком, пов'язаним із тепловим стресом, є зростання внутрішньоклітинного продукування АФК, зокрема пероксиду водню, що, в свою чергу, призводить до виникнення вторинного оксидативного стресу [15, 19, 21].

Концентрацію пероксиду водню у клітині контролюють антиоксидантні ферменти, які розщеплюють його, а саме каталаза й пероксидази [20]. Серед останніх особливе місце посідає аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.11, АРХ), яка є ключовим ферментом аскорбатглутатіонового циклу у хлоропластах і цитозолі рослин [8, 16, 18].

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що тепловий стрес викликає тимчасове зростання рівня пероксиду водню в рослинних клітинах [21], яке спричинене посиленням його генерування у мітохондріях [17].

Доведено, що в умовах помірного теплового стресу (37 °С) пероксид водню відіграє важливу роль у передачі стресових сигналів і є необхідним для ефективного активування транскрипції генів білків теплового шоку й антиоксидантного ферменту APX2 у модельної рослини *Arabidopsis thaliana*, що дало нам підставу висунути припущення про захисну роль APX2 за дії підвищених температур [16, 21]. Пізніше було встановлено, що інактивація APX2 у нокаут-мутанта *A. thaliana* справді призводить до зниження термотолерантності [12]. Доведено також, що у *Brassica oleracea* й *Brassica campestris*, які належать до тієї ж родини Brassicaceae, зростання експресії та активності APX в умовах тривалого теплового стресу корелює зі стійкістю до підвищених температур [13]. Важливість APX для виживання за дії теплового стресу продемонстрована також для рису [14].

У більшості опублікованих результатів досліджень увагу приділено змінам експресії або активності APX за умов тривалого (понад 1 добу) впливу підвищених температур. На нашу думку, потрібно оцінити роль APX на ранніх етапах стресової відповіді. Встановлено, що в арабідопсису цей фермент може швидко інактивуватись залежно від температурного режиму, що обмежує його функцію захисту від оксидативних пошкоджень за дії теплового стресу [16]. Аналогічні дослідження рослин, що належать до інших таксономічних груп, практично не проводились. Зокрема актуальним є вивчення цього питання у представників родини Solanaceae, оскільки регуляція їх відповіді на тепловий стрес істотно відрізняється від відповіді видів родини Brassicaceae [9].

У зв'язку з цим ми дослідили характер оксидативних пошкоджень ліпідів мембран і зміни активності APX за дії нетривалого теплового стресу на рослини тютюну *Nicotiana tabacum*.

Методика

Досліджували рослини тютюну *N. tabacum* лінії W38 на стадії 6–8 листків. Рослини вирощували в кімнаті для культивування за температури +25 °С, освітлення 3 клк в умовах 16-годинного фотоперіоду.

Теплову обробку проводили на термостатованій водяній бані в конічних скляних колбах об'ємом 100 мл, в які вносили по 25 мл інкубаційного буфера (1 мМ калійфосфатний буфер, рН 6,0). Із листків рослин вирізали диски діаметром 1 см і вміщували їх у колби по 10–15 шт.

Зразки обробляли в темряві протягом 1, 2 і 4 год за 25, 37 і 44 °С. Для вивчення процесів, що відбуваються у фазу післястресової репарації через 1 або 2 год після стресової обробки, зразки переносили в камеру, де підтримували температуру 25 °С, і продовжували інкубацію в темряві відповідно протягом 1 або 2 год. Після закінчення обробки рослини заморожували в рідкому азоті й зберігали в морозильній камері за температури –70 °С для подальших досліджень. Як додатковий контроль використовували інтактні листки, які заморожували безпосередньо після відокремлення від рослини.

Білки екстрагували у буфері, що містив 50 мМ фосфат натрію (рН 7,0), 0,25 мМ ЕДТА, 10 %-й гліцерин, 0,5 мМ аскорбат, 2 %-й полівінілпіролідон. Вміст білка в екстракті визначали за методом Бредфорда [10]. Активність APX вимірювали спектрофотометрично методом, описаним раніше [7, 16].

Реакційна проба для АРХ містила 25 мкл білкового екстракту і 975 мкл реакційної суміші, що складалася з 25 мМ натрійфосфатного буфера (рН 7,0), 0,1 мМ ЕДТА, 2,5 мМ аскорбату та 1 мМ H_2O_2 . Активність ферменту виражали в мікромолях аскорбату, окисненого за 1 хв, у перерахунку на 1 мг білка.

Вміст тіобарбітуратактивних продуктів (ТБКАП) визначали за методом, описаним у праці [11], із незначними модифікаціями. Для екстрагування ТБКАП до 1 мл ацетону добавляли 100 мг рослинного матеріалу, розтертого в рідкому азоті, й центрифугували за $+4\text{ }^\circ\text{C}$, 14 000 g протягом 15 хв. Після центрифугування надосадову рідину переносили в чисту пробірку, доливали 500 мкл дистильованої води та 1,5 мл 0,5 %-го розчину тіобарбітурової кислоти в 20 %-й трихлороцтовій кислоті. Проби інкубували на киплячій водяній бані протягом 30 хв, доливали 96 %-м ацетоном до 3 мл та охолоджували на льоду протягом 10 хв. Після цього проби центрифугували 10 хв за 3000 g, надосадову рідину переносили в чисті пробірки. Паралельно готували «холосту» контрольну пробу без добавляння рослинного матеріалу. Оптичну густину отриманих проб визначали на спектрофотометрі СФ-46 за довжин хвиль 440, 532 і 600 нм та використовували для розрахунку вмісту ТБКАП [11].

Всі експерименти проведено для п'яти незалежно вирощених партій рослин. Вміст ТБКАП вимірювали у 3—4 паралельних пробах. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінено з використанням двовибірною *t*-критерію для залежних вибірок [4].

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження оцінювали динаміку оксидативного пошкодження, спричиненого підвищенням температури. Для цього у тканинах листків тютюну визначали рівень ПОЛ, яке вважається маркером оксидативного стресу в рослин [1, 5, 23].

Щоб оцінити рівень ПОЛ, досліджували зміну концентрації ТБКАП, які утворюються під дією АФК на клітинні мембрани [1, 20, 23]. Згідно з отриманими даними, вміст ТБКАП у листках тютюну вірогідно зростає лише після 1-годинного стресу — на 28 і 39 % за дії відповідно помірної ($37\text{ }^\circ\text{C}$) та жорсткої ($44\text{ }^\circ\text{C}$) теплової обробки порівняно з контрольними пробами, які інкубували за температури $25\text{ }^\circ\text{C}$ (рис. 1). Крім того, виявлено тенденцію до підвищення рівня ТБКАП на 17 % ($0,05 < p < 0,10$) після жорсткої теплової обробки протягом 4 год.

У фазу 1-годинної післястресової репарації після обробки за 37 або $44\text{ }^\circ\text{C}$ вміст ТБКАП залишався на рівні рослин, що зазнали стресу. Проте 2-годинне післястресове відновлення (2 год $37\text{ }^\circ\text{C}$ + 2 год $25\text{ }^\circ\text{C}$) призводило до зниження концентрації ТБКАП на 22 %. Тенденцію до зниження вмісту ТБКАП виявлено і за 2-годинного відновлення після обробки за $44\text{ }^\circ\text{C}$ (2 год $44\text{ }^\circ\text{C}$ + 2 год $25\text{ }^\circ\text{C}$), але в цьому разі воно становило лише 9 %. Отже, після помірної теплової обробки наслідки стресу ліквідуються ефективніше, ніж після жорсткої. Крім того, порівнянням результатів, отриманих при застосуванні 1- та 2-годинної обробки, підтверджено, що через 1 год теплового стресу в рослин захисні механізми активовані ще недостатньо, тому у фазу післястресового відновлення концентрація ТБКАП зменшується неістотно. Альтернативним поясненням може бути те, що 1 год відновлення за $25\text{ }^\circ\text{C}$ недостатньо для

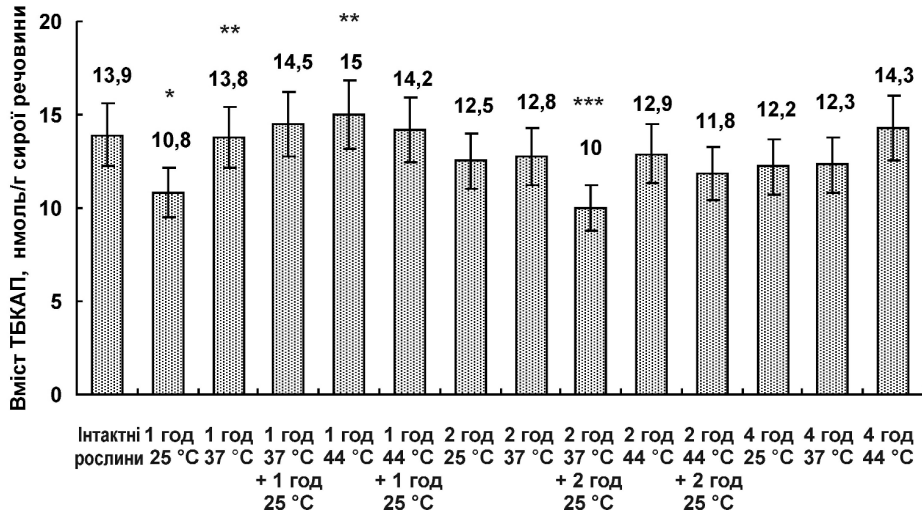


Рис. 1. Вміст тіобарбітуратактивних продуктів (нмоль/г сирової речовини) у листках рослин *Nicotiana tabacum* за дії помірного (37 °С) і жорсткого (44 °С) теплового стресу. Тут і на рис. 2 різниця вірогідна:

* — між контрольними та інтактними рослинами ($p < 0,05$); ** — між підданими стресу й контрольними рослинами ($p < 0,05$); *** — між підданими стресу рослинами та рослинами у фазі післястресового відновлення ($p < 0,05$)

ліквідації наслідків стресу і тому концентрація ТБКАП знижується лише через 2 год відновлення.

Слід зазначити, що інкубування контрольних зразків у темряві за температури 25 °С протягом 1 год призводило до зниження концентрації ТБКАП на 22 % порівняно з інтактними рослинами. За подовження часу інкубації контрольних зразків до 2 і 4 год рівень ТБКАП зростав, але все ж залишався нижчим, ніж у інтактних рослин. Це можна пояснити тим, що при перенесенні зразків у темряву у хлоропластах і пероксисомах припиняється світлозалежне генерування АФК, що супроводжується ослабленням ПОЛ у клітинах листків.

Отже, активування ПОЛ за дії підвищених температур у листках тютюну носить тимчасовий характер і спостерігається зокрема на ранній стадії (1 год) відповіді на стрес, що добре узгоджується з нашими попередніми даними про тимчасовий характер підвищення вмісту пероксиду водню в клітинах саме на ранніх етапах відповіді на тепловий стрес [21]. Зростання концентрації пероксиду водню за дії теплового стресу спостерігали й інші автори [15].

Нагадаємо, що ПОЛ ініціюється внаслідок взаємодії ненасичених жирних кислот мембран із вільними радикалами, зокрема з гідроксильним. У свою чергу, гідроксильні радикали утворюються під час взаємодії пероксиду водню із супероксид-радикалами [1]. Очевидно, зростання концентрації пероксиду водню в умовах теплового стресу призводить до збільшення вмісту гідроксильних радикалів, а отже, до посилення ПОЛ.

Іншим ініціатором ПОЛ може бути синглетний кисень, поява якого переважно пов'язана із фотохімічними реакціями. Оскільки ми проводили температурну обробку зразків у темряві, активування ПОЛ навряд чи спричинене посиленням генерування цієї АФК.

Починаючи з другої години обробки, рівень ПОЛ знижувався (див. рис. 1), що вказує на активування захисних механізмів, робота яких

спрямована зокрема на зниження концентрації АФК у клітинах листків. Це може бути пов'язано як зі зменшенням генерування, так і з посиленням розщеплення АФК, зокрема з активуванням антиоксидантних ферментів, таких як пероксидази, каталаза тощо.

Встановлено, що помірний тепловий стрес не викликав вірогідних змін активності АРХ порівняно з контрольними значеннями (рис. 2). Активність цього ферменту також залишалась без змін у фазі 1- і 2-годинного відновлення після помірної теплової обробки.

На відміну від помірної теплової обробки жорсткий тепловий стрес призводив до зниження активності АРХ у всіх варіантах досліджу. Найбільша відносна інактивація АРХ — на 30 % порівняно з контрольними рослинами — спостерігалась за дії 1-годинного жорсткого стресу, тоді як за дії 2- та 4-годинного стресу вона знижувалась відповідно на 26 і 12 %. У фазу відновлення після жорсткого стресу активність АРХ залишалась без змін. Порівняння цих даних із попередніми результатами підтвердило, що у *N. tabacum*, як і в *A. thaliana*, за дії жорсткого теплового стресу протягом 1 год відбувається часткова інактивація АРХ. Проте на відміну від *A. thaliana*, в якого подовження часу жорсткої теплової обробки до 4 год призводить до подальшої інактивації цього ферменту [2, 16], у *N. tabacum* активність АРХ стабілізується (2 год) і навіть відновлюється (4 год), що свідчить про активування механізмів, які захищають клітину від температурного пошкодження.

Слід зазначити, що інкубування контрольних зразків за нестресової температури (25 °С) протягом 1 год приводила до зростання активності АРХ на 25 % порівняно з інтактними рослинами. Проте з подовженням інкубації активність ферменту знижувалась і наближалась до його активності в інтактних рослин. Тимчасове підвищення активності АРХ протягом першої години можна пояснити реакцією рослини на поранення (вирізання дисків) та перенесення зразків в інкубаційний буфер у темряву.

Зіставлення характеру змін досліджених показників у листках тютюну показало, що в контрольній пробі, інкубованій за 25 °С протягом

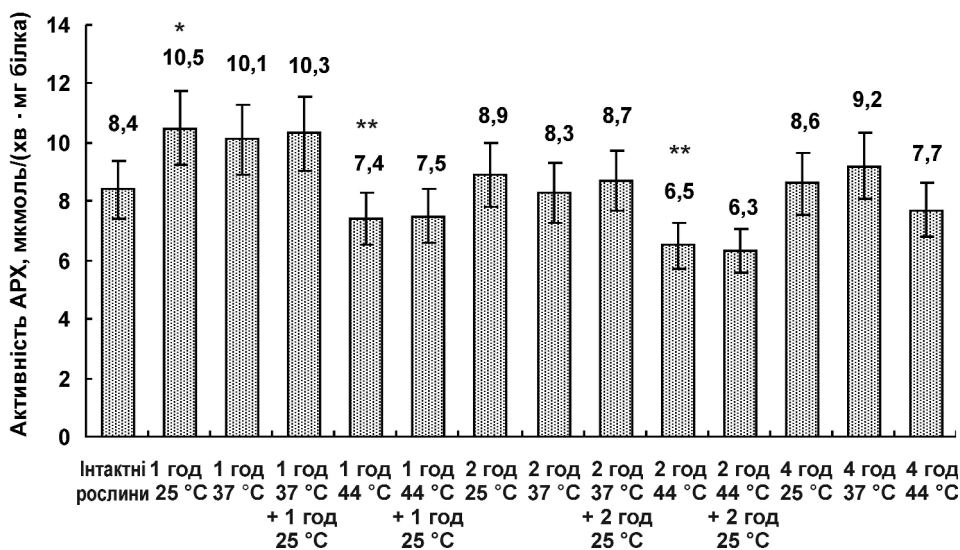


Рис. 2. Активність аскорбатпероксидази (мкмоль/(хв · мг білка)) у листках рослин *Nicotiana tabacum* за дії помірною (37 °С) і жорсткою (44 °С) теплового стресу

1 год, концентрація ТБКАП знижувалась, а активність АРХ підвищувалась порівняно з інтактними рослинами. Отже, можна вважати, що у цьому разі активування АРХ і зумовлене цим посилене розщеплення пероксиду водню (разом зі зниженням генерування АФК у темряві) є одним із чинників, що призводить до зниження концентрації ТБКАП. Аналогічно часткова інактивація АРХ за жорсткої стресової обробки зразків протягом 1 год супроводжувалась підвищенням рівня ТБКАП. Проте в інших випадках взаємозв'язок цих двох показників не виявлений. Так, за жорсткої стресової обробки протягом 2 год рівень ТБКАП залишався незмінним, незважаючи на зниження активності АРХ порівняно з контролем. Також унаслідок 2-годинної репарації після помірної стресової обробки (2 год 37 °С + 2 год 25 °С) концентрація ТБКАП вірогідно знижувалась, хоча активність АРХ не зростала (див. рис. 1, 2). Отже, крім змін активності АРХ, у визначенні концентрації АФК та рівня ПОЛ у клітині за умов теплового стресу мають брати участь інші чинники. Згідно з результатами наших попередніх досліджень, одним із таких чинників є зростання активності каталази в листках тютюну у відповідь на тепловий стрес [3]. Таким чином, залежно від стресової температури, тривалості обробки та фази стресової відповіді різні антиоксидантні ферменти забезпечують контроль рівня пероксиду водню в рослинній клітині. Крім того, у різних видів захисна функція цих ферментів може відрізнятися, зокрема через їх термостабільність.

1. Бацманова Л.М., Таран Н.Ю. Скринінг адаптивного потенціалу рослин за показниками оксидного стресу. — К.: Авега, 2010. — 79 с.
2. Доліба І.М., Руснак Т.О., Волков Р.А., Панчук І.І. Підвищена активність АРХ у подвійного мутанта *Arabidopsis thaliana* по генах *cat2* та *cat3* // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2011. — 9, № 1. — С. 3–9.
3. Доліба І.М. Участь ізоферментів каталази та пероксидаз у стресовій відповіді рослин: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Чернівці, 2011. — 21 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Луцк В.І., Багнокова Т.В. Показники оксидативного стресу. 1-тіобарбітуратактивні продукти і карбонільні групи білків // Укр. біохім. журн. — 2004. — 76, № 3. — С. 136–141.
6. Рибейро Р.В., Сантос М.Г., Мачадо Е.С., Олівейра Р.Ф. Фотохимическая реакция листьев фасоли на тепловой стресс после предварительного водного дефицита // Физиология растений. — 2008. — 55, № 3. — С. 387–396.
7. Amako K., Chen G., Asada K. Separate assays for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. — 1994. — 35. — P. 497–504.
8. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplast and their functions // Plant Physiol. — 2006. — 141. — P. 391–396.
9. Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y. et al. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors // J. Biosci. — 2004. — 29. — P. 471–487.
10. 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.
11. Du Z., Bramlage W. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts // J. Agricult. Food Chem. — 1992. — 40. — P. 1566–1570.
12. Larkindale J., Vierling E. Core genome responses involved in acclimation to high temperature // Plant Physiol. — 2008. — 146, N 2. — P. 748–761.
13. Lin K.-H., Huang H.-C., Lin C.-Y. Cloning, expression and physiological analysis of broccoli catalase gene and Chinese cabbage ascorbate peroxidase gene under heat stress // Plant Cell Rep. — 2010. — 29. — P. 575–593.
14. Nahakpam S., Shah K. Expression of key antioxidant enzymes under combined effect of heat and cadmium toxicity in growing rice seedlings // Plant Grow. Regul. — 2011. — 63. — P. 23–35.
15. Neil S., Desikan R., Clarke A. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants // J. Exp. Bot. — 2002. — 53. — P. 1237–1247.

16. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schoeffl F. Heat stress- and HSF-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2002. — **12**. — P. 838–853.
17. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakian N.N. et al. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture // Plant J. — 2007. — **52**, N 4. — P. 63–78.
18. 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.
19. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stress: A delicate balance between signalling and destruction // Physiol. Plant. — 2006. — **126**. — P. 45–51.
20. Taylor N.L., Tan Y.-F., Jacoby R.P., Millar A.H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes // J. Proteomics. — 2009. — **72**. — P. 367–378.
21. Volkov R.A., Panchuk I.I., Schoeffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. — 2006. — **61**. — P. 733–746.
22. Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Foolad M.R. Heat tolerance in plants: An overview // Environ. Exp. Bot. — 2007. — **61**. — P. 199–223.
23. Yamauchi Y., Furutera A., Seki K. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants // Plant Physiol. Biochem. — 2008. — **46**. — P. 786–793.

Отримано 05.08.2013

ВЛИЯНИЕ ТЕПЛООВОГО СТРЕССА НА ПЕРОКСИДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ У *NICOTIANA TABACUM*

И.М. Буздуга, Р.А. Волков, И.И. Панчук

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича

Исследовали окислительные повреждения, вызываемые тепловым стрессом, выясняли функциональную роль аскорбатпероксидазы (АРХ) на ранней стадии стрессового ответа *Nicotiana tabacum*. Обнаружено, что умеренная (37 °С) и в еще большей степени жесткая (44 °С) тепловая стрессовая обработка в течение 1 ч активирует пероксидное окисление липидов (ПОЛ) в листьях табака. Однако после тепловой обработки в течение 2 и 4 ч подвергнутые стрессу и контрольные образцы не отличались. Умеренная тепловая обработка не влияла на активность АРХ, а жесткий тепловой стресс инактивировал этот фермент. Такой эффект был четко выражен после обработки в течение 1 ч, а продление обработки до 2 и 4 ч приводило к постепенному восстановлению активности АРХ. Полученные результаты подтвердили, что после 2-часового теплового стресса в листьях табака индуцируются защитные механизмы, снижающие окислительное повреждение мембран и восстанавливающие активность термочувствительных ферментов.

HEAT STRESS AFFECTS LIPID PEROXIDATION AND ACTIVITY OF ASCORBATE PEROXIDASE IN *NICOTIANA TABACUM*

I.M. Buzduga, R.A. Volkov, I.I. Panchuk

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi
2 Kotsiubynskoho St., Chernivtsi, 58012, Ukraine

The effect of heat shock on oxidative injury, and functional role of ascorbate peroxidase (APX) during early stage of stress response in *Nicotiana tabacum* were investigated. It was found that moderate (37 °C) and, especially, severe (44 °C) heat treatment during 1 hour activates lipid peroxidation in tobacco leaves. However, no difference between heat-stressed and control samples was found after 2 to 4 hours of treatment. Activity of APX was unaffected by moderate heat treatment, but severe heat shock results in inactivation of the enzyme. The effect was obviously pronounced after 1 hour treatment whereas prolongation of treatment to 2 and 4 hours results in gradual reactivation of APX. The data show that protective mechanisms are induced in tobacco leaves after 2 hours of heat shock providing decline of oxidative injury of membranes and reactivation of thermosensitive enzymes.

Key words: *Nicotiana tabacum*, heat shock, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, ascorbate peroxidase.