

УДК 581.1.036.2:577.15

## ЗМІНИ АКТИВНОСТІ Й ТЕРМОСТАБІЛЬНОСТІ ПЕРОКСИДАЗИ КОРЕНІВ ПШЕНИЦІ ПІСЛЯ КОРОТКОЧАСНОЇ ДІЇ ГІПЕРТЕРМІЇ

Ю.В. КАРПЕЦЬ,<sup>1,2</sup> О.І. ОБОЗНИЙ,<sup>1</sup> В.М. ПОПОВ,<sup>1</sup> Ю.Є. КОЛУПАЄВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва  
62483 Харків, п/в «Комуніст-1»

<sup>2</sup>Український науково-дослідний інститут лісового господарства  
і агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького  
61024 Харків, вул. Пушкінська, 86

Досліджували вплив короткочасного нагрівання (1 хв за температури 42 °С у водяному термостаті) на активність, термостабільність та ізоферментний спектр пероксидази коренів етіологованих проростків пшениці. Через 1 й особливо 24 год після нагрівання фіксували підвищення активності та термостабільності ферменту. У цей період змінювався електрофоретичний спектр пероксидази. Усі зазначені ефекти практично повністю усувалися в разі обробки проростків інгібітором біосинтезу білка циклогексимідом. Пролонговані ефекти короткочасної дії на проростки пшениці сублетальної температури, ймовірно, пов'язані із синтезом більш термостабільних молекулярних форм пероксидази.

*Ключові слова:* *Triticum aestivum* L., гіпертермія, пероксидаза, ізоферменти, термостабільність.

Адаптація рослин до високих температур включає підвищення термостабільності клітин та їхніх функцій, що значною мірою пов'язано зі зміною термостабільності білків. Під час вивчення впливу гіпертермії на термостабільність ферментів частіше оцінюють відносно тривалу дію на рослини високих температур. Так, показано підвищення термостабільності ферредоксин-НАДФ-редуктази листків огірка після 1-добової дії на рослини температури 35 °С [8], кислої фосфатази гороху [7], нітратредуктази [9] і пероксидази пшениці [14] за впливу на рослини температури 41—43 °С протягом 2—3 год.

Значно меншою мірою досліджено короткочасний (від кількох секунд до кількох хвилин) вплив гіпертермії на термостабільність ферментів. Висловлювались припущення, що ефект теплового загартування короткочасною дією ушкоджувальних температур пов'язаний зі змінами конформації вже існуючих білків [6, 13]. Однак наявність лаг-періоду між короткочасним впливом високої температури і розвитком теплостійкості дає підстави припускати участь індукованого білкового синтезу у формуванні терморезистентності [20].

Одним із центральних ферментів у дослідженнях механізмів адаптації є пероксидаза. Вона належить до надзвичайно лабільних і поліфункціональних «стресових» ферментів [12]. Зокрема, її розчинна форма може виконувати антиоксидантні функції [19].

Раніше ми виявили, що після впливу протягом 1 хв на проростки пшениці сублетальної температури 42 °С, яка викликає ефект теплового

загартування, активність пероксидази підвищується [4]. Водночас залишалося нез'ясованим, чи змінюються при цьому термостабільність та електрофоретичний спектр ферменту. Знайти відповідь на це питання і було метою нашого дослідження. Зважаючи на те що активність пероксидази під дією сублетальної температури в коренях змінювалась істотноше, ніж у пагонах [4], ми досліджували активність, термостабільність та ізоферментний спектр ферменту коренів проростків пшениці.

### Методика

В експериментах використовували етіюльовані 4-добові проростки озимої пшениці (сорт Донецька 48). Частину з них протягом 1 доби інкубували на розчині інгібітора біосинтезу білка циклогексиміду (ЦГ) — надходження через корені. Решту проростків тримали на воді. Концентрація ЦГ (20 мкМ), що практично повністю нівелювала підвищення теплостійкості проростків після дії сублетальної температури, встановлена раніше [2]. Надалі проростки відповідних варіантів упродовж 1 хв піддавали дії температури 42 °С у водяному термостаті. Потім протягом 1 доби їх продовжували інкубувати на воді або розчині ЦГ. Режим теплового загартування встановлений у попередніх експериментах [2, 4].

Активність і термостабільність пероксидази визначали в коренях до і після 24-годинної обробки проростків ЦГ, а також через 1 і 24 год після дії на проростки температури 42 °С протягом 1 хв. Як ми показали раніше, саме через 24 год після впливу сублетальної температури рівень теплостійкості проростків досягав максимального значення, після чого поступово знижувався [20].

Активність розчинної форми пероксидази (КФ 1.11.1.7) знаходили за методом Ріджа й Осборна [22] з деякими модифікаціями. Наважку рослинного матеріалу гомогенізували в 0,06 М К, Na-фосфатному буфері Серенсена (рН 6,2). Гомогенат центрифугували при 7000 g протягом 15 хв. Надосадову рідину використовували для визначення активності ферменту, субстратами в реакційній суміші були гваякол і пероксид водню.

Для визначення термостабільності надосадову рідину прогрівали в термостаті й після охолодження до кімнатної температури знаходили залишкову активність. Температуру прогрівання встановлювали на підставі попередніх експериментів (див. нижче). Термостабільність розраховували як відношення значення активності ферменту після прогрівання екстракту до її значення за контрольної (20 °С) температури.

Ізоферментний спектр розчинної анодної пероксидази визначали методом вертикального електрофорезу [11] з деякими модифікаціями [15]. Забарвлювали гелі за методикою Шоу і Прасада [23].

Повторність незалежних експериментів чотириразова. На рис. 1 наведено середні величини та їх стандартні відхилення.

### Результати та обговорення

Активність розчинної пероксидази коренів проростків пшениці у контрольному варіанті (без впливу сублетальної температури і ЦГ) через 24 год спостережень підвищувалась. Це узгоджується з отриманими нами раніше результатами і може пояснюватись залежністю активності ферменту від віку проростків [5]. ЦГ усував такі зміни активності ферменту.

Через 1 год після дії на проростки сублетальної температури активність пероксидази в коренях підвищувалась, а далі (24 год) стабілізува-

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ

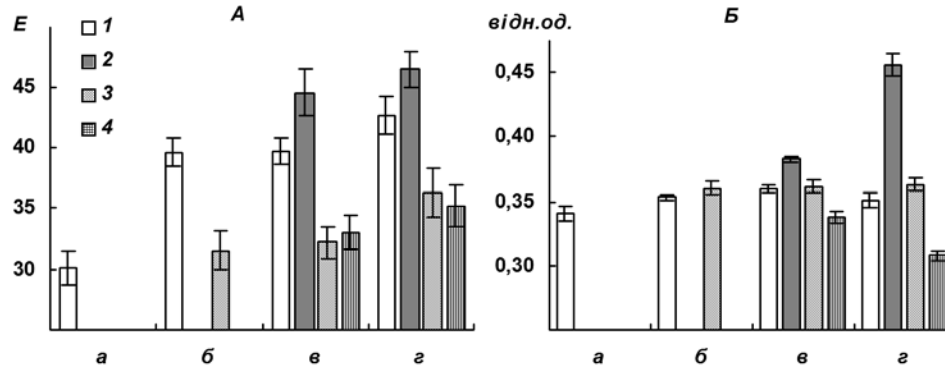


Рис. 1. Активність ( $E$ , відн. од./г сухої речовини · хв) —  $A$  і термостабільність (відн. од.) —  $B$  пероксидази коренів пшениці за дії загартування і ЦГ до початку експозиції проростків на розчині ЦГ ( $a$ ), після 24 год обробки проростків ( $б$ ), через 1 і 24 год після дії загартувальної температури та (або) 25 і 48 год впливу ЦГ (відповідно  $в$ ,  $г$ ).

Тут і на рис. 2: 1 — контроль; 2 — загартування (1 хв за 42 °С); 3 — ЦГ (20 мкМ); 4 — загартування (1 хв за 42 °С) + ЦГ (20 мкМ)

лась (див. рис. 1). Інгібітор білкового синтезу нівелював ефект підвищення активності пероксидази, спричинений загартуванням.

Згідно з результатами попередніх дослідів, після прогрівання екстракту пероксидази коренів незагартованих проростків пшениці за температури 58—62 °С активність ферменту знижувалась на 25—45 %, температура 66 °С спричинювала втрату близько 65 % ферментативної активності, за температури 75 °С фермент інактивувався на 95 %. У подальшому для характеристики термостабільності пероксидази екстракти прогрівали за температури 66 °С.

Загартування привело до підвищення термостабільності пероксидази, причому це зростання було помітнішим через 24 год після дії на проростки температури 42 °С упродовж 1 хв (див. рис. 1). Ефект підвищення термостабільності пероксидази, як і ефект збільшення її активності, що спостерігався після загартування, усував інгібітор біосинтезу білка ЦГ.

Відомо, що пероксидаза в рослинах представлена численними ізоформами, спектр яких змінюється за стресових і адаптивних реакцій. Є дані про зміни в наборі молекулярних форм цього ферменту за дії на рослини патогенів [18], водного дефіциту [16], засолення середовища [24], важких металів [21], низьких [1] і високих [10, 17] температур. Для оцінювання впливу гіпертермії на ізоферментний спектр пероксидази пшениці вивчали переважно довготривалий вплив високих температур [10].

Ми досліджували можливі зміни ізоферментного спектра пероксидази в коренях пшениці після короточасного загартування. Отримані результати дали підставу припустити, що термостабільність пероксидази зростала внаслідок зміни ізоферментного складу. Так, через 1 год після загартування з'явилася нова високоактивна ізоформа з  $R_f$  0,81, а через 24 год після дії температури 42 °С упродовж 1 хв — ізоформа з  $R_f$  0,53 (рис. 2). Водночас результати електрофоретичного аналізу спектра пероксидази не можна розглядати як однозначний доказ синтезу нових ізоформ. За температурних адаптацій можливі зміни конформації молекул пероксидази та їх заряду, що позначається на електрофоретичній рухли-

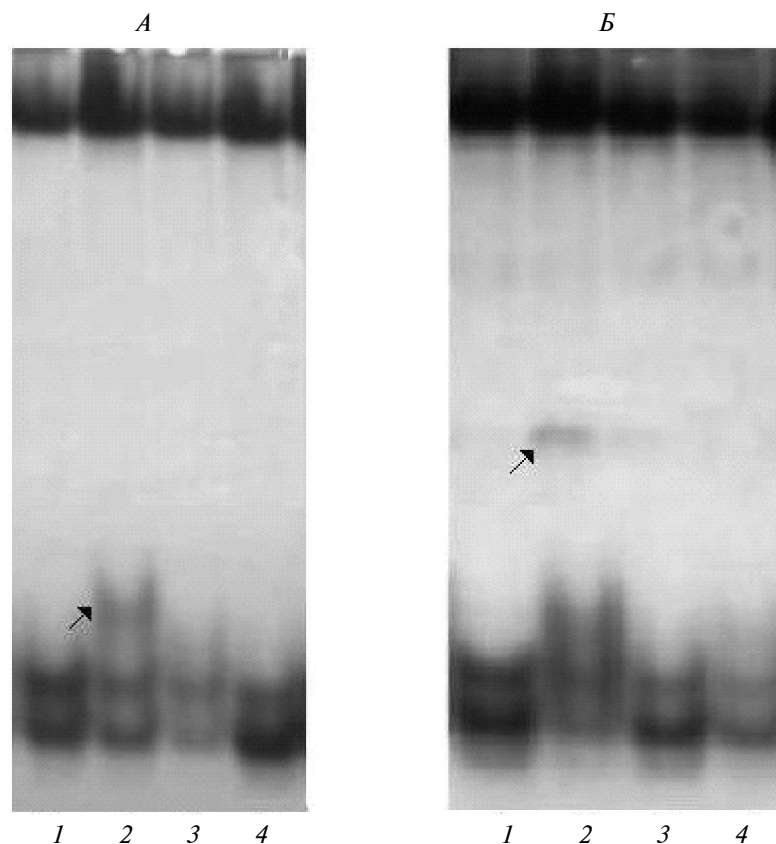


Рис. 2. Электрофоретичний спектр пероксидази коренів пшениці через 1 (А) і 24 год (Б) після загартування. Стрілкою вказано нові ізоформи, які з'явилися після дії гіпертермії

вості [12]. Також можливі посттрансляційні модифікації пероксидаз, що виявляються в їх глікозилуванні, протеолітичному відщепленні від молекул апоферменту коротких пептидів [12]. Нарешті, з низки видів рослин виділені природні білкові інгібітори пероксидаз, у тім числі гваяколпероксидази, активність яких може змінюватись залежно від дії стресорів [25]. На підставі результатів наших експериментів можна припустити, що зміни електрофоретичного спектра пероксидази після короточасного загартування пов'язані саме з процесом біосинтезу білка, адже спричинювана загартуванням поява нових смуг усувалася ЦГ (див. рис. 2).

Слід відзначити також зміну активності окремих ізоформ (наявних в усіх варіантах досліду) під впливом загартування. Так, через 1 і 24 год після дії температури 42 °С значно зростала активність малорухливих форм ферменту. Водночас через 24 год після впливу високої температури у коренях дещо спадала активність найрухливішої ізоформи пероксидази ( $R_f 0,89$ ). Характерно, що ефекти підвищення активності окремих форм нівелювалися інгібітором білкового синтезу ЦГ (див. рис. 2).

Отже, є підстави припустити, що пролонговані ефекти короточасного (1 хв) впливу на проростки пшениці сублетальної температури супроводжуються появою більш термостабільних молекулярних форм пероксидази, а не конформаційними змінами наявних молекул ферменту.

Аналогічні результати були отримані в наших дослідах з іншим антиоксидантним ферментом — супероксиддисмутазою [3].

1. 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.
2. Карпець Ю.В. О возможных механизмах индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы мягкой и сосны обыкновенной кратковременным действием высокой температуры // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 3 (12). — С. 63—70.
3. Карпець Ю.В., Обозный А.И., Вайнер А.А., Колупаев Ю.Е. Изменение термостабильности супероксиддисмутазы корней проростков пшеницы после кратковременного теплового закаливания // Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти. Матеріали Міжнар. наук. конф. (Харків, 13—15 жовтня, 2008). — Харків, 2008. — С. 82—83.
4. Карпець Ю.В., Колупаев Ю.Е. Значения окисньювального стресу в індукованні теплостійкості проростків пшениці короткочасною дією сублетальної температури // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — 40, № 3. — С. 245—252.
5. Колупаев Ю.Е., Карпець Ю.В. Індукування саліциловою кислотою тепло- і солестійкості проростків *Triticum aestivum* L. у зв'язку зі змінами прооксидантно-антиоксидантної рівноваги // Укр. ботан. журн. — 2006. — 63, № 4. — С. 558—565.
6. Константинова М.Ф., Горбань И.С. Теплоустойчивость фосфоэнолпируваткарбоксилазы после 10-секундного закаливания листьев кукурузы // Цитология. — 1985. — 28, № 8. — С. 950—952.
7. Леонтьева А.Н., Левченкова Н.В. Влияние теплового шока на термостабильность кислых фосфатаз // 4-й съезд о-ва физиологов растений России. Междунар. конф. «Физиология растений — наука 3-го тысячелетия» (Москва, 4—9 октября, 1999). — М., 1999. — С. 407.
8. Лютова М.И., Каменцева И.Е. Повышение термостабильности ферредоксин-НАДФ-редуктазы из листьев огурца под влиянием теплового шока (тепловая закалка) // Физиология растений. — 1992. — 39, № 5. — С. 83—90.
9. Лютова М.И., Каменцева И.Е. Термоиндуцированное увеличение устойчивости нитратредуктазы из листьев пшеницы к инактивирующим воздействиям // Там же. — 2001. — 48, № 1. — С. 100—105.
10. Олейникова Т.В., Волкова А.М., Пушина Р.Н. Действие высокой температуры на изоферментный состав и активность изотимов пероксидазы сортов пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 1979. — 11, № 2. — С. 113—117.
11. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука, 1981. — 288 с.
12. Савич И.М. Пероксидазы — стрессовые белки растений // Успехи соврем. биологии. — 1989. — 107, вып. 3. — С. 406—417.
13. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. — М.: Наука, 2006. — 143 с.
14. Фельдман Н.Л., Каменцева И.Е. Роль протеиназ в изменении активности пероксидазы из закаленных нагретом листьев пшеницы при хранении неочищенного экстракта // Цитология. — 1984. — 26, № 5. — С. 583—587.
15. Шарыпина Я.Ю., Попов В.Н., Кириченко В.В. Полиморфизм и генетический контроль некоторых ферментных систем у мутантных линий подсолнечника // Цитология и генетика. — 2006. — 40, № 2. — С. 27—33.
16. Bakalova S., Nedeva D., Nikolova A. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA // Bulg. J. Plant Physiol. — 2003. — Spec. Issue. — P. 386.
17. Berberich Th., Harada V., Sugawara K. et al. Two maize genes encoding 3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature // Plant Mol. Biol. — 1998. — 36. — P. 297—306.
18. Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A. et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance // Plant J. — 2006. — 47, N 6. — P. 851—863.
19. Ivanov S., Konstantinova T., Parvanova D. et al. Effect of high temperatures on the growth, free proline content and some antioxidants in tobacco plants // Докл. Българ. АН. — 2001. — 54, N 7. — P. 71—74.
20. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.Ye. The participation of reactive oxygen species in the plants heat resistance induction at the short-term hardening by superoptimum temperatures // Materials Int. Conf. «Bioecological problems and means of solution» (May 15—18, 2008, Saransk, Russia). — Saransk, 2008. — P. 202—203.
21. Radotic K., Ducic T., Mutavdzic D. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium // Environ. Exp. Bot. — 2000. — 44, N 2. — P. 105—113.

22. Ridge I., Osborne D.J. Hydroxyproline and peroxidases in cell wall of *Pisum sativum*: regulation by ethylene // J. Exp. Bot. — 1970. — 45. — P. 843–856.
23. Shaw C.R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes // Biochem. Genet. — 1970. — 4, N 2. — P. 297–320.
24. Sreenivasulu N., Ramanjulu S., Ramachandra-Kini K. et al. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance // Plant Sci. — 1999. — 141, N 1. — P. 1–9.
25. Tekchandani S., Guruprasad K.N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons // Ibid. — 1998. — 136, N 2. — P. 131–137.

Отримано 08.01.2009

#### ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРТЕРМИИ

Ю.В. Карпец,<sup>1,2</sup> А.И. Обозный,<sup>1</sup> В.Н. Попов,<sup>1</sup> Ю.Е. Колупаев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

<sup>2</sup>Украинский научно-исследовательский институт лесного хозяйства и агролесомелиорации им. Г.М. Висоцкого, Харьков

Исследовали влияние кратковременного нагрева (1 мин при температуре 42 °С в водном термостате) на активность, термостабильность и изоферментный спектр пероксидазы корней этиолированных проростков пшеницы. Через 1 и особенно 24 ч после нагрева фиксировали повышение активности и термостабильности фермента. В этот же период изменялся электрофоретический спектр пероксидазы. Все указанные эффекты практически полностью снимались при обработке проростков ингибитором биосинтеза белка циклогексимидом. Пролонгированные эффекты кратковременного действия на проростки пшеницы сублетальной температуры, вероятно, связаны с синтезом более термостабильных молекулярных форм пероксидазы.

#### CHANGES OF ACTIVITY AND THERMOSTABILITY OF PEROXIDASE OF WHEAT ROOTS AFTER SHORT-TERM HYPERTHERMIA INFLUENCE

Yu.V. Karpets,<sup>1,2</sup> O.I. Oboznyi,<sup>1</sup> V.M. Popov,<sup>1</sup> Yu.Ye. Kolupaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.V. Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University  
p/o «Communist-1», Kharkiv, 62483, Ukraine,

<sup>2</sup>G.M. Vysotsky Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Meliorations  
86 Pushkinska St., Kharkiv, 61024, Ukraine

The influence of short-term heating (1 min at temperature 42 °C in water thermostat) on the peroxidase activity, thermostability and isoenzyme spectrum in roots of etiolated wheat seedling has been studied. The increase of enzyme activity and thermostability was registered within 1 and especially 24 hours after heating. The changes of peroxidase electrophoretic spectrum took place during the same period. The treatment of seedlings with inhibitor of protein biosynthesis cycloheximide practically completely removed all this effects. Prolonged effects of short-term action of sublethal temperature on wheat seedlings, possibly, are related to the induced synthesis of more thermostable molecular forms of peroxidase.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., hyperthermia, peroxidase, isoenzymes, thermostability.