

УДК 581.1

## ВПЛИВ ЗАГАРТУВАННЯ НА ПЕРОКСИДНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ Й АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗ У РОСЛИНАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ РІЗНИХ СОРТІВ

П.С. МАЙОР, Л.Г. ВЕЛИКОЖОН, В.П. ЗАХАРОВА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджували динаміку вмісту одного з кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів — малонового діальдегіду й активність аскорбат- і гваяколпероксидаз у листках протягом загартування рослин озимої пшениці 12 сортів. Установлено, що адаптація рослин озимої пшениці до низької температури супроводжується контрольованим окиснювальним стресом, який ініціює зростання активності пероксидаз.

*Ключові слова:* озима пшениця, загартування, пероксидне окиснення ліпідів, аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза.

В основі набуття рослинами стійкості до низьких температур лежать структурні та фізіолого-біохімічні зміни, обумовлені як специфічними, так і неспецифічними реакціями на екстремальні умови зовнішнього середовища [6, 12]. Серед цих реакцій посилене утворення у клітинах і позаклітинному просторі активних форм кисню (АФК) є, як і за дії інших абіотичних стресорів, характерною рисою впливу низьких температур [1, 3, 6, 15]. Зміни в балансі АФК призводять до посилення пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та порушень у структурі й функціях клітини. Однак АФК необхідні й для перебігу основних метаболічних реакцій в різних клітинних компартментах (хлоропласти, мітохондрії та пероксисоми), а продукти ПОЛ можуть бути як індикаторами, так і первинними медіаторами стресу. Підтримка фізіологічно нормального рівня окисних процесів у клітині забезпечується завдяки функціонуванню антиоксидантної системи, що включає ферментативні й низькомолекулярні компоненти [1, 3, 15]. Чи будуть АФК діяти у клітині як пошкодуючі, захисні чи сигнальні агенти залежить від тонкої рівноваги між утворенням та утилізацією АФК в конкретному місці в конкретний момент часу.

Зміни антиоксидантної системи захисту клітини у рослинах злакових культур за дії низьких температур були предметом ряду досліджень [2, 3, 13, 21], проте роль процесів ПОЛ й окремих ферментів у механізмах адаптації рослин до цього чинника залишається маловивченою й суперечливою. У попередній праці ми встановили, що у рослинах озимої пшениці різних сортів протягом загартування відбувається збільшення вмісту однієї з АФК — пероксиду водню — та зростання активності антиоксидантних ферментів супероксидисмутази і каталази [4].

Метою даної роботи було вивчення особливостей динаміки вмісту малонового діальдегіду (МДА) як одного з кінцевих продуктів ПОЛ та

активності пероксидаз за дії загартувальних температур на рослини озимої пшениці для з'ясування внеску цих змін у формування морозостійкості.

### Методика

Об'єктами дослідження були 12 сортів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) Альбатрос одеський, Безоста 1, Донська напівкарликова, Експромт, Київська 7, Крижинка, Миронівська 808, Подолянка, УК 324, УК 364, УК 384, Циганка (перелічені за алфавітом). Морозостійкість сортів варіювала від нижче середньої (Безоста 1) до високої (Миронівська 808). Рослини вирощували на сірому лісовому супіщаному ґрунті у пластмасових ящиках за штучного освітлення з 10-годинним фотоперіодом. Після появи третього листка рослини витримували 7–10 діб у термостатованій камері за температури +15 °С (контроль). Загартування рослин проводили за температури +2 °С протягом семи діб (перша фаза) та при –3 °С протягом трьох діб (друга фаза). Температуру у камері для досягнення необхідних значень змінювали поступово зі швидкістю 2 °С/год.

Для досліджень відбирали другий листок з трьох рослин таких варіантів: контроль, 2-га і 7-ма доби першої фази загартування, 3-тя доба другої фази загартування. В окремих дослідах вивчали зміни вмісту МДА в першому справжньому листку рослин.

У зразках із застосуванням спектрофотометричних методів визначали вміст одного з кінцевих продуктів ПОЛ — МДА за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [5] та активність гваяколпероксидази (ГПО) й аскорбатпероксидази (АПО) [8]. Розрахунок концентрації МДА проводили за зміною поглинання при довжині хвилі 532 нм (коефіцієнт екстинкції  $1,56 \cdot 10^5 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) [5]. Пероксидазну активність визначали у реакційних середовищах із пероксидом водню, відновлювальним агентом слугував гваякол або аскорбат. Швидкість окиснення останніх обчислювали за змінами оптичного поглинання розчинів протягом 1,5 хв, яке реєстрували при довжині хвилі 470 (коефіцієнт екстинкції  $26,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) або 290 нм (коефіцієнт екстинкції  $2,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) [8]. Для визначення активності ГПО використовували реакційні суміші з різними значеннями рН. Попередньо досліджували активність ГПО у середовищах зі значеннями рН у межах 4,8–7,5. Наведені в роботі результати відображають середні значення активності ГПО у реакційних середовищах із рН 7,2 і 5,0. Концентрацію МДА та ферментативну активність наведено в розрахунку на 1 г сирової речовини. Активність пероксидаз у ферментативних препаратах перераховували також на одиницю вмісту білка, який визначали з бромфеноловим синім за методом Бредфорда [11].

Повторність дослідів 3–7-кратна. Аналіз та статистичну обробку експериментальних даних проводили на комп'ютері з використанням програми Microsoft Excel. На рисунках подано розмах варіювання досліджених показників та їх середні значення для усієї групи сортів.

### Результати та обговорення

Характерною рисою перебудов жирнокислотного складу ліпідів мембран за дії холоду є зростання відносного вмісту поліненасичених кислот, що забезпечує більший ступінь «плинності» біомембран при зниженій температурі [6, 12]. Однак поліненасичені жирні кислоти водночас є субст-

ратом реакцій ПОЛ і збільшення їх вмісту тісно пов'язане з активізацією цього процесу й утворенням вільних радикалів [3, 6, 15].

ПОЛ — це процес, який відбувається у живих організмах і за нормальних умов [1, 15]. Якщо інтенсивність ПОЛ та накопичення його продуктів у клітині не перевищує певних порогових значень, це вказує на ефективний контроль захисних систем клітин.

Із метою визначення інтенсивності ПОЛ у рослинах озимої пшениці різних генотипів при загартуванні досліджували динаміку вмісту одного з кінцевих продуктів ПОЛ — МДА.

На рис. 1 наведено результати вивчення динаміки ПОЛ у рослинах озимої пшениці. В усіх варіантах між дослідженими сортами спостерігались певні відміни вмісту МДА у першому та другому листках. Зниження температури до  $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$  на другу добу викликало підвищення у листках рослин вмісту ТБК-активних сполук, представлених в основному МДА. В окремих сортів вміст МДА зростає більш ніж удвічі порівняно з контрольним варіантом (до загартування). Однак у подальшому накопичення МДА сповільнювалось і вміст цього продукту ПОЛ зберігався на стаціонарному рівні до сьомої доби першої фази загартування. Слід зазначити, що в другій фазі загартування (за температури  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) вміст МДА у листках зменшувався, особливо у другому, де спостерігався рівень нижчий за контрольний.

Вміст МДА у зелених рослинах озимої пшениці демонструє досить велику варіабельність цього показника. Детальними дослідженнями виявлено коливальний характер інтенсивності ПОЛ, що може бути одним із сигналів, які викликають адаптацію рослин до низьких температур. Така модуляція фізіолого-біохімічних процесів у рослинах, очевидно, спричинена умовами освітлення — періодичним чергуванням світла і темряви. Описане явище може визначатися також якимись внутрішніми причинами, у тім числі змінами активності ферментів чи швидкості синтезу певних метаболітів.

Кореляційним аналізом тісного зв'язку між абсолютним (у нМ/г) або відносним (щодо контролю) вмістом МДА у листках та морозостійкістю сортів не виявлено. Обчислені коефіцієнти кореляції не перевищували 0,45 і не були значущими.

Оскільки температурні умови загартування не є пошкоджувальними для рослин, а навпаки, викликають зростання їхньої морозостійкості, можливо, що збільшення інтенсивності ПОЛ (як про це свідчить збіль-

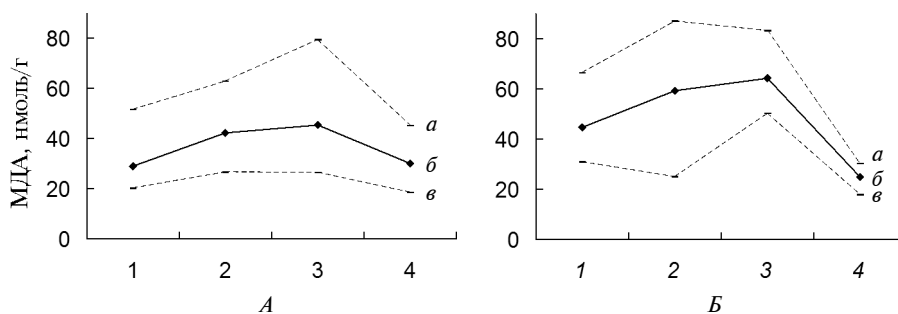


Рис. 1. Зміни вмісту МДА (нмоль/г сирової речовини) у першому (А) і другому (Б) листках рослин озимої пшениці досліджених сортів при зниженні температури. Тут і на рис. 2:

1 — контроль; 2, 3 — відповідно 2-га і 7-ма доби першої фази; 4 — 3-тя доба другої фази загартування; а, б, в — максимальні, середні та мінімальні значення показників

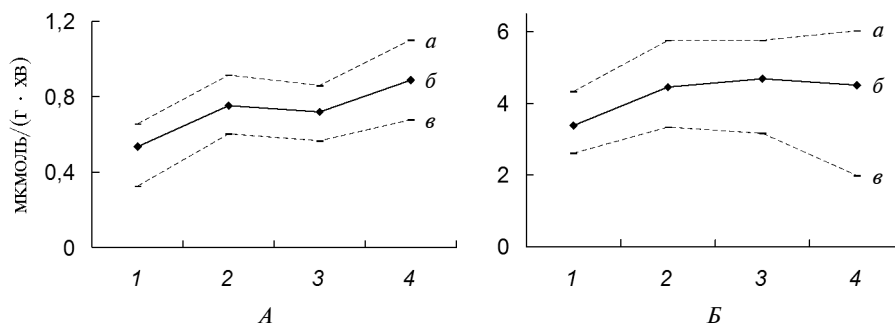


Рис. 2. Зміни активності ГПО (мкмоль гваяколу/(г сирової речовини · хв) — *А* й АПО (мкмоль аскорбату/(г сирової речовини · хв) — *Б* у другому листку рослин озимої пшениці при зниженні температури

шення вмісту МДА) носить адаптивний характер. Швидше за все, це є відображенням добре відомих змін жирнокислотного складу біологічних мембран, коли зростає ненасиченість жирних кислот. Останні є мішенню для процесів ПОЛ, тож збільшення вмісту МДА цілком можливе. Вірогідно продукти окиснення, в тім числі АФК, що беруть участь у процесах ПОЛ, виконують сигнальну функцію і сприяють адаптивним перебудовам за дії знижених температур.

Відомо, що продукування АФК є важливим компонентом загальної відповіді клітин на різні стресові чинники зовнішнього середовища. АФК, такі як супероксидний аніон і пероксид водню, відіграють значну роль у метаболізмі рослин, передачі сигналів та захисті клітин [3, 15, 16, 20]. Підтримання стаціонарного фізіологічно нормального рівня вільнорадикальних процесів у клітині забезпечується функціонуванням складної та високоспецифічної антиоксидантної системи. До найважливіших ферментів антиоксидантного захисту належать супероксиддисмутаза (СОД; КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6), пероксидаза (КФ 1.11.1.7), АПО (КФ 1.11.1.11), які інактивують супероксидний аніон-радикал та пероксид водню [1, 3, 15, 16, 20].

Згідно з результатами експериментів, активність ферментів каталази, ГПО, АПО, СОД та вміст пероксиду водню можуть досить суттєво відрізнятися між сортами. Найбільша міжсортна варіабельність досліджуваних показників спостерігалась при проходженні рослинами другої фази загартування та в умовах ремісії при підвищенні температури від мінусової до плюсової [4]. У контрольному варіанті розмах між максимальним і мінімальним значеннями загальної вибірки генотипів був найменшим. Тому для характеристики змін, які відбуваються у рослинах при загартуванні та ремісії, у більшості випадків правомірним є використання середніх значень досліджуваних показників для всього набору сортів.

Встановлено, що на другу добу загартування у листках рослин усіх досліджуваних сортів озимої пшениці активність ГПО зростала в середньому на 43 % (рис. 2, *А*) й АПО — на 36 % (рис. 2, *Б*). На 7-му добу загартування активність АПО і ГПО залишались практично на рівні попереднього варіанта (2 доби загартування).

Як було встановлено нами раніше [4], активність каталази на 2-гу добу загартування зростала у середньому на 28 %. При цьому зміни вмісту пероксиду водню у листках та активності СОД були недостовірні. Подальше витримування рослин за низької плюсової температури супрово-

джувалось поверненням активності каталази до початкового рівня. У цей період загартування майже не впливало на активність СОД, яка в середньому залишалась практично на рівні контролю. Водночас вміст пероксиду водню наприкінці першої фази загартування зростав у середньому на 60 %.

Досить суттєві зміни відбулись після проходження рослинами другої фази загартування (після витримування за температури  $-3^{\circ}\text{C}$  протягом трьох діб). Вміст пероксиду водню у листках досліджуваних сортів продовжував далі збільшуватись і становив у середньому 226 % початкового (контрольного) рівня. Витримування рослин за негативних температур викликало також достовірне зростання активності СОД, яка становила у середньому 211 % рівня контролю [4].

Активність АПО у цих умовах залишалась практично незмінною і становила у середньому для досліджуваних сортів 138 % контролю (див. рис. 2, Б). Активність ГПО після другої фази загартування дещо збільшувалась і досягала 169 % рівня контролю (див. рис. 2, А).

Отримані результати свідчать, що загартування досить суттєво впливало на про-/антиоксидантний статус клітин рослин озимої пшениці. При загартуванні, коли зниження температури спричинює адаптаційні перебудови до нових умов існування, вміст однієї з форм АФК — пероксиду водню (згідно з нашими даними [4]) та інтенсивність ПОЛ (див. рис. 1) у листках рослин достовірно збільшується порівняно з контролем (до загартування).

Вміст продуктів ПОЛ та пероксиду водню наприкінці першої фази загартування зростає, проте активність СОД не збільшується. На нашу думку, це свідчить про те, що зростання інтенсивності ПОЛ викликане іншими причинами або ж є необхідним етапом формування і передачі сигналів про зміну температури. Очевидно, зростання вмісту пероксиду водню за цих умов також може відігравати сигнальну роль. Активність трьох антиоксидантних ферментативних систем, які контролюють перетворення пероксиду водню, у першу фазу загартування змінюється порізно. Каталаза спочатку активується, а потім її активність повертається до початкового рівня. При цьому вміст пероксиду водню у перші 2 доби загартування майже не змінюється, а в подальшому починає зростати.

АПО належить до класу I пероксидаз вищих рослин, що містять гем і каталізують перетворення  $\text{H}_2\text{O}_2$  на  $\text{H}_2\text{O}$  і  $\text{O}_2$  [19], використовуючи аскорбат як специфічний донор електронів [17]. Цей фермент локалізований у різних компартментах клітини вищих рослин і відіграє важливу роль у її захисті від токсичних концентрацій пероксиду водню. Наприклад, у рослин рису виявлено 8 типів аскорбатпероксидази: 2 у цитозолі, 2 можливі пероксисомальні форми і 4 — у хлоропласті, одну з яких виявлено також у мітохондріях [22]. Висока спорідненість АПО до пероксиду та здатність детоксикувати низькі його концентрації порівняно з каталазою, яка є активнішою, але й демонструє меншу спорідненість до пероксиду, робить АПО ідеальним регулятором рівня цієї АФК.

Характерно, що активність двох ферментів з пероксидазною функцією, причетних до регуляції вмісту АФК у рослинних клітинах — АПО і ГПО, при загартуванні зростає. Пероксидази класу III (так звані класичні пероксидази) можуть каталізувати зворотню реакцію перетворення пероксиду водню, тобто пероксид може бути не лише субстратом, а й продуктом такої реакції [10, 18]. Припускають, що позаклітинні перок-

сидази можуть захищати рослини від АФК окиснювального вибуху, в генеруванні яких вони самі беруть участь [14].

Отже, дослідження динаміки вмісту МДА та активності ферментів, які беруть участь у перетворенні АФК — АПО і ГПО, у рослинах озимої пшениці 12 сортів, показало що протягом загартування відбувається не-монотонне зростання цих показників. Для пероксиду водню відмічено збільшення його вмісту в листках наприкінці першої фази загартування. Доволі високою є кореляція між активністю ГПО та морозостійкістю сортів як у контролі ( $R = 0,57$ ), так і в обох фазах загартування ( $R = 0,51 \dots 0,59$ ). Зв'язок між цими показниками відзначали й інші дослідники [2, 13].

Таким чином, при зниженні температури з початком загартування рослин озимої пшениці в них відбувається активація антиоксидантних ферментів, причому динаміка цього процесу залежить від природи конкретного ферменту і є сортоспецифічною. Найбільшу активність основних антиокиснювальних ферментів (каталази, АПО, ГПО, СОД) виявлено при зниженні температури до мінусових значень. Установлено особливості накопичення однієї з найважливіших АФК — пероксиду водню та продукту ПОЛ — МДА. Показано, що при зниженні температури до мінусових значень вміст останнього зменшується на фоні зростання вмісту пероксиду водню та активності захисних ферментів.

Результати роботи свідчать, що низькотемпературне загартування рослин озимої пшениці супроводжується контрольованим окиснювальним стресом, який ініціює активацію антиоксидантних ферментативних систем.

1. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 2. — С. 95—108.
2. Кучеренко В.П., Капустян А.В. Фермент пероксидаза і зимостійкість рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 116 с.
3. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. — Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. — 208 с.
4. Майор П.С., Захарова В.П., Великожон Л.Г. Зміна вмісту пероксиду водню та активності супероксиддисмутази і каталази у рослинах різних сортів озимої пшениці при загартуванні // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. — Т. 5. — К.: Логос, 2008. — С. 102—107.
5. Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Юферова С.Г., Шевырева В.А. Использование 2-тиобарбитуровой кислоты при исследовании перекисления липидов в тканях растений // Биол. науки. — 1978. — № 9. — С. 86—94.
6. Моргун В.В., Майор П.С. Зимо- і морозостійкість озимих злакових культур / Физиология растений: Проблемы та перспективи розвитку. — К.: Логос, 2009. — Т. 2. — С. 105—165.
7. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. — 2004. — 51, № 5. — С. 686—691.
8. Amako K., Chen G.-X., Asada K. Separate assay specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for chloroplastic and cytosolic isoenzymes of ascorbate peroxidase in plants // Plant Cell Physiol. — 1994. — 35. — P. 497—504.
9. Apostolova P., Yordanova R., Popova L. Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars // Gen. Appl. Plant Physiol. — 2008. — 34, No 3—4. — P. 281—294.
10. Bakalovic N., Passardi F., Ioannidis V. et al. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database // Phytochemistry. — 2006. — 67, N 6. — P. 534—539.
11. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248—254.
12. Guy C., Kaplan F., Kopka J., Hincha D.K. Metabolomics of temperature stress // Physiol. plant. — 2008. — 132. — P. 220—235.

13. Janda T., Szalai G., Rios-Gonzalez K. et al. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activities in cereals // Plant Sci. — 2003. — **164**, N 2. — P. 301—306.
14. Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Luthje S. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxication of active oxygen species // Phytochem. Rev. — 2004. — **3**, N 1—2. — P. 173—193.
15. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. — 2002. — **7**, N 9. — P. 405—410.
16. Mittler R., Vanderauwera S., Gallery M., Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Ibid. — 2004. — **9**, N 10. — P. 490—498.
17. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. — 1981. — **22**, N 5. — P. 867—880.
18. Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // Plant Cell Rep. — 2005. — **24**, N 5. — P. 255—265.
19. Passardi F., Theiler G., Zamocky M. et al. PeroxiBase: The peroxidase database // Phytochemistry. — 2007. — **68**, N 12. — P. 1605—1611.
20. Scandalios J.G. The rise of ROS // Trends Biochem. Sci. — 2002. — **27**, N 9. — P. 483—486.
21. Scebbba F., Sebastiani L., Vitagliano C. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation // Physiol. Plant. — 1998. — **104**. — P. 747—752.
22. Teixeira F.K., Menezes-Benzvente L., Galvao V.C. et al. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments // Planta. — 2006. — **224**, N 2. — P. 300—314.

Отримано 23.12.2009

ВЛИЯНИЕ ЗАКАЛИВАНИЯ НА ПЕРОКСИДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ В РАСТЕНИЯХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ

П.С. Майор, Л.Г. Великожон, В.П. Захарова

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали динамику содержания одного из конечных продуктов пероксидного окисления липидов — малонового диальдегида и активность аскорбат- и гваяколпероксидаз в листьях при закаливании растений озимой пшеницы 12 сортов. Установлено, что адаптация растений к низкой температуре сопровождается контролируемым окислительным стрессом, который инициирует возрастание активности пероксидаз.

THE INFLUENCE OF COLD ACCLIMATION ON LIPID PEROXIDATION AND ACTIVITY OF PEROXIDASES IN PLANTS OF DIFFERENT WINTER WHEAT CULTIVARS

P.S. Major, L.G. Velykozhon, V.P. Zakharova

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Changes in contents of malone dialdehyde and in activity of ascorbate and guaiacol peroxidases in plants of 12 winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars during hardening were studied. It was found that low temperature adaptation of plants is accompanied by controlled oxidative stress, which triggers an increase in peroxidases activities.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., cold acclimation, lipid peroxidation, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase.