



УДК 581.1

В. В. Жук, Л. М. Бацманова, М. М. Мусієнко

Індукція екзогенним пероксидом водню адаптивної відповіді рослин пшениці на високотемпературний стрес

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

Показано, що екзогенний H_2O_2 в умовах дії високотемпературного стресу справляє сигнальну та регуляторну дію, що виявляється у підвищенні активності ключового ферменту антиоксидантної системи супероксиддисмутази, стабілізації активності аскорбатпероксидази і каталази через регуляцію окисно-відновних процесів.

Формування адаптивної відповіді вищих рослин на несприятливі умови середовища тісно пов'язане з процесами фотосинтезу, які є головними джерелами активних форм кисню (АФК) [1]. Високі температури викликають дисбаланс в роботі фотосистем, що спричиняє окиснювальний стрес і характеризується різким зростанням вмісту АФК [2]. Концентрація АФК контролюється швидкістю продукування і інтенсивністю утилізації антиоксидантами. Синглетний кисень до пероксиду водню (H_2O_2) відновлюється супероксиддисмутазою (СОД) [3]. Найбільш довгоживучою формою АФК є H_2O_2 , який транспортується з місць утворення по аквапоринових каналах на значні відстані і здатний виконувати сигнальні функції, зокрема в контролі рухів замикальних клітин продохів. Ключову роль у контролі метаболізму H_2O_2 надають аскорбат-глутатіоновому циклу, а головним відновлювачем H_2O_2 вважають аскорбатпероксидазу (АПО), яка функціонує в хлоропластах [4]. В утилізації H_2O_2 в цитозолі і пероксисомах головну роль відіграє каталаза. Останніми роками H_2O_2 розглядають як важливу сигнальну молекулу, яка бере участь у формуванні відповіді на стрес [5, 6]. Мета досліджень полягала у вивченні дії екзогенного H_2O_2 на рослини пшениці в умовах високотемпературного стресу.

Об'єктом дослідження були рослини озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Столична, яку вирощували в умовах водної культури протягом 14 діб, після чого рослини дослідних варіантів були оброблені методом обприскування 10^{-4} М водним розчином H_2O_2 . Частину оброблених і необроблених рослин прогрівали в повітряному термостаті при 45°C протягом 3 год. Через годину після дії високої температури та протягом наступних трьох діб відбирали зразки тканин першого листка. Ендогенний H_2O_2 екстрагували з гомогенізованої з калій-фосфатним буфером (рН 6,5) тканини, центрифугували 25 хв

© В. В. Жук, Л. М. Бацманова, М. М. Мусієнко, 2013

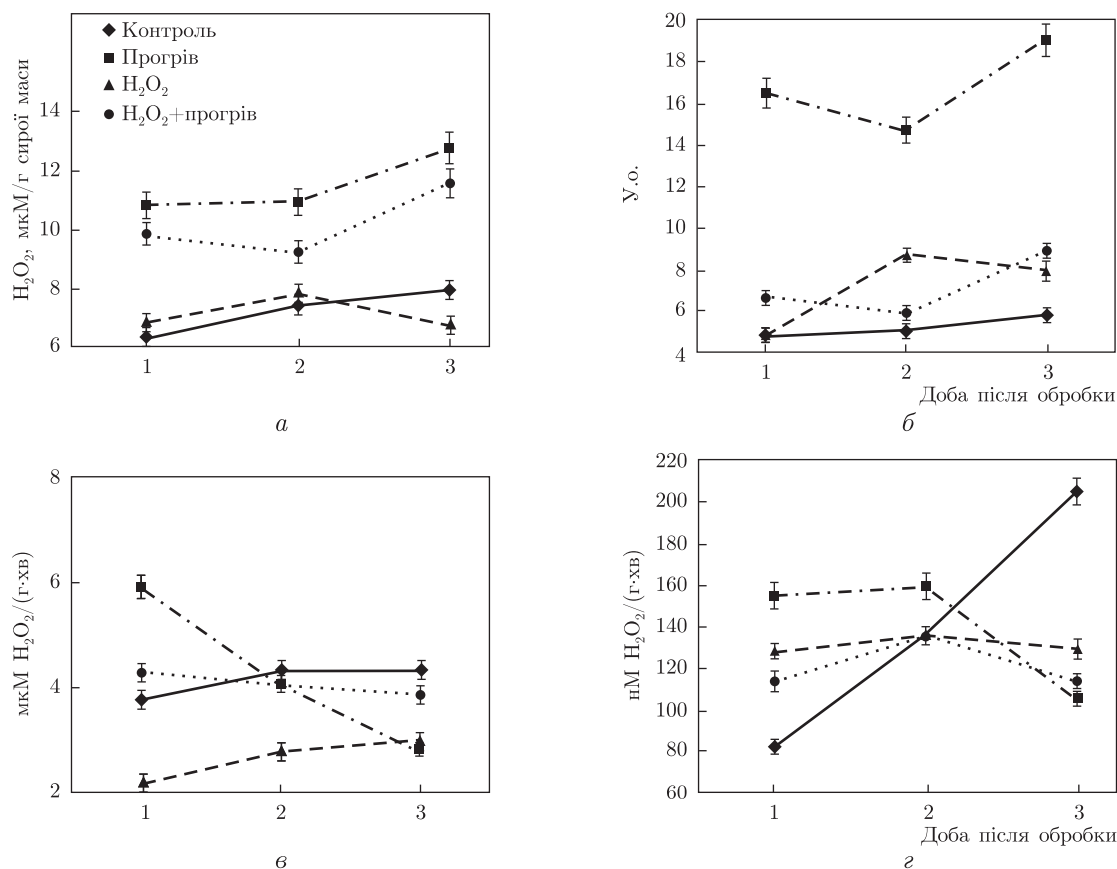


Рис. 1. Вплив високотемпературного стресу та екзогенного H₂O₂ на вміст ендогенного H₂O₂ (а), активність СОД (б), АПО (в) та каталази (г) в клітинах мезофілу листків пшениці сорту Столична

при 6000 г. До супернатанту додавали 0,1% сульфат титану в 20% H₂SO₄ і знову центрифугували 15 хв при 6000 г. Інтенсивність комплексу жовтого забарвлення вимірювали при 410 нм [7].

Активність антиоксидантних ферментів визначали після гомогенізації лисків у 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0) на холоді з додаванням 0,1 мМ ЕДТА. Гомогенат центрифугували 20 хв при 12 000 г. Супернатант відбирали для визначення активності ферментів [8]. Активність супероксиддисмутази (СОД) (ЕС 1.15.1.1) вимірювали фотохімічним методом [9]. Одна одиниця СОД визначається як кількість ферменту, яка необхідна для 50% інгібування відновлення нітросинього тетразолію при 560 нм у присутності рибофлавіну на світлі. Активність каталази (ЕС 1.11.1.6) визначали в реакційній суміші, яка містила калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,03% H₂O₂ і ферментний екстракт [10]. Виміри падіння оптичної густини H₂O₂ проводили при 240 нм. Активність АПО (ЕС 1.11.1.11) визначали за методом [11]. До ферментативного екстракту додавали калій-фосфатний буфер (рН 7,0), аскорбат у концентрації 0,5 мМ і запускали реакцію додаванням 0,1 мМ H₂O₂. Вимірювання падіння оптичної густини аскорбату проводили при 290 нм.

Встановлено, що після дії високої температури збільшувався вміст ендогенного H₂O₂ вдвічі порівняно зі значеннями контролю (рис. 1, а). Дія екзогенного H₂O₂ в оптимальних умовах вирощування незначно змінювала ендогенний вміст H₂O₂. В листках рослин,

які до прогріву були оброблені H_2O_2 , вміст ендogenous H_2O_2 був вищим, ніж у контролі, але нижчим, ніж у листках, які прогрівали без обробки. Отже, обробка рослин пшениці екзогенним H_2O_2 до прогріву індукувала зменшення рівня ендogenous H_2O_2 після дії високотемпературного стресу.

Обробка рослин пшениці H_2O_2 індукувала зростання активності антиоксидантних ферментів. Найбільше підвищувалася активність СОД після дії екзогенного H_2O_2 в оптимальних умовах вирощування рослин (див рис. 1, б). Прогрів підвищував активність СОД на другу та третю добу після стресового періоду. У оброблених до прогріву H_2O_2 рослин активність СОД незначно підвищувалася через годину після дії стресу та істотно зростала на третю добу відновного періоду. Протягом трьох діб активність СОД у всіх дослідних варіантах була вищою порівняно з контролем.

Обробка рослин H_2O_2 на 50% збільшувала активність АПО в оптимальних умовах вирощування (див рис. 1, в). Однак після прогріву необроблених H_2O_2 рослин пшениці активність АПО в клітинах мезофілу листків зменшувалася на 50% порівняно з контролем. У оброблених H_2O_2 рослин активність АПО після дії високої температури зростала на 10% порівняно з контролем і незначно зменшувалася на другу та третю добу відновного періоду.

Активність каталази в клітинах мезофілу першого листка в контрольному варіанті зростала більш ніж удвічі протягом трьох діб дослідження, що свідчить про швидке старіння листка (див. рис. 1, г). Обробка рослин H_2O_2 зменшувала активність каталази на третю добу. Прогрів оброблених та необроблених H_2O_2 рослин спричиняв незначні коливання активності каталази. Вивчення динаміки активності каталази свідчить про те, що екзогенний H_2O_2 та дія високотемпературного стресу затримували процеси старіння клітин мезофілу першого листка пшениці, які характеризуються різким зростанням активності каталази, що переважно функціонує в пероксисомах.

Таким чином, за допомогою екзогенного H_2O_2 було показано сигнальну дію цієї форми АФК на фотосинтезуючі клітини, яка виявилась у вигляді регуляції активності антиоксидантних ферментів за незначного впливу на ендogenous пул H_2O_2 .

1. Foyer Ch. H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2009. – **11**, No 4. – P. 861–889.
2. Suzuki N., Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant*. – 2006. – **126**. – P. 45–51.
3. Бараненко В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // *Цитология*. – 2006. – **48**, № 6. – С. 465–474.
4. Foyer Ch. H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub // *Plant Physiol*. – 2011. – **155**. – P. 2–18.
5. Hung S.-H., Yu Ch.-W., Lin Ch. Y. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // *Bot. Bull. Acad. Sin.* – 2005. – **46**. – P. 1–10.
6. Stone J. R., Yang S. Hydrogen peroxide signaling // *Cur. Opin. Plant Biol.* – 2002. – **5**. – P. 388–395.
7. Chen L.-M., Kao C.-H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation // *Bot. Bull. Acad. Sin.* – 1999. – **40**. – P. 283–287.
8. Rios-Gonzalez K., Erdei L., Lips S. H. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources // *Plant Sci.* – 2002. – **162**. – P. 923–930.
9. Beyer W. F. Jr., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions // *Anal. Biochim.* – 1987. – **161**. – P. 559–566.
10. Upadhyaya A., Sankhla D., Davis T. D. et al. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves // *J. Plant Physiol.* – 1985. – **121**. – P. 453–461.

11. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. – 1981. – **22**, No 5. – P. 867–880.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 10.10.2012

В. В. Жук, Л. М. Бацманова, Н. Н. Мусиенко

Индукция экзогенным пероксидом водорода адаптивного ответа растений пшеницы на высокотемпературный стресс

Показано, что экзогенный H₂O₂ в условиях действия высокотемпературного стресса оказывает сигнальное и регуляторное действие, что проявляется в повышении активности ключевого фермента антиоксидантной системы супероксиддисмутазы, стабилизации активности аскорбатпероксидазы и каталазы через регуляцию окислительно-восстановительных процессов.

V. V. Zhuk, L. M. Batsmanova, M. M. Mysienko

Induction of the adaptive reaction of wheat plants by exogenous hydrogen peroxide to high temperature stress

It is shown that exogenous H₂O₂ under high temperature stress conditions shows the signaling and regulation effects that increase the activity of the key enzyme of the antioxidant system, superoxide dismutase, and stabilize the activity of ascorbate peroxidase and catalase through the regulation of redox processes.