

УДК 581.1

ВПЛИВ НИЗЬКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ НА ВМІСТ ГЛУТАТІОНУ ТА АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ФЕРМЕНТІВ В ПРОРОСТКАХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ, ЩО ВІДРІЗНЯЮТЬСЯ ЗА МОРОЗОСТІКІСТЮ

В.Г.Адамовська*, О.О.Молодченкова*, П.С.Тихонов**, І.В.Узлякова*
*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення Національної Академії Аграрних Наук України,
**Одеський державний аграрний університет

*Представлені результати вивчення антиоксидантної системи (АОС) у різних за морозостійкістю сортів озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) при дії низьких температур. Вивчені сорти відрізняються за вмістом глутатіону та активністю глутатіонзалежних ферментів навіть на рівні контрольних рослин. Неоднаковий характер зміни компонентів АОС за низьких температур свідчить про їх участь в реакціях відгуку рослин пшениці на вплив несприятливих факторів навколишнього середовища. Проте рівень адапційних перебудов значною мірою визначається генотипом. Висловлено припущення, що зрушення у бік зменшення або збільшення рівня показників АОС є ефективним показником оцінки ступеня впливу стресового фактору на рослини.*

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., гіпотермія, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, глутатіон.

Вступ. Процес адаптації рослин до несприятливих умов навколишнього середовища, у тому числі й низьких температур, відбувається за участі АОС, що контролює в клітинах рівень активних форм кисню (АФК) [1,2]. Ефективність функціонування АОС визначається станом загального антиоксидантного потенціалу, що обумовлений рівнем низькомолекулярних антиоксидантів та активністю антиоксидантних ферментів. До низькомолекулярних антиоксидантів належить глутатіон відновлений [3,4]. Його основними функціями є відновлення дисульфідних груп білків через їх ковалентну модифікацію, підтримка пулу відновленої форми аскорбату [5,6]. Відновлений глутатіон також бере участь у неферментативній детоксикації супероксидного радикалу, процесах обриву ланцюгів кисеньзалежних вільнорадикальних реакцій в рослинних клітинах [7]. Це дозволяє розглядати глутатіон як один з основних компонентів редокс-буферу клітини [8].

Важливу роль в захисті клітин від АФК грають антиоксидантні ферменти – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза [9,10]. Відновлений глутатіон та глутатіонпероксидаза перетворюють ліпоперекиси на менш токсичні оксикислоти і цим попереджають пошкодження біоструктур. Крім того глутатіон усуває ацильні перекиси, що утворюються під час перекисного окислення ліпідів [11] і таким чином може стабілізувати мембранні структури. Зрушення у кількості й активності антиоксидантів розглядається як найбільш ефективний показник оцінки ступеня впливу стресових факторів на рослини. При цьому морозостійкість рослин може бути пов'язана зі здатністю клітин перешкоджати розвитку перекисного окислення мембранних ліпідів [12].

Вивчали вплив низької позитивної температури (+4°C) на характер зміни компонентів антиоксидантної системи (глутатіон відновлений, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза) в тканинах проростків сортів озимої пшениці, що відрізняються за морозостійкістю.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом дослідження були етиольовані проростки сортів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), що відрізняються за рівнем морозостійкості, морозостійкого сорту Одеська 16 та слабморозостійкого сорту Безоста 1.

Поверхнево стерильні зернівки пророщували протягом 3 діб при 24°C на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою (контроль). Низькотемпературний стрес створювали, вміщуючи 3-добові проростки в низькотемпературну шафу при +4°C. Тривалість дії гіпотермії була 2, 24 і 48 годин. Після закінчення експозиції відпрепаровані надземну частину та коріння проростків заморожували при - 42°C.

Антиоксидантну систему клітини оцінювали за вмістом відновленого глутатіону та за активністю глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази.

Для визначення вмісту відновленого глутатіону використовували 20%-вий гомогенат тканин, виготовлений на 0,3 М калій-фосфатному буфері, рН 7,5. Гомогенат центрифугували протягом 20 хв. при 6000 об/хв. До 2 мл. супернатанту додавали 3 мл осаджуючого реактиву, у 100 мл якого міститься 1,67 г HPO_3 , 0,2 г ЕДТА, 30 г NaCl) та проводили повторне центрифугування протягом 10 хв. при 6000 об/хв. До 2 мл 0,3 М калій-фосфатного буферу, рН 7,5 додавали 0,05 мл 1 мМ розчину реактиву Елмана та 2 мл отриманого супернатанту, після чого проводили вимірювання оптичної щільності розчину при 412 нм на спектрофотометрі "Specol-11". Вміст відновленого глутатіону визначали за калібрувальною кривою та надавали в мМ/г сирової речовини [13].

Для визначення активності глутатіонзалежних ферментів проводили гомогенізацію рослинного матеріалу в 0,1 М калій-фосфатному буфері, що містить 0,25 М сахарози. Активність глутатіонпероксидази визначали за методом Сищикова та Гришка [5]. Реакційна суміш складалася з 0,2 мл 0,01 М ЕДТА, 0,1 мл 0,004 М НАДФН, 0,2 М відновленого глутатіону, 0,01-0,1 мл супернатанту, 0,2 мл 2,5 М H_2O_2 та 1,2 мл 0,1 М калій-фосфатного буферу,

pH 7,5. Реакцію починали додаванням H_2O_2 , зменшення вмісту НАДФН реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм.

При визначенні активності глутатіонредуктази реакційна суміш містила 0,5 мл 0,1 М калій-фосфатного буферу, pH 7,5, 0,05 мл 2 мМ НАДФН та 0,05 мл окисленого глутатіону. Реакцію ініціювали додаванням 0,05 мл супернатанту, зменшення вмісту НАДФН в середовищі інкубації реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм [5]. Вміст білка визначали за методом Лоурі [14].

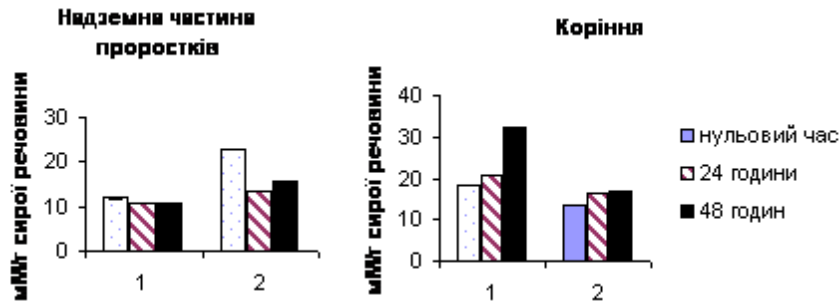
На рисунках наведені середні арифметичні з п'яти біологічних повторностей та їх стандартні помилки.

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз вмісту глутатіону в надземній частині проростків у контрольних (неохолоджених) рослин показав, що його рівень у морозостійкого сорту через 48 годин після початку експерименту практично не змінився. У слабоморозостійкого сорту відбулося різке зниження вмісту глутатіону через 24 години проведення експерименту в 1,7 рази, а через 48 годин його рівень був в 1,5 рази нижче в порівнянні з таким на початку експерименту (Рис. 1). В тканинах коріння проростків морозостійкого сорту Одеська 16 вміст глутатіону зріс через 48 годин експерименту в 1,8 рази, у слабоморозостійкого сорту Безоста 1 зростання практично не відбувалося. Активність глутатіонпероксидази в тканинах надземної частини проростків у морозостійкого сорту через 48 годин експерименту зростала в 3,4 рази, а у слабоморозостійкого сорту знижувалася в 1,9 рази. При цьому слід підкреслити, що через 24 години проведення експерименту відбувалося різке зниження активності цього ферменту в 1,9 та 5,8 рази відповідно. В тканинах коріння через 24 години пророщування реєструвалося різке збільшення активності глутатіонпероксидази у сорту Одеська 16 (в 16,4 рази) та зниження активності цього ферменту у сорту Безоста 1 (в 2,7 рази). В тканинах коріння проростків досліджених сортів через 48 годин проведення експерименту спостерігалось збільшення активності глутатіонпероксидази, проте, у морозостійкого сорту це зростання було більш значним (в 6,1 та 1,7 рази відповідно). Характер зміни активності глутатіонредуктази у морозостійкого сорту в тканинах надземної частини проростків дещо відрізнявся від такого для глутатіонпероксидази: відсутність змін через 24 години та зростання через 48 годин експерименту. В тканинах коріння у цього сорту реєструвалося плавне зростання активності глутатіонредуктази. У слабоморозостійкого сорту як в тканинах надземної частини проростків, так і в тканинах коріння, встановлено зниження активності даного ферменту, особливо різке в тканинах коріння через 24 години експерименту (в 9 разів).

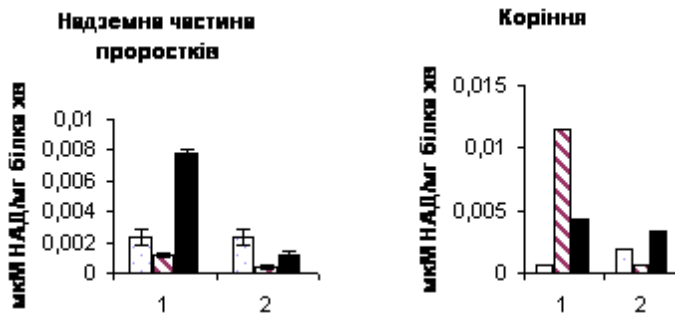
В тканинах надземної частини проростків морозостійкого сорту найвищі показники зміни АОС були встановлені в перші дві години після початку впливу гіпотермії. При цьому відзначалося різке збільшення активності глутатіонпероксидази в тканинах надземної частини проростків і коріння (248 та 329 % відносно контрольних рослин), а також збільшення вмісту глутатіону (240% та 118 % відповідно) (Рис. 2). В той же час був

встановлений цілковито інший характер зміни активності глутатіонредуктази в порівнянні зі зміною активності глутатіонпероксидази у цього сорту. Так, після 2 годинного впливу низької температури активність глутатіонредуктази зростала тільки в тканинах надземної частини проростків (186% відносно контролю). Можна припустити, що активація глутатіонзалежних ферментів та підвищення рівня глутатіону у цього сорту в перші дві години після дії

ВМІСТ ГЛУТАТІОНУ



АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗИ



АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНРЕДУКТАЗИ

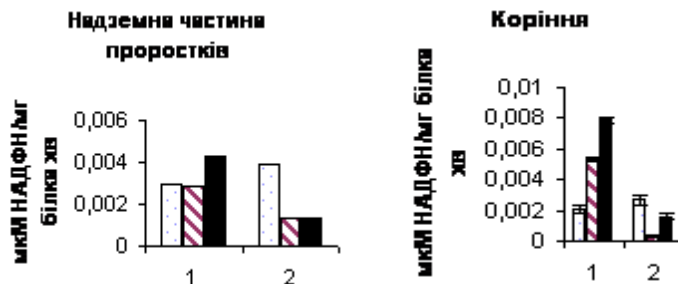


Рис. 1. Показники антиоксидантної системи в контрольній групі проростків озимої пшениці.

1 – Одеська 16; 2 – Безоста 1.

низької температури може опосередковано впливати на інтенсивність вільнорадикальних процесів. Відомо, що глутатіонпероксидаза здатна каталізувати реакції руйнування пероксида водню, наслідком чого є підвищення резистентності клітин до дії АФК. Крім того, не виключено, що у морозостійкого сорту при гіпотермії з'являються ізоформи цих ферментів, більш пристосовані до даних температур та які відсутні у нормі.

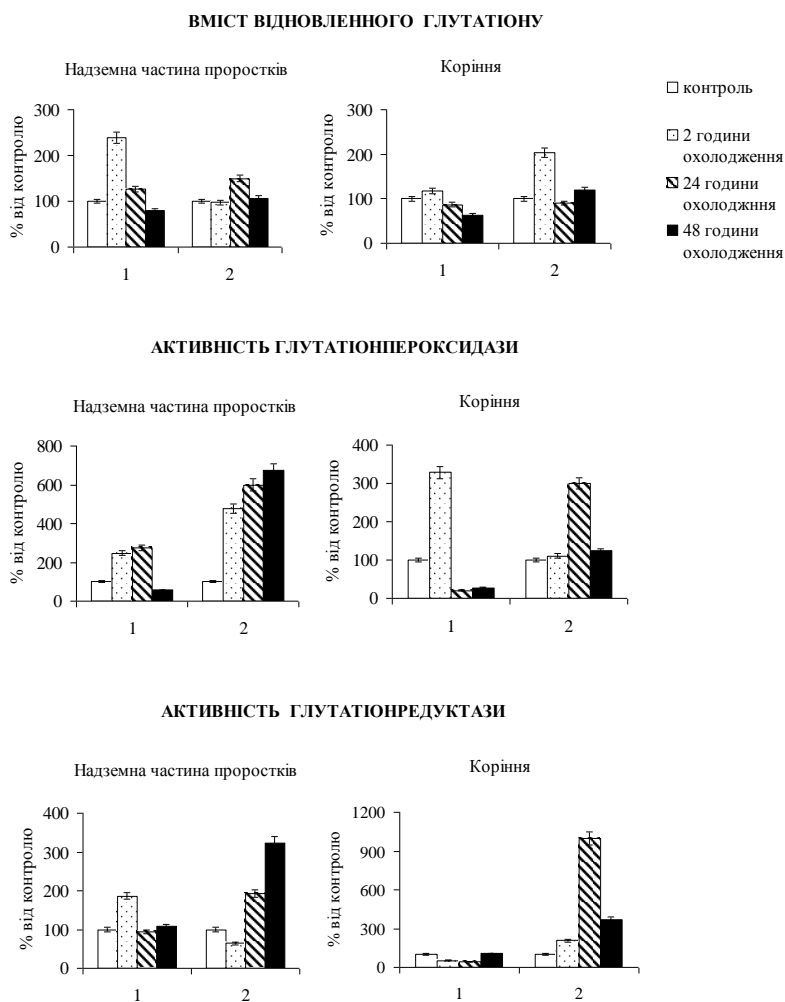


Рис. 2. Показники антиоксидантної системи в проростках озимої пшениці після впливу низької температури.

1 – Одеська 16; 2 – Безоста 1.

У слабморозостійкого сорту після двогодинної дії низької температури так само відзначалася активація АОС. Вміст відновленого глутатіону у цього сорту в умовах гіпотермії в тканинах коріння також зростає в перші години експерименту (203 %, відносно контролю), проте, через 24 години, його рівень знижувався та складав 90 % відносно контролю, а потім через 48 годин проведення експерименту його рівень перевищував контрольний на 20 % . В тканинах надземної частини проростків високий

вміст глутатіону реєструвався через 24 години після впливу низької температури (150 % відносно контролю).

Низька позитивна температура справляє значний вплив на активність глутатіонзалежних ферментів в тканинах надземної частини проростків слабоморозостійкого сорту. Так, в перші години впливу низької температури активність глутатіонпероксидази в тканинах надземної частини проростків значно збільшувалася та складала 478 та 600 % відносно контролю відповідно), а максимальний пік активності глутатіонпероксидази встановлений через 48 годин проведення експерименту (675 % в порівнянні з контрольними рослинами). В тканинах коріння у цього сорту максимальна активність глутатіонпероксидази була зареєстрована після 24 годин дії низької температури (300 % в порівнянні з контролем).

Характер зміни активності глутатіонредуктази дещо різнився. В перші дві години впливу низької температури в тканинах надземної частини проростків слабоморозостійкого сорту, на відміну від морозостійкого сорту, зареєстроване зниження активності глутатіонредуктази (64 % відносно контролю) з подальшим збільшенням її активності через 24, 48 годин проведення експерименту (209 та 323 % відносно контролю відповідно). В тканинах коріння цього сорту високий рівень активності глутатіонредуктази спостерігався на всіх термінах проведення експерименту (207, 1000 та 369 % відносно контролю відповідно).

Незбалансованість роботи АОС у цього сорту при гіпотермії ймовірно пов'язана з різкими змінами обміну речовин, завдяки чому порушується єдність роботи окремих компонентів цієї захисної системи.

Висновки. Резюмуючи одержані результати, можна констатувати наступне. В стресових ситуаціях можуть активуватися окремі компоненти антиоксидантної системи, тоді як активність інших компонентів залишається незмінною або піддається порівняно невеликим змінам. Адаптація сортів пшениці, які відрізняються за морозостійкістю, до впливу низьких температур відбувається внаслідок неспецифічної реакції зміни активності глутатіонзалежних ферментів, вмісту глутатіону та інших показників АОС. Виявлені відмінності в ході впливу низьких позитивних температур за зміною рівня компонентів АОС мають не тільки теоретичне, але й практичне застосування: для діагностики стійкості рослин до низьких температур.

Список літератури

1. Scandalios J.G. Oxygative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. // *Braz.J.Med. Biol. Res* – 2005 – V.38 – N.7 – P.995-1014.
2. Scebba S., Sebastiani L., Vitagliano K. Changes in activity antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seeding under cold acclimation. // *Plant Physiol.* – 1998. – V.104. – P.742-752
3. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. Активность

антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения. // Физиология растений. – 2002. – Т.49. – С. 878-885.

4. Радюк М.С., Доманская И.Н., Щекбоков Р.А., Шальго Н.В. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя. // Физиология растений. – 2009. – Т.56. – С. 193-199.

5. Сыщиков Д.В., Гришко В.М. Функціонування глутатіонзалежної антиоксидантної системи у гороху, сої та кукурудзи за дії сполук кадмію. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т.26. – № 6. – С.503-509.

6. Гришко В.М., Сыщиков Д.В. Перекисное окисление липидов и функционирование некоторых антиокислительных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении фтористым водородом. // Укр. биохим. журн. – 1999. – Т.71. – №3. – С.52-53.

7. Гришко В.Н. Глутатион: синтез, деградація и физиологическая роль у растений. // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2006. – Вип.1(8). – С.21-33.

8. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона. // Успехи современной биологии. – 1990. – Т.110. – вып.1(4). – С.20-33.

9. Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Бацманова Л.М. Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т.36. – №1. – С.3-14.

10. Foyer C.H. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. // Plant Cell Environ. – 1994. – V.17. – N.2. – P.507-523.

11. Булгакова Е.Б., Храпова Н.Т. Перекисное окисление липидов и природные антиоксиданты. // Успехи химии. – 1985. – Т.54. – вып.9. – С.1540-1546.

12. Климов С.В. Пути адаптации растений к низким температурам. // Успехи современной биологии. – 2001. – Т.121. – С.3-22.

13. Гришко В.Н., Сыщиков Д.В. Метод определения восстановленной формы глутатиона в вегетативных органах растений. // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т.74 – №46. – С.123-124.

14. Lowry O.N., Rosenbrough N.J., Fatt A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. // J.Biol. Chem. – 1951. – V.193. – N.1. – P.265-275.

Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Тихонов П.С., Узлякова И.В. Влияние низкой температуры на содержание глутатиона и активность глутатионзависимых ферментов в проростках сортов озимой пшеницы, различающихся по морозостойкости.

Представлены результаты изучения антиоксидантной системы (АОС) у разных по морозостойкости сортов озимой пшеницы (Triticum

aestivum L.) при действии низких температур. Изученные сорта различаются по содержанию глутатиона и активности глутатионзависимых ферментов даже на уровне контрольных растений. Неодинаковый характер изменения компонентов АОС при действии низких температур свидетельствует об их участии в ответных реакциях растений пшеницы. Однако уровень адаптационных перестроек в значительной степени определяется генотипом. Высказано предположение, что сдвиг в сторону уменьшения или увеличения уровня показателей АОС является эффективным показателем оценки степени влияния стрессового фактора на растения.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., гипотермия, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, глутатион.

Adamovskaya V. G., Molodchenkova O.O., Tykhonov P.S., Uzlyakova I.V. Low temperature impact on glutathione content and glutathione dependent enzymes' activity of varieties of winter wheat seedlings which differ in frost resistance.

*Results of investigation of antioxidant system in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties which differ in frost resistance at low temperature impact are presented. Investigated varieties differ in glutathione content and glutathione dependent enzymes' activity even in control seedlings. Different changes of antioxidant system's components due to low temperature impact implies their participation in wheat plants' response. However, adaptational reorganization substantially depends on a genotype. Changes towards decrease or increase component's level of antioxidant system are suggested to be the effective index for estimation of degree of the stress factor impact on plants.*

Key words: *Triticum aestivum* L., hypothermia, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione.