

БІОХІМІЯ

УДК 577.1

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

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

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ ВИРОЩУВАННЯ ТА САХАРОЗИ НА АКТИВНІСТЬ АСКОРБАТ ПЕРОКСИДАЗИ У *ARABIDOPSIS THALIANA* В УМОВАХ ТЕПЛООВОГО СТРЕСУ

Досліджено вплив екзогенної сахарози та температури вирощування на активність аскорбат пероксидази (АРХ) у листках арабідопсису за дії теплового стресу.

Доведено, що для рослин, які зростали при 20°C присутність сахарози в інкубаційному буфері необхідна для стабілізації АРХ і за умов помірного (37°C) теплового стресу, тоді як у рослин, що культивувались за 28°C, фермент залишався стабільним і за відсутності сахарози. За дії жорсткого теплового стресу підвищена температура попереднього культивування та присутність сахарози у буфері є факторами, які забезпечують часткову стабілізацію АРХ.

Ключові слова: аскорбат пероксидаза, *Arabidopsis thaliana*, тепловий стрес, сахароза

Вступ. Температура є одним із чинників навколишнього середовища, який здатний суттєво впливати на фізіолого-біохімічні процеси у рослин. Зростання температури вище оптимального рівня змінює швидкість ферментативних реакцій, а подальше її збільшення призводить до денатурації багатьох білків [12]. У відповідь на зростання температури в рослинній клітині активуються транскрипційні фактори теплового шоку, які, в свою чергу, запускають експресію генів, що кодують білки теплового шоку (heat shock proteins – HSP). Унаслідок цього при підвищених, але не летальних температурах у рослинній клітині синтезується велика кількість HSP [14, 21], які належать до групи молекулярних шаперонів і запобігають денатурації білків, утворенню білкових агрегатів або виконують репаративні функції.

Крім денатурації білків, надмірне зростання температури викликає посилене утворення в клітинах рослин активних форм кисню (АФК). Ці сполуки, з одного боку, є токсичними, оскільки пошкоджують білки, ліпіди та ДНК, а з іншого – виступають у ролі сигнальних молекул [17, 19], які впливають на експресію багатьох генів [10] і беруть участь в активації та регуляції захисних генетичних програм в умовах стресу. Зокрема показано, що підвищення вмісту АФК в умовах стресу призводить до активації експресії генів, що кодують HSP шаперонової природи та антиоксидантні ферменти, здатні знешкоджувати АФК [15]. До таких ферментів належить, зокрема аскорбат пероксидаза (АРХ), яка розщеплює пероксид водню.

Існують дані про те, що захищати білки від денатурації та підтримувати цілісність мембранних структур, крім білків-шаперонів, здатні також дисахариди, які можуть накопичуватися в клітині в умовах стресу. Такий ефект було показано, наприклад для *Vigna aconitifolia* в умовах теплового стресу [11]. Екзогенне застосування трегалози під час сольового стресу призводило до підвищення активності антиоксидантних ферментів у рису [13]. Також продемонстровано, що цукри можуть зв'язувати АФК: у рослин *Arabidopsis thaliana*, які були оброблені глюкозою, зменшувався вміст синглетного кисню та пероксиду водню [16].

Важлива метаболічна функція сахарози добре відома, зокрема встановлена її роль в якості сигнальної молекули [20]. Припускають, що здатність сахарози впливати на експресію генів може бути пов'язана з її участю у контролі оксидативного стресу [9]. Проте, незважаючи на велику кількість даних про захисні властивості сахарози, все ще залишається не до кінця дослідженим її вплив на антиоксидантні ферменти в умовах теплового стресу. Для прояснення цього питання ми дослідили зміни активності аскорбат пероксидази (АРХ) у листках *A. thaliana* за дії підвищених температур.

Матеріал і методи досліджень

В якості об'єкту для досліджень були обрані рослини *A. thaliana* екотипу Columbia 0. Рослини вирощували у ґрунті в культивативній кімнаті при сталій температурі 20°C, освітленні 2,5 кЛк в умовах 16-годинного світлового дня. Після 6,5 тижнів для частини рослин температуру вирощування збільшували до 28°C та продовжували культивування ще 48 год. Такий режим культивування, як показано в наших попередніх дослідженнях, підсилює клітинну відповідь рослин *A. thaliana* на тепловий стрес [15]. Другу частину рослин продовжували культивувати за температури 20°C.

Для проведення теплової обробки обрізали листки середньої частини розетки та поміщали їх в конічні скляні колби об'ємом 100 мл, які містили інкубаційний буфер. Було використано два варіанти буферу: 1 мМ К-фосфат (рН 6,0) із додаванням або без додавання 1% сахарози. Подальшу обробку на термостатованій водяній бані здійснювали в темряві протягом 2 та 4 годин за 20, 37 або 44°C. Контролем слугували рослини, листки яких інкубували за 20°C. Після завершення обробки листки заморожували в рідкому азоті та зберігали в морозильній камері за температури -70°C для подальших досліджень. Як додатковий контроль використовували інтактні листки, які заморожували безпосередньо після відокремлення від рослини.

Екстракцію клітинних білків проводили в буфері, що складався із 50 мМ натрій-фосфату (рН=7,0), 0,25 мМ ЕДТА, 10% гліцерину, 2% полівінілпіролідону-25 та 1 мМ аскорбату. Загальну активність АРХ визначали за описаною в літературі методикою [6]. Кількість білка в екстракті визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [7].

Всі експерименти проводили у чотирьох біологічних та трьох аналітичних повторностях. Статистичну вірогідність отриманих даних оцінювали з використанням двовибіркового t-критерію для залежних вибірок [1].

Результати досліджень та їх обговорення

Отримані нами дані показали, що за дії 2-годинного помірного теплового стресу (37°C) у порівнянні з контрольними пробами (20°C) незалежно від присутності сахарози в інкубаційному буфері, відсутні зміни в активності АРХ як у рослин, вирощених за 20°C, так і за 28°C (рисунок). Однак, при збільшенні тривалості стресової обробки до 4-х годин спостерігались відмінності у рослин, які інкубувались за різних режимів. Так, проведення стресової обробки в присутності сахарози не викликало змін в активності ферменту, в той час як за відсутності сахарози відбувалось зниження активності АРХ на 29%, але лише у рослин, які попередньо постійно вирощували за 20°C.

Інша картина спостерігалась для рослин, що зазнали жорсткого теплового стресу (44°C). У цьому випадку відмічено суттєве зниження активності АРХ, проте характер цих змін був різним залежно від умов вирощування та стресової обробки. В цілому, у листках, які інкубували в буфері в присутності сахарози, інактивація ферменту була меншою, ніж у тих, що інкубували в буфері без сахарози. Так, після 2-годинної жорсткої стресової обробки (44°C) в присутності сахарози спостерігалось зниження активності АРХ на 72% у рослин, які вирощувались за 20°C та на 65% – у рослин, які попередньо культивували за 28°C. Активність ферменту знижувалась ще більше за 4-х годинного стресу. При цьому у листках рослин, які постійно вирощували при 20°C, залишкова активність АРХ становила лише 16% від активності, виявленої у контрольних зразках, тоді як у рослин, вирощених при 28°C, залишкова активність ферменту складала 25%.

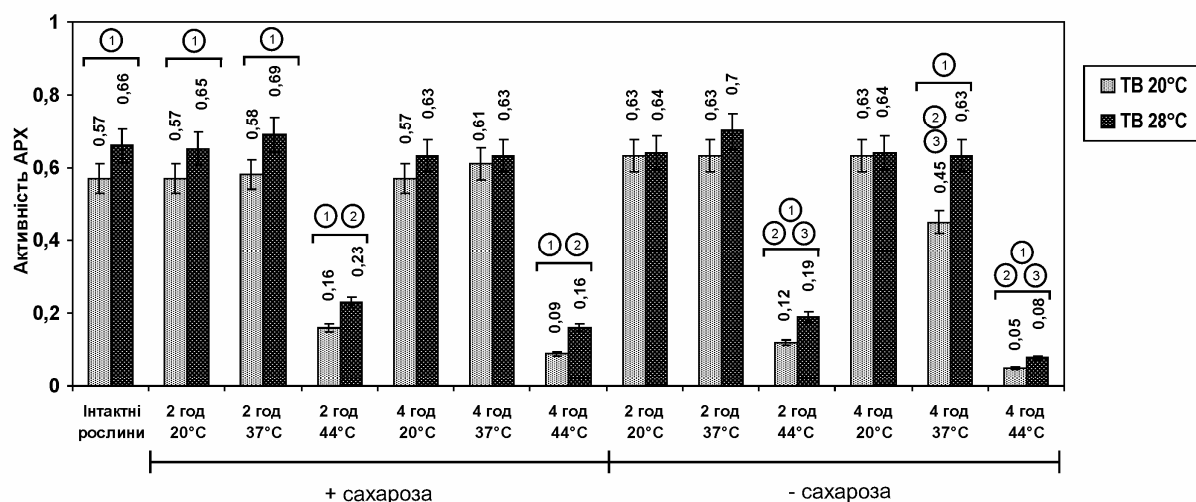


Рисунок. Активність аскорбат пероксидази (мкмоль/хв/мг білка) у листках *A.thaliana* за дії теплового стресу. 1 – різниця між рослинами, що культивувались при 20°C та 28°C достовірна; 2 – різниця між стресованими та контрольними зразками достовірна; 3 – різниця між зразками, які піддавались стресовій обробці в присутності або за відсутності сахарози достовірна (P<0,05). ТВ – температура вирощування.

У зразках, що зазнали дії жорсткого теплового стресу, за відсутності сахарози було виявлено більш суттєве зниження активності APX. Зокрема, після 2-годинної інкубації відмічено падіння активності на 81% для рослин, температура вирощування яких була 20°C. Водночас у рослин, які культивували за 28°C, зниження активності ферменту становило 70%. За більш тривалого стресу протягом 4 годин активність ферменту знижувалась на 92 та 87% для рослин, вирощених, відповідно, за 20 та 28°C.

Слід також зазначити, що у свіжозрізаних листках рослин, які культивували за 28°C, активність APX виявилась на 16% вище, ніж у рослин, які зростали за 20°C. Отже, підвищення температури культивування викликає зростання активності цього ферменту. Аналогічний ефект спостерігався нами й раніше [2, 15].

Порівняння абсолютних значень активності APX показує, що після застосування найбільш жорсткого режиму стресової обробки (4 год. 44°C), активність ферменту була (1) в 1,6-1,8 рази вище у рослин, які культивували за 28°C, та (2) в 1,8-2,0 рази вище у зразках, які інкубували у присутності сахарози. Аналогічні ефекти спостерігались і при проведенні обробки протягом 2 год., але різниця була менш вираженою. Отже, отримані дані свідчать, що за дії жорсткого теплового стресу підвищена температура попереднього культивування та присутності сахарози у буфері є факторами, які забезпечують часткову стабілізацію APX. Для рослин, що постійно зростали при 20°C, присутність сахарози в інкубаційному буфері виявилась необхідною для стабілізації APX і за умов помірного теплового стресу (4 год. 37°C), тоді як у рослин, що культивували за 28°C, фермент залишався стабільним і за відсутності сахарози. Стабілізуючу роль дисахаридів було показано і раніше для листків огірка в умовах посухи, при додаванні екзогенної сахарози [8]. Водночас більшу активність/стабільність APX у листках рослин, які зростали за 28°C, можна пояснити підсиленою експресією гена, який кодує цей фермент, або підсиленою експресією білків-шаперонів, які здатні його стабілізувати. При цьому слід пам'ятати, що за умов жорсткого теплового шоку повноцінна стресова відповідь у листках арабідопсису відсутня, зокрема транскрипція генів HSP суттєво знижена [15, 18]. З огляду на це, стає зрозумілим суттєве зниження активності APX при використанні обробки за 44°C. Відповідно, за цих умов (тобто нестачі білків-шаперонів) протекторна здатність сахарози стає особливо помітною.

Попередні дослідження нашої лабораторії показали, що жорсткий тепловий стрес призводить до суттєвого підсилення перекисного окислення ліпідів [3] та карбонілювання білків [5] в листках *A. thaliana*. Ці спостереження добре узгоджуються з нашими новими даними, оскільки у попередніх дослідах стресова обробка проводилась за відсутності сахарози в інкубаційному буфері. Отже, видається, що різке підвищення концентрації ТБКАП та карбонільних груп за цих умов пов'язане з інактивацією АРХ (а також гваяколпероксидази, POD – [4]) у рослин арабідопсису.

Висновки

Культивування рослин *A. thaliana* за підвищеної нестресової температури (28°C) протягом 48 год. та присутність сахарози в інкубаційному буфері під час проведення подальшої жорсткої (44°C) стресової обробки є факторами, які забезпечують часткову стабілізацію АРХ. Для рослин, що зростали при 20°C, присутність сахарози в інкубаційному буфері необхідна для стабілізації АРХ і за умов помірного (37°C) теплового стресу, тоді як у рослин, які культивували за 28°C фермент залишався стабільним і за відсутності сахарози.

1. Буджак В. В. Біометрія / В.В. Буджак — Чернівці: Рута, 2013. — 326 с.
2. Буздуга І. М. Метаболічна компенсація у мутантів *Arabidopsis thaliana* із втраченою активністю каталази / І.М. Буздуга, Р.А. Волков, І.І. Панчук // Цитология и генетика. — 2018. — Т. 52, No 1. — С.41—51.
3. Долиба І. М. Перекисне окислення ліпідів у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та *KO-Cat2* мутантної лінії за дії теплового стресу / І.М. Долиба, Т.О. Руснак, Р.А. Волков, І.І. Панчук // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2012. — Т. 10, No 2. — С. 193—201.
4. Руснак Т. О. Активність гваяколпероксидази у нокаутної лінії *KO-Cat2 Arabidopsis thaliana* за умов теплового стресу / Т.О. Руснак, І.М. Долиба, Р.А. Волков, І.І. Панчук // Физиол. биохим. культурных растений. — 2013. — Т. 45, No 3. — С. 246—253.
5. Руснак Т. О. Окисна модифікація білків у *Arabidopsis thaliana* дикого типу та мутантної лінії *KO-Cat2* за дії теплового стресу / Т.О. Руснак, Р.А. Волков, І.І. Панчук // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2013. — Т. 11, No 2. — С. 260—266.
6. Amako K. Separate assays for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants / K. Amako, G. Chen, K. Asada // Plant Cell Physiol. — 1994. — V. 35, No 1. — P. 497—504.
7. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analyt. Biochem. — 1976. — V. 72, No 1-2. — P. 248—254.
8. Cao Y.-Y. Exogenous sucrose influences antioxidant enzyme activities and reduces lipid peroxidation in water-stressed cucumber leaves / Y.-Y. Cao, M.-T. Yang, S.-Y. Chen, Z.-Q. Zhou et al. // Biologia Plantarum. — 2015. — Vol. 59, No 1. — P. 147—153.
9. Couee I. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants / I. Couee, C. Sulmon // J. Exp. Bot. — 2006. — Vol. 57, No 3. — P. 449—459.
10. Gilroy S. ROS, Calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants / M. Białasek, N. Suzuki, M. Górecka, A. R. Devireddy, S. Karpiński, R. Mittler // Plant Physiol. — 2016. - Vol. 171, No 3. — P. 1606—1615.
11. Harsh A. Effect of short-term heat stress on total sugars, proline and some antioxidant enzymes in moth bean (*Vigna aconitifolia*) / Y.K. Sharma, U. Joshi, S. Rampuria, G. Singh, S. Kumar, R. Sharma // Annals of Agricult. Sci. — 2016. — Vol. 61, No 1. — P. 57—64.
12. Hasanuzzaman M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants / M. Hasanuzzaman, K. Nahar, Md. M. Alam, R. Roychowdhury, M. Fujita // Int. J. Mol. Sci. — 2013. — Vol. 14, No 5. — P.9643—9684.
13. Nounjan N. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes / N. Nounjan, Ph. T. Nghia, P. Theerakulpisut // J. Plant Physiol. — 2012. - Vol. 169, No 1. — P. 596—604.
14. Ohama N. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response N. Ohama, H. Sato, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // Trends in Plant Sci. — 2017. - Vol. 22, No. 1. — P. 53—65.
15. Panchuk I.I. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* / I.I. Panchuk, R.A. Volkov, F. Schöfl // Plant Physiology. — 2002. — V. 129, No 2. — P.838—853.

16. *Ramel F.* Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* / Ramel F., Sulmon C., Bogard M. // *BMC Plant Biol.* — 2009. — Vol. 9, No 28. — P. 9—28.
17. *Suzuki N.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress / N. Suzuki, S. Koussevitzky, R. Mittler, G. Miller // *Plant, Cell, Environment.* — 2012. — V. 35, No 2. — P. 259—270
18. *Volkov R.A.* Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR / R.A. Volkov, I.I. Panchuk, F. Schöfl // *J. Experiment. Bot.* — 2003. — V. 54, No 391. — P. 2343—2349.
19. *Volkov R.A.* Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* / R.A. Volkov, I.I. Panchuk, P.M. Mullineaux, F. Schöfl // *Plant Molecular Biol.* — 2006. — V. 61, No 4-5. — P. 733—746.
20. *Wind J.* Sucrose: metabolite and signaling molecule / J. Wind, S. Smeekens, J. Hanson // *Phytochemistry.* — 2010. — Vol. 71, No 14-15. — P. 1610—1614.
21. *Zhang N.* Adaptive divergence in transcriptome response to heat and acclimation in *Arabidopsis thaliana* plants from contrasting climates / N. Zhang, E. Vierling, S. Tonsor // *bioRxiv.* — 2016.

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

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫРАЩИВАНИЯ И САХАРОЗЫ НА АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТ ПЕРОКСИДАЗЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* В УСЛОВИЯХ ТЕПЛООВОГО СТРЕССА

Исследовано влияние экзогенной сахарозы и температуры выращивания на активность аскорбат пероксидазы (АРХ) в листьях арабидопсиса под воздействием теплового стресса.

Доказано, что для растений, которые росли при 20°C, присутствие сахарозы в инкубационном буфере необходимо для стабилизации АРХ и в условиях умеренного (37°C) теплового стресса, тогда как у растений, культивируемых при 28°C, фермент оставался стабильным и в отсутствие сахарозы. В условиях жесткого теплового стресса повышенная температура предварительного культивирования и присутствие сахарозы в буфере являются факторами, обеспечивают частичную стабилизацию АРХ.

Ключевые слова: аскорбат пероксидаза, *Arabidopsis thaliana*, тепловой стресс, сахароза

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

Yuri Fedkovych University of Chernivtsi, Ukraine

THE INFLUENCE OF CULTIVATION TEMPERATURE AND SUCROSE ON THE ACTIVITY OF ASCORBATE PEROXIDASE IN THE ARABIDOPSIS LEAVES UPON HEAT STRESS

An increase of environmental temperature (heat stress) results in denaturation of proteins. In response, numerous heat shock proteins (HSP), some of which represent molecular chaperones, are expressed in the plant cell. The HSP can protect other proteins from denaturation. In addition to chaperones, different low molecular compounds including disaccharides are also involved in stabilization of proteins upon high temperature. Also, elevated temperatures enhance the generation of reactive oxygen species. This is accompanied by activation of protective antioxidant enzymes, in particular ascorbate peroxidase (APX).

The influence of exogenous sucrose and growth temperature on the activity of APX in the *Arabidopsis* leaves upon heat stress has been investigated. In the absence of sucrose in the incubation buffer, moderate stress treatment (37°C for 4 hours) decreased the APX activity by 29% in plants previously grown at 20°C. In the presence of sucrose or in plants cultivated at 28°C no decrease of the enzyme activity was found.

After 2 hours of severe stress treatment (44°C) in the presence of sucrose, a decrease in APX activity by 72% and 65% was observed in plants cultivated, respectively, at 20°C and 28°C. The activity of the enzyme decreased even more after 4 hours of stress treatment: in the leaves of plants constantly grown at 20°C, the residual activity of APX was only 16% of the activity detected in control samples, whereas in plants grown at 28°C, the residual activity was 25%.

A more significant decrease in APX activity was detected in the samples exposed to 44°C in the absence of sucrose. In particular, decreasing of activity by 81% and 70% was detected after 2 hours of treatment for plants cultivated at 20°C and 28°C. Similar, the decrease in enzyme activity was 92% and 87% after 4 hours of severe heat stress.

It was also demonstrated that after severe stress treatment (4h 44°C), the APX activity was (1) 1.6-1.8 times higher in plants cultivated at 28°C and (2) 1.8-2.0 times higher in leaves that were incubated in the presence of sucrose.

Thus, it has been proven that for plants that were grown at 20°C, the presence of sucrose in the incubation buffer is necessary for thermal stabilization of APX activity upon moderate (37°C) heat stress. In contrast, in plants pre-cultivated at 28°C the enzyme remained active in the absence of sucrose. Elevated cultivation temperature and the presence of sucrose in the incubation buffer are factors that provide partial stabilization of APX upon severe heat stress.

Key words: ascorbate peroxidase, Arabidopsis thaliana, heat stress, sucrose

Рекомендує до друку
Н. М. Дробик

Надійшла 02.08.2017

УДК 546.76:599.323.4

О. Я. ЛУКАШІВ, О. І. БОДНАР, В. В. ГРУБІНКО

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 46027

КОРЕКЦІЯ ОБМІНУ РЕЧОВИН У ЩУРІВ СЕЛЕНХРОМЛІПІДНИМ КОМПЛЕКСОМ З *CHLORELLA VULGARIS* ВІЕJ ТА СПОЛУКАМИ ХРОМУ(III) І СЕЛЕНУ(IV) ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

Доведено переважаючий позитивний вплив селенхромліпідного комплексу з *Chlorella vulgaris* Віеj. порівняно з неорганічними сполуками хрому (III) і селену (IV), на метаболічні процеси у щурів за стрептозотоцин-нікотинамід-індукованого цукрового діабету 2-го типу на тлі ожиріння. Зазначений комплекс більшою мірою сприяв нормалізації низки показників антиоксидантної системи, покращенню вуглеводного обміну, зниженню інтоксикаційного фону, який супроводжує цукровий діабет. Ліпідні субстанції з водоростей, збагачені мікроелементами, є перспективнішими у профілактиці та корекції метаболічних і регуляторних процесів, ніж неорганічні солі хрому і селену.

Ключові слова: біологічно активні добавки, цукровий діабет, селен, хром, водорості

Значна поширеність, а відтак небезпека цукрового діабету обумовлюється тим, що він є базою для розвитку складних супутніх захворювань та ускладнень, передусім метаболічних та регуляторних, за його участі активуються в організмі вільнорадикальні процеси. Цукровий діабет (ЦД) 2-го типу належить до мікроелементозів, оскільки на його тлі спостерігається дисбаланс життєво необхідних елементів, насамперед Cr^{3+} [1]. При недостатньому його надходженні в організмі виникають метаболічні порушення, симптоми яких подібні до тих, що виникають при цукровому діабеті [12]. За результатами досліджень [13] при лікуванні цукрового діабету у людей важливим є застосування йонів хрому, який відіграє важливу роль в підтриманні нормального рівня глюкози в крові, знижує рівень холестеролу та триацилгліцеролів у плазмі, а в комплексі із селеном – інгібує розвиток оксидативного стресу [15].