



Л.М. БАЦМАНОВА, Н.Ю. ТАРАН, М.М. МУСІЄНКО

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна

ПРООКСИДАНТИ-АНТИОКСИДАНТИ В ЛИСТКАХ ПШЕНИЦІ СТЕПОВОГО ЕКОТИПУ ЗА ДІЇ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ

Ключові слова: пероксид водню, озима пшениця, пероксидне окиснення ліпідів, супероксиддисмутаза, ТБК-активні продукти, оксидативний стрес

Як відомо, активні форми кисню (АФК) можуть бути посередниками при передачі сигналів, що сприяють формуванню стійкості рослин до дії абіотичних стресів [10]. Найпростішим та інформативним методом з'ясування ролі АФК в індукції стійкості рослин є штучна зміна про-антиоксидантної рівноваги у тканинах. Найзручнішою моделлю створення оксидного стресу є обробка надземної частини рослин пероксидом водню [8]. За даними літератури відомий позитивний вплив екзогенного пероксиду водню на стійкість рослин до дії низьких [2] і високих [9] температур, осмотичного [13] та сольового [4] стресів. Ми показали, що обробка пшениці пероксидом водню оптимізує її метаболічні процеси, стимулює розвиток адаптаційних реакцій та підвищує зернову продуктивність [6]. Проте досі недостатньо досліджено особливості індукції стійкості до окиснювальних ушкоджень і характер змін про-антиоксидантної активності в рослин.

Тому метою роботи було дослідження активності про-оксидантів–антиоксидантів різних сортів озимої пшениці степового екотипу, що зростають на Поліссі за дії пероксиду водню.

Об'єкти та методи досліджень

Ми вивчали фізіолого-біохімічні показники рослин сортів озимої пшениці степового екотипу: Лада одеська, Тронка, Одеська 267, Херсонська безоста, Шостипалівка, Алмаз, Скала. Рослини вирощували у дрібноділянкових (10 м²) дослідках на полях Інституту землеробства НААН України в умовах Полісся, на сірих лісових легкосуглинкових ґрунтах. Агротехнічна обробка — загальноприйнята для зони вирощування.

Вивчаючи процеси формування неспецифічної резистентності в досліджуваних сортах, двічі (з інтервалом у три доби) проводили позакореневу обробку дослідних рослин H₂O₂ у концентрації 1·10⁻⁴ М, контрольні обробляли дистильованою водою. Рослини обприскували навесні (фаза кушіння), коли товщина кутикулярного шару листків і стебел мала, що є передумовою проникнення діючої речовини. На 1 м² витрачали 1 л розчину H₂O₂. За 24 години вивчали реакцію рослин на дію стресора, а у фазу молочновоскової стиглості (МВС) — ступінь адаптації рослин.

Пероксидне окиснення ендогенних ліпідів виявляли в надосадовій рідині гомогенату рослинних тканин за утворенням одного з кінцевих продуктів пероксидації — ТБК-активних продуктів, вміст яких встановлювали за величиною екстинції продукту їхньої конденсації з тіобарбітуровою кислотою [1]. Активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) визначали за Чеварі зі співавтор. [7]. Наважку листків 300 мг гомогенізували у 20 мл 50 мМ калійфосфатного буферу, рН 7,8. Гомогенат центрифугували 15 хв за 7000 г (з охолодженням), супернатант використовували як грубий екстракт цитозольної

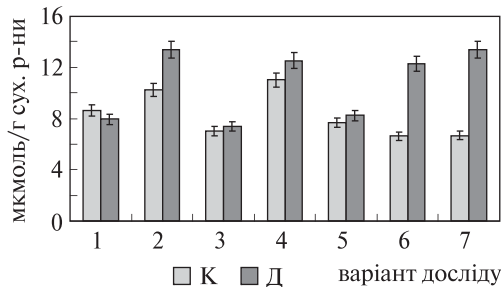


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у листках озимої пшениці за дії H₂O₂ (1·10⁻⁴ М) після першої обробки. Тут і на рисунках 2—6: 1 — Херсонська безоста; 2 — Лада Одеська; 3 — Одеська 267; 4 — Тронка; 5 — Алмаз; 6 — Скала; 7 — Шостипалівка

Fig. 1. Content of TBA-active products in leaves of winter wheat under H₂O₂-treatment (1·10⁻⁴ M) after the first application. Here and on the fig. 2—6: 1 — Khersonska Unbearded; 2 — Lada Odeska; 3 — Odeska 267; 4 — Tronka; 5 — Almaz; 6 — Skala; 7 — Shostypalivka

Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів у листках озимої пшениці за дії H₂O₂ (1·10⁻⁴ М) після другої обробки

Fig. 2. Content of TBA-active products in leaves of winter wheat under H₂O₂-treatment (1·10⁻⁴ M) after the second application

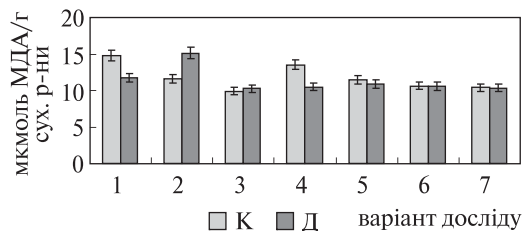


Рис. 3. Вміст ТБК-активних продуктів у листках озимої пшениці за дії H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-4}$ М), фаза МВС

Fig. 3. Content of TBA-active products in leaves of winter wheat under H_2O_2 -treatment ($1 \cdot 10^{-4}$ M) at the stage of milky-wax ripeness

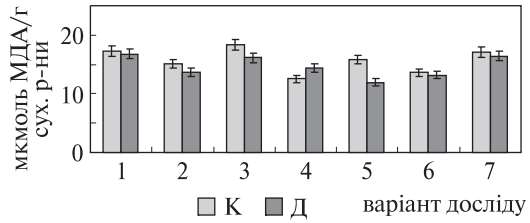
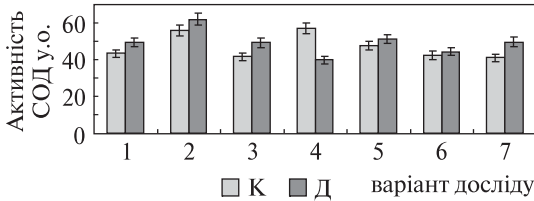


Рис. 4. Активність СОД у листках озимої пшениці за дії H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-4}$ М) після першої обробки

Fig. 4. Activity of SOD in leaves of winter wheat under H_2O_2 -treatment ($1 \cdot 10^{-4}$ M) after the first application

фракції СОД. Інкубаційне середовище містило 1,3 мМ рибофлавіну, 13 мМ метіоніну, 63 мкМ нітросинього тетразолію (НСТ), 0,1 мМ ЕДТА та ферментний екстракт. Реакцію запускали додаванням рибофлавіну з подальшою інкубацією 20 хв на білому світлі (освітлення 4000 лк на рівні пробірок). Максимальною кількістю формазану була у варіанті без ферментного екстракту (буфер, рН 7,8). Вимірювали оптичну густина ($\lambda = 560$ нм) проти контрольного варіанта, який витримували в темряві. Метод ґрунтується на здатності СОД інгібувати відновлення нітросинього тетразолію радикалами супероксиду на світлі за наявності рибофлавіну та метіоніну. За одиницю активності ферменту брали 50 % пригнічення утворення формазану.

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики [3]. Повторність усіх дослідів — триразова, вірогідність різниці між середніми арифметичними значеннями показників встановлювали за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали суттєвими за $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Згідно з нашими даними, за дії пероксиду водню у рослин озимої пшениці розвивався оксидативний стрес, що засвідчувало підсилення процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), причому на інтенсивність пероксидації ліпідів значною мірою впливають генетичні особливості сорту (рис. 1).

Серед дослідних сортів є як стійкі до дії пероксиду водню, так і досить чутливі. За стійкістю до оксидативного стресу вигідно вирізняються сорти Херсонська безоста, Одеська 267, Алмаз, у яких вміст ТБК-активних продуктів залишався на рівні контрольних варіантів. Проте у таких сортів, як Шостипалівка, Скала, Лада одеська, Тронка, процеси ПОЛ розвивалися достатньо інтенсивно. Кількість ТБК-активних продуктів у тканинах цих сортів збільшувалась: у Шостипалівки — удвічі, Скали — в 1,8, Лади одеської — у 1,3, Тронки — в 1,1 раза, що засвідчує доволі високу чутливість фотосинтетичних тканин до впливу стресора такої інтенсивності.

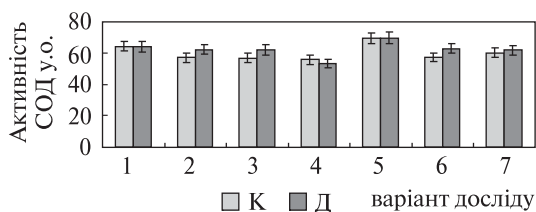
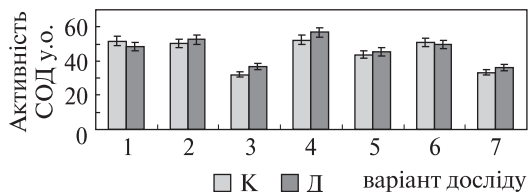


Рис. 6. Активність СОД у листках озимієї пшениці за дії H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-4}$ М) фаза МВС
 Fig. 6. Activity of SOD in leaves of winter wheat under H_2O_2 -treatment ($1 \cdot 10^{-4}$ M) at the stage of milky-wax ripeness

Рис. 5. Активність СОД у листках озимієї пшениці за дії H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-4}$ М) після другої обробки

Fig. 5. Activity of SOD in leaves of winter wheat under H_2O_2 -treatment ($1 \cdot 10^{-4}$ M) after the second application



Після повторної обробки рослин перексидом водню процеси ПОЛ стабілізувалися у більшості дослідних сортів (рис. 2). Вміст ТБК-активних продуктів на рівні контрольних варіантів був у сортів: Шостипалівка, Скала, Одеська 267, Алмаз, проте у Лади одеської, як і раніше, підвищувався (на 29,8 %). Водночас у рослин сортів Херсонська безоста і Тронка їхній вміст суттєво знижувався порівняно з контролем — на 20 та 22 % відповідно.

У наступну фазу онтогенезу, МВС, спостерігалось поступове гальмування інтенсивності процесів ПОЛ (рис. 3). Концентрація ТБК-активних продуктів значно знижувалася у рослин сорту Алмаз (на 24,6 %), а також в Одеської 267 (на 12,2 %) і Лади одеської (на 9,2 %). У сортів Херсонська безоста, Скала, Шостипалівка їхній вміст був на рівні контрольних варіантів, тоді як у Тронки відзначено тенденцію до його зростання.

Отже, після першої обробки рослин перексидом водню розвивався оксидативний стрес у фотосинтетичних тканинах рослин більшості сортів, про що свідчить накопичення ТБК-активних продуктів. Процеси пероксидації стабілізувалися після повторної обробки, така ж тенденція зберігалася й у фазу МВС в усіх сортів, окрім Тронки. Можна припустити, що зниження інтенсивності процесів ПОЛ після другої обробки пов'язане з переадаптацією за першої обробки перексидом водню, в результаті чого підвищувалася їхня неспецифічна резистентність, зокрема за рахунок активації антиоксидантних ферментів.

Як відомо [5], з інтенсивністю ПОЛ пов'язана активність СОД — одного з ферментів, що обриває ланцюги кисеньзалежних вільнорадикальних реакцій у клітинах. Так, за першої обробки активність СОД збільшувалась у рослин сортів Шостипалівка (на 21 %), Одеська 267 (на 18 %), Херсонська безоста (на 14 %), Лада одеська (на 10 %) (рис. 4), у рослин сортів Алмаз та Скала вона залишалася на рівні контрольних варіантів, а в Тронки суттєво знижувалася (на 30 %). Після повторної обробки перексидом водню у рослин дослідних сортів активність СОД була на рівні контрольних варіантів (рис. 5), така ж картина зберігалася й у фазу МВС у всіх сортів, окрім Одеської 267, в якій вона зросла на 14 % (рис. 6). Встановлено,

що за дії екзогенного пероксиду водню або токсикантів, які зумовлюють оксидативний стрес, водночас підсилюються синтез глутатіону та активність СОД [11]. Також відомо, що активність СОД регулюється багатокомпонентною редокс-системою клітини. Інтермедіати окисно-відновного метаболізму виступають тригерним механізмом: індукують синтез ферменту за збільшення концентрації донорів електронів або пригнічують — за накопичення акцепторів [12].

Отже, одержані дані щодо впливу пероксиду водню на рослини озимої пшениці степового еко типу свідчать про те, що пероксид водню у фізіологічних концентраціях ($1 \cdot 10^{-4}$ М) може бути індуктором захисних реакцій за умов подвійної обробки їх надземної частини. На формування реакції-відповіді впливають генетичні особливості сорту.

Висновки

Адаптаційні реакції рослин пшениць степового еко типу, що зростають за межею природного ареалу в умовах оксидативного стресу, індукованого пероксидом водню, спрямовані на стабілізацію про-антиоксидантної рівноваги у фотосинтетичних тканинах. У стійких сортів ця рівновага відновлюється швидше.

1. *Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А.* Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // *Лаб. дело.* — 1988. — № 11. — С. 41—43.
2. *Зауралов О.А.* Влияние перекиси водорода на холодоустойчивость теплолюбивых растений // *Агрохимия.* — 2003. — № 12. — С. 42—45.
3. *Маслов Ю.И.* Установление степени достоверности (значимости) различий между сериями измерений // *Методы биохим. анализа раст.* — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. — С. 415—424.
4. *Нариманов А.А.* Влияние перекиси водорода на солеустойчивость растений // *Агрохимия.* — 2001. — № 7. — С. 57—60.
5. *Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф.* Биологическая роль супероксиддисмутазы // *Укр. биохим. журн.* — 1989. — **61**, № 2. — С. 14—27.
6. *Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Грудіна Н.С. та ін.* Вплив пероксиду водню на зернову продуктивність рослин озимої пшениці в умовах Полісся // *Вісн. аграр. науки.* — 2008. — № 9. — С. 21—25.
7. *Чевару С., Чаба И., Секей Й.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лаб. дело.* — 1985. — № 11. — С. 678—681.
8. *Bhattacharjee S.* Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants // *Curr. Sci.* — 2005. — Vol. 89. — P. 1113—1121.
9. *Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M.* Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H_2O_2 // *J. Exp. Bot.* — 1998. — Vol. 49. — P. 713—720.
10. *Mittler R.* Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* — 2002. — **7**. — P. 405—410.
11. *Scandalios J.G.* Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 2005. — Vol. 38, N 7. — P. 995—1014.
12. *Vanacker H., Sandalio L., Jiménez A. et al.* Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants // *J. Exp. Bot.* — 2006. — Vol. 57, N 8. — P. 1747—1758.
13. *Xu Y.C., Wang J., Shan L.* Effect of H_2O_2 stress hardening on drought resistance of wheat seedlings // *Acta Bot. Boreali-Occident. Sin.* — 2000. — Vol. 20. — P. 382—386.

Рекомендує до друку
Л.І. Мусатенко

Надійшла 24.11.2010 р.

Л.М. Бацманова, Н.Ю. Таран, Н.Н. Мусяенко

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

ПРООКСИДАНТЫ-АНТИОКСИДАНТЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ СТЕПНОГО ЭКОТИПА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Изучалось изменение интенсивности пероксидного окисления липидов и активности супероксиддисмутазы под действием пероксида водорода в листьях озимой пшеницы степного экотипа, которая произрастает на Полесье. Показано, что адаптивные реакции в этих условиях направлены на стабилизацию равновесия прооксидантов-антиоксидантов. Ответная реакция предопределяется генетическими особенностями сорта. У более устойчивых сортов это равновесие восстанавливается быстрее.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пероксид водорода, озимая пшеница, пероксидное окисление липидов, супероксиддисмутаза, ТБК-активные продукты, окислительный стресс.

L.M. Batsmanova, N.Yu. Taran, M.M. Musienko

National Taras Shevchenko University of Kyiv

PROOXIDANTS-ANTIOXIDANTS IN PHOTOSYNTHETIC TISSUES OF WHEAT OF STEPPE ECOTYPE UNDER H₂O₂ ACTION

Changes of lipid peroxidation intensity and activity of superoxide dismutase in photosynthetic tissue of winter wheat of steppe ecotype cultivated in Polissya condition have been studied. Plant adaptive reactions under research condition are directed on stabilization of prooxidant-antioxidant balance. Response-reaction is defined by genetic peculiarities of cultivar. It is investigated, that more tolerant cultivar restores that balance faster.

K e y w o r d s: hydrogen peroxide, winter wheat, lipid peroxidation, superoxide dismutase, TBA-active products, oxidative stress.