

РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ СОД И ЛИПОКСИГЕНАЗЫ В ПРОЦЕССАХ НАКОПЛЕНИЯ АФК В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ И CO₂ - СРЕДЫ

А. Н. Ершова, О. С. Бердникова

*Воронежский государственный педагогический университет,
Поступила в редакцию 04.12.2012 г.*

Аннотация. В условиях кратковременной (3-24 ч) гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода активность антиоксидантного фермента СОД была значительно выше в клетках более устойчивых проростков сои, чем у неустойчивых растений гороха во все сроки действия гипоксического стресса. Впервые показано, что липоксигеназный путь образования АФК был достаточно эффективным как в клетках проростков гороха, так и сои, но только в первые часы действия гипоксии. На более поздних этапах активность липоксигеназы в проростках гороха существенно (5-6 раз) снижалась, а у сои сохранялась на уровне аэрируемых растений. Отмечено, что CO₂-среда усиливала эффекты гипоксии на активность данных ферментов. Это подтверждает способность диоксида углерода выступать в роли сигнальной молекулы у растений в условиях гипоксии.

Ключевые слова: активные формы кислорода, липоксигеназа, супероксиддисмутаза, гипоксия, CO₂-среда, растения.

Abstract. Under short term (3-24 h) hypoxia and media of high concentrations of carbon dioxide an activity of antioxidant enzyme of SOD was significantly higher in more tolerant soy seedlings cells than in non-tolerant pea plants during all time periods of hypoxic stress. For the first time was shown that lypoxigenase pathway of ROS formation was relatively efficient as in pea seedlings cells as in soy but during first hours of hypoxia. On later stages the lypoxigenase activity in pea seedlings was significantly decreasing (5 to 6-fold) but in soy stayed the same of aerated plans. It was noted that CO₂-media increased an effect of hypoxia on those enzymes. This fact proves the ability of carbon dioxide to play the role of signaling molecules in plants under hypoxia.

Keywords: reactive oxygen species, lypoxigenase, superoxide dismutase, hypoxia, CO₂-media, plants.

ВВЕДЕНИЕ

Растения на разных этапах своего развития (проращивание семян, избыточное переувлажнение, весеннее затопление) попадают в условия дефицита кислорода (гипоксия). В таких условиях в клетках растений усиливаются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [1,2]. Повышение скорости ПОЛ при гипоксии может являться следствием активации неферментативных свободнорадикальных процессов, которые приводят к образованию активных форм кислорода (АФК).

Ряд авторов считает [3], что процессы перекисной окисления липидов могут протекать в растениях в условиях гипоксии, но значительно усиливаются при возвращении их на воздух. В тоже время в клетках проростков гороха и сои, отличающихся устойчивостью [4], было обнаружено усиление процессов образования супероксидных анион-радикалов, гидропероксидов, пероксида водорода, которые определяли методами спектрофотометрии и биохемилюминесценции, в условиях даже кратковременной гипоксии. При этом у более устойчивых проростков сои образование разных типов АФК проходило менее интенсивно.

© Ершова А. Н. , Бердникова О. С. , 2013

но, чем у неустойчивых проростков гороха.

Существуют два механизма образования АФК: ферментативный и неферментативный [1,3]. Ферментативное образование гидропероксидов жирных кислот происходит в основном за счет повышения активности фермента липоксигеназы [5]. Растительные липоксигеназы (КФ 1.13.11.12), которые являются представителями диоксигеназ, интенсивно окисляют не только свободные, но и связанные в фосфолипидах полиненасыщенные жирные кислоты, что отражается на проницаемости биологических мембран [1]. Известно [1], что интенсивность накопления АФК в клетках растений зависит и от активности ферментов антиоксидантной защиты, одним из которых является супероксиддисмутаза (СОД) (КФ 1.15.1.1). Фермент СОД катализирует превращение супероксидного анион-радикала до пероксида водорода, который является наиболее стабильным и долгоживущим типом АФК. В связи с этим данному ферменту отводится важная роль в защите клеток и тканей растений от окислительной деструкции. В литературе встречаются различные данные по изменению активности СОД в растениях при действии гипоксии. У устойчивого к аноксии вида ириса активность СОД возрастала, а у менее устойчивого растения манника наоборот, снижалась [2]. Однако в клетках устойчивых растений риса в условиях гипоксии не отмечалось изменения активности СОД [1]. Известно, что высокие концентрации диоксида углерода усиливают все эффекты гипоксии, включая изменение активности ряда ферментных систем [1,6,7]. Нами была исследована [4] активность антиоксидантных ферментов, таких как каталазы, аскорбатпероксидазы и общей пероксидазы в растениях в условиях гипоксии и CO_2 среды. Однако в данных условиях исследование основного фермента антиоксидантной защиты СОД не проводилось.

Изучали влияние условий кратковременной гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода на активность ферментов липоксигеназы и супероксиддисмутазы, контролирующих уровень АФК в клетках про-

ростков, различающихся устойчивостью к дефициту кислорода.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили 10 – дневные проростки гороха (Рамонский 77) и сои (Белгородская 48), выращенных методом гидропоники. Надземную часть проростков помещали в темновых условиях в газовые среды: воздух (контроль), азот и CO_2 (100%), на 3 – 24 часа [4]. Для определения активности ферментов использовали тканевые гомогенаты. Навеску растительного материала (0,5-1 г) растирали с 0,05 М К-фосфатным буфером (рН 7,0), фильтровали и центрифугировали (15 мин, 8000 об/мин). Активность СОД определяли спектрофотометрически по скорости окисления NADH в присутствии нитросинего тетразолия и феназинметасульфата по методике [8] в нашей модификации. Липоксигеназу определяли по скорости окисления линолевой кислоты [5] и рассчитывали в ФЕ на мг белка, содержание которого определяли по Lowry. Все эксперименты проводили в 2-х биологических и 2-х аналитических повторностях. На рисунках представлены результаты типичных опытов в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследовали активность липоксигеназы в клетках проростков различных растений при действии гипоксии и CO_2 – среды. Как видно из данных, представленных на рис.1, активность липоксигеназы у проростков гороха была с первых часов действия газовых сред выше уровня аэрируемых растений и через 3 часа на 40 % превышала контроль. Полученные данные совпадают с работой [9], в которой было обнаружено увеличение активности липоксигеназы в клетках клубней картофеля при гипоксии. При действии высоких концентраций диоксида углерода активность липоксигеназы в проростках также увеличивалась только на 20 %. На протяжении последующих часов опыта активность липоксигеназы снижалась. К концу опыта CO_2 – среда

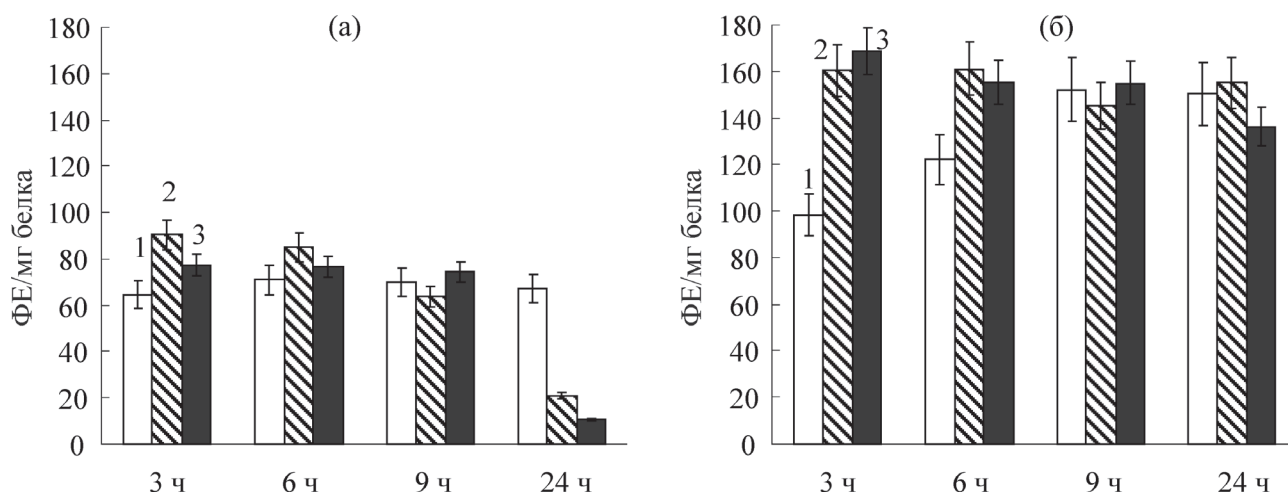


Рис. 1 Активность липоксигеназы в проростках гороха (а) и сои (б) в разных газовых средах: 1 – контроль (воздух), 2 – гипоксия, 3 – СО₂-среда.

вызывала снижение активности данного фермента в клетках в 3 раза, а гипоксия почти в 5 раза по сравнению с уровнем его активности у контрольных проростков гороха.

В клетках более устойчивых проростков сои наблюдалась другая тенденция. В первые часы действия на растения гипоксии и среды высоких концентраций диоксида углерода активность фермента возрастала на 60-70 %. Однако затем наблюдалось снижение активности липоксигеназы и через 6 часов гипоксии она уменьшалась на 40 %. В условиях СО₂ – среды активность липоксигеназы в клетках проростков сои также падала и к 9 часам снижалась до аэрируемых растений. Полученные результаты подтверждают данные нашей предыдущей работы [4], в которой было обнаружено значительное накопление гидропероксидов в тканях неустойчивых к гипоксии растений гороха, и менее значительное их образование в растениях сои.

Как известно [8] фермент СОД, наряду с каталазой и пероксидазами, участвует в детоксикации образовавшихся АФК в клетках растений, что позволяет контролировать их уровень в условиях действия различных факторов, включая дефицит кислорода. Ранее было показано [4], что при действии кратковременной гипоксии в клетках проростков гороха уровень супероксидных анионрадикалов, гидропероксидов и пероксида водорода, был выше, чем у более устойчивых проростков сои. В меньшей степени в данных условиях у проростков гороха повышалась и

активность антиоксидантных ферментов каталазы и аскорбатпероксидазы.

При исследовании изменений активности СОД в проростках гороха и сои при действии гипоксии было установлено, что активность фермента значительно различалась в их тканях (рис. 2). В проростках гороха активность СОД возрастала на 75 % через 6 часов действия гипоксического стресса, однако затем снижалась до уровня аэрируемых растений. В среде высоких концентраций диоксида углерода активность СОД возрастала почти также значительно, но только на более поздних сроках экспозиции (9 часов). В тоже время, в клетках среднеустойчивых проростков сои активность СОД была значительно выше (в 2,5 раза) уже через 6 часов действия гипоксии и далее возрастала еще вдвое. Влияние СО₂ – среды на растения сои вызвало еще большее повышение активности фермента. Активность СОД возрастала почти в 4 раза по сравнению с аэрируемыми растениями и до конца опыта оставалась столь же значительной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных опытов было показано, что в клетках проростков гороха и сои при действии гипоксического стресса наблюдалось повышение активности фермента липоксигеназы, который вызывает накопление гидропероксидов. При этом липоксигеназный ферментативный путь накопления АФК, наряду с неферментативным, был одинаково

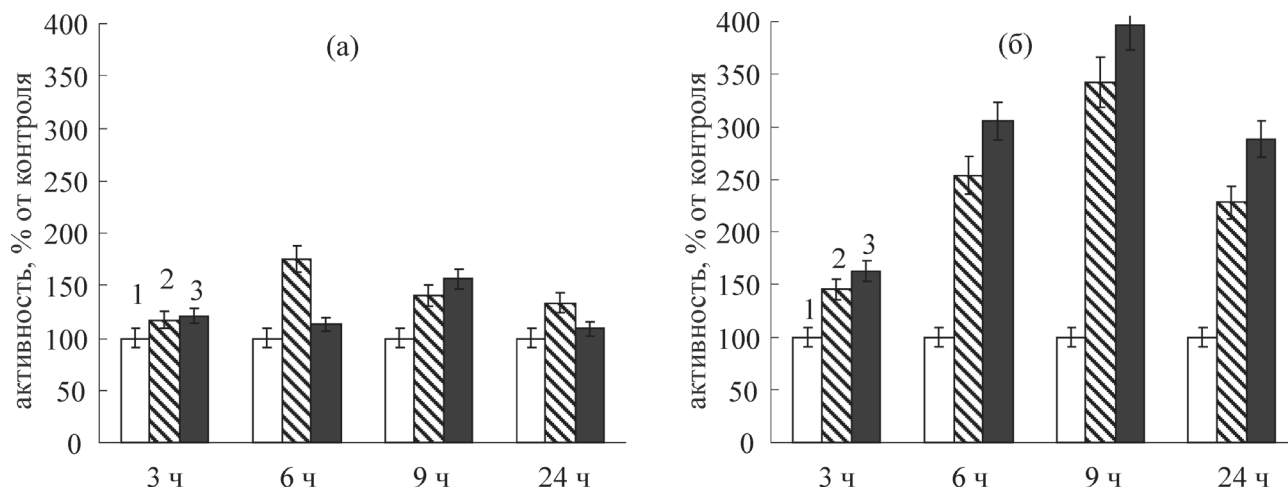


Рис. 2 Активность СОД в проростках гороха (а) и сои (б) в условиях разных газовых сред: 1 – контроль (воздух), 2 – гипоксия, 3 – СО₂-среда.

активным как у неустойчивых растений гороха, так и у более устойчивых растений сои, но только в первые часы действия гипоксии и СО₂ – среды. С увеличением сроков экспозиции этот путь образования АФК в клетках растений гороха тормозился, и включались другие механизмы их накопления. Это могло быть следствием падения активности антиоксидантных ферментов каталазы и аскорбатпероксидазы, что наблюдалось нами ранее у растений [4].

Проведено исследование активности СОД – одного из важнейших фермента антиоксидантной защиты в клетках растений в условиях гипоксии и СО₂ – среды. Показано менее значительное повышение активности СОД у неустойчивых проростков гороха, по сравнению с более устойчивыми растениями сои. В клетках проростков сои активность СОД возрастала в 2,5-4 раза через 6 часов действия на растения гипоксического стресса и оставалась такой же высокой до конца опыта, что позволяло сдерживать процессы образования АФК в их клетках. Это подтверждает результаты наших предыдущих работ, в которых был отмечен более низкий уровень накопления всех типов АФК в клетках сои при действии гипоксии, чем у менее устойчивых проростков гороха [1,4].

Полученные данные подтверждают наличие корреляции между степенью устойчивости растений к гипоксии и активностью антиоксидантных ферментов, включая СОД. При

этом впервые показано, что липоксигеназа способствует накоплению АФК в клетках как неустойчивых, так и устойчивых растений к гипоксии, но только в первые часы действия. В дальнейшем у неустойчивых растений активность фермента резко снижалась или оставалась на уровне аэрируемых растений у среднеустойчивых проростков сои. Подобное поведение фермента липоксигеназы в клетках растений вызывает необходимость проведения дополнительных опытов, в которых был бы определен вклад хлоропластной, митохондриальной и цитоплазматической формы в процессы накопления АФК у растений в условиях гипоксического стресса.

Как было показано в нашей работе высокие концентрации СО₂, в отличие от гипоксии, оказывали более существенное влияние на активность как липоксигеназы, так и СОД в растениях. Это проявлялось как в более сильном торможении активности липоксигеназы у проростков гороха и сои в последние часы опыта, так и в более значительном повышении активности СОД у этих растений, начиная уже с первых часов действия этой газовой среды. Эти данные подтверждают специфичность действия высоких концентраций СО₂ – среды на активность ферментов в клетках растений, которое не связано с изменением рН, а является результатом его влияния на их физико-химические и кинетические свойства [6,7]. Накапливаясь как продукт дыхательного обмена, диоксид углерода может включать

системы адаптации растений к условиям гипоксического стресса, что позволяет отнести этот компонент газовой среды к группе низкомолекулярных сигнальных молекул [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2007. — 264 с.

2. Monk L.S. Superoxide Dismutase as an Anaerobic Polypeptide: A Key Factor in Recovery from Oxygen Deprivation in *Iris pseudacorus* / L.S. Monk, K.V. Fagerstedt, R.M.M. Crawford // *Plant Physiol.* — 1987. — V. 85. — P. 1016-1020.

3. Blokhina O. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review / O. Blokhina, E. Virolainen, K. Fagerstedt // *Ann. Bot.* — 2003. — V. 91. — P. 179-194.

4. Ершова А.Н. Продукция активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений гороха и сои при действии гипоксии и CO₂ – среды / А.Н. Ершова, Н.В. Попова, О.С. Бердникова // *Физиология растений.* — 2011. — Т. 58. — № 6. — С. 834-843.

5. Активность липоксигеназы в растениях с индуцированной устойчивостью / Л.И.

Ильинская [и др.] // *Физиология растений.* — 2000. — Т. 47. — С. 516-523.

6. Ершова А.Н. Выделение, хроматографическая очистка и свойства β-глюкозидазы растений гороха, подвергнутых воздействию гипоксии и CO₂-среды / А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова // *Сорбционные и хроматографические процессы.* — 2009. — Т. 9. — вып. 5. — С. 714-720.

7. Ершова А.Н. Влияние гипоксии и CO₂-среды на трансгликозидазную активность цитоплазматической и связанных с клеточной стенкой молекулярных форм гликозидазы растений гороха / А.Н. Ершова, О.Н. Баркалова, А.С. Фатуллаева // *Вестник ВГУ, серия Химия. Биология. Фармация.* — 2011. — №2. — С. 88-91.

8. Прадедова Е.В. Супероксиддисмутаза вакуолей клеток растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Салаяев // *Биологические мембраны.* — 2009. — Т. 26. — № 1. — С. 21-30.

9. Pavelic D. Impact of Post-Anoxia Stress on Membrane Lipids of Anoxia-Pretreated Potato Cells. A Re-Appraisal / D. Pavelic, A. Arpaugaus, R. Brandle // *Plant Physiol.* — 2000. — V. 124. — P. 1285-1292.

Ершова Антонина Николаевна — Воронежский государственный педагогический университет, заведующая кафедрой биологии растений и животных, доктор биологических наук, профессор, e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Бердникова Ольга Сергеевна — Воронежский государственный педагогический университет, аспирант кафедры биологии растений и животных, e-mail: olgaberdn@mail.ru

Ershova Antonina N. — Voronezh State Pedagogical University, chief of biology of plant and animals department, doctor of biology science, professor, e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Berdnikova Olga S. — Voronezh State Pedagogical University, post-graduate student of biology of plant and animals department, olgaberdn@mail.ru