

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ СЕМЯН СОИ

В.А. Кузнецова,
аспирантка

Благовещенский государственный педагогический
университет
675000, Амурская область, г. Благовещенск, ул.
Ленина, 104
Тел/факс: (4162)52-41-64, E-mail: rektorat@bgpu.ru

Ключевые слова: соя, пероксидаза, удельная активность, множественные формы, температурный стресс, термостабильность

УДК 581.5:577.15

Введение. Устойчивость живых систем является фундаментальной характеристикой организма. Она проявляется в стабильности и надежности его структурного состояния, химического, физического и компонентного состава, а также в постоянстве и стабильности общих закономерностей его индивидуального развития. Надежность растительного организма определяется его способностью не допускать нарушений структурной организации и функциональной активности клеток в условиях экологического стресса, который может различаться по природе, интенсивности и продолжительности воздействия [1]. Если компенсаторные силы организма способны противостоять воздействию, то метаболическая система организма после окончания воздействия возвращается к исходному уровню, быстро восстанавливает возникшие нарушения, мобилизуя свой адаптационный потенциал. Предупреждение или устранение отрицательных последствий стрессовых факторов на организм обеспечивается системой антиоксидантной защиты, в том числе рядом

антиоксидантных ферментов, к которым относится пероксидаза [1].

Среди физиолого-биохимических факторов защиты растений от стрессовых воздействий пероксидазу рассматривают как одну из важнейших каталитических систем, активно участвующих в авторегуляции метаболизма при стрессе. Влияние экстремальных факторов среды, в т.ч. высоких температур, приводит к активации пероксидазы в различных тканях и органах живых систем. Установлено, что при температурных прогревах, не убивающих клетку, возможны процессы, способствующие восстановлению нарушенных структур и функций [2].

Многие растения обладают выраженной устойчивостью к действию экстремальных температур, но обычно она не является их постоянным свойством, а формируется в процессе воздействия некоторых тепловых условий. При настройке адаптационных систем растительные организмы приобретают способность переносить экстремальную теплообеспеченность. Кроме естественных температур, ферменты могут кратковременно выдерживать более высокие температуры, что характеризует термоустойчивость фермента. Важную роль в условиях температурного стресса играет микроокружение фермента в клетке. Установлено, что не только величина действующей температуры, но и ее колебания в течение времени обуславливают повреждения растений [2].

У растений имеется широкий набор изоформ пероксидазы. Спектр форм пероксидаз характеризуется весьма высокой лабильностью, что дает основание отнести ее к маркерам физиологического состояния растений [3]. Множественные формы пероксидаз представляют собой мономерные белки, которые кодируются разными генами. Некоторые формы могут быть продуктами одного гена, возникающими в результате модификации на посттранскрипционном/посттрансляционном уровнях [4]. Разнообразие множест-

венных форм пероксидаз – результат изменений аминокислотного состава белковой части молекулы фермента, состава углеводной части или агрегации низкомолекулярных форм фермента [3].

Большая часть форм пероксидаз семян сои имеет среднюю электрофоретическую подвижность [5]. Множественные формы осуществляют разные функции в растении: одни участвуют в процессах роста, другие выполняют защитную роль, обеспечивая растению возможность в условиях стрессовых факторов получать энергию, необходимую для поддержания жизнедеятельности. Множественные формы энзима, работающие в растении в различные периоды роста и развития, характеризуются тем, что способны окислять разные субстраты и действуют при неодинаковых условиях окружающей среды. Перестройка ферментной системы обеспечивает устойчивость организма к воздействию внешних факторов и регуляцию гомеостаза. Потенциальные возможности растения по устойчивости к неблагоприятным условиям среды реализуются под действием экстремального фактора достаточной напряженности, не превышающей порогового значения. Адаптация растений к экстремальным воздействиям среды – сложный комплекс процессов, координируемых системой саморегуляции организма [3].

Изучение термоустойчивости ферментов и белков в последствии стресса несет важную информацию, т.к. в его основе лежат изменения свойств макромолекул. Однако данных относительно термостабильности ферментов сои, и ее связи с жаро- и засухоустойчивостью недостаточно. Мало изучено влияние условий среды на активность пероксидазы сои.

В связи с вышеизложенным, цель нашей работы – изучить термостабильность пероксидаз семян сои в условиях температурного стресса.

Материалы и методы. Семена сои сорта Соната (*Glycine max* (L.) Merr.) получены из ГНУ ВНИИ сои РАСХН (г. Благовещенск, Амурская область).

Для изучения термоустойчивости пероксидаз семена сои прогревали в течение 15 минут при температуре от 20 до 200 °С с интервалом 10 °С (предварительный прогрев), а затем дополнительно эти же семена проращивали в течение 5 ч при температуре 45 °С (температурный стресс). Обработанные таким образом семена сои далее проращивали в течение 48 ч при нормальных условиях, что позволило проверить последствие температурного стресса на активность пероксидаз семян сои и термоустойчивость фермента.

Удельную активность пероксидаз определяли колориметрическим методом по А.Н. Бояркину в модификации А.Т. Мокроносова [6], содержание белка – методом Лоури [7]. Для анализа множественных форм пероксидаз осуществляли разделение белков методом электрофореза в 7,5 %-ном полиакриламидном геле в щелочной буферной системе (рН 8,9). Локализацию форм пероксидаз устанавливали по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). Проявление пероксидаз проводили с использованием в качестве субстрата бензидина [8].

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что в процессе 15-минутного прогрева семян сои, начиная от 20 °С с увеличением температуры, активность пероксидазы постепенно снижается, и только при высокой температуре – 200 °С составляет 25 % от величины начальной активности фермента (рис. 1), что значительно выше, чем для ряда других растений [2]. Полученные данные позволяют сделать вывод, что пероксидаза семян сои является термостабильным ферментом.

Выявлено, что предварительный прогрев семян сои приводит к изменению термостабильности пероксидазы при их проращивании в условиях температурного стресса (рис. 1б). При предварительном прогреве семян в течение 15 минут при температуре 70 и 110 °С и дальнейшем прогреве при температуре 45 °С в течение 5 часов (температурный стресс)

фермент является наиболее термостабильным. Установлено, что в период последействия температурного стресса (рис. 1в), при предварительном температурном прогреве в диапазоне температур от 20 до 70 °С активность пероксидазы возрастает, и максимум активности фермента семян сои наблюдается после температурного прогрева величиной в 70 °С. Дальнейшее увеличение температуры (до 200 °С) при предварительном прогреве приводит к постепенному снижению активности пероксидаз семян сои в период последействия стресса, и при 200 °С активность пероксидаз составляет 25 % от величины начальной активности (рис. 1в).

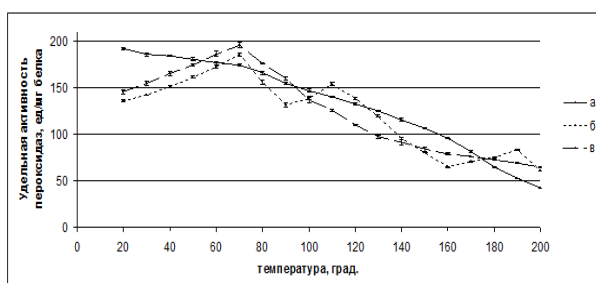


Рисунок 1 – Зависимость удельной активности пероксидазы семян сои от температуры: а – после прогрева семян в течение 15 минут (прогрев); б – после дальнейшего прогрева в течение 5 ч при температуре 45 °С (температурный стресс); в – через 48 ч после действия температурного стресса (последействие стресса).

Значительный интерес представляет то, что прогревание семян сои влияет на компонентный состав множественных форм пероксидаз. При этом появляются новые или исчезают ранее присутствовавшие в спектре формы пероксидаз (рис. 2–4). Анализ электрофоретических спектров пероксидаз показал, что 15-минутный прогрев семян сои при разных температурах приводит к незначительному изменению множественных форм фермента (рис. 2). Максимальное количество форм пероксидаз выявлено в контроле и при невысоких температурах до 40 °С. При дальнейшем увеличении температу-

ры происходит уменьшение количества форм пероксидаз (1–2 формы). В условиях до 80 °С происходит исчезновение высокомолекулярных форм П18, П15, дальнейшее увеличение температуры до 180 °С приводит к исчезновению формы П17, и остается только одна форма – П13, что, возможно, связано с высокой термостойкостью данной формы.

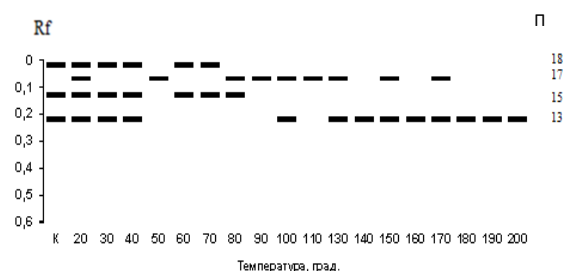


Рисунок 2 – Схемы энзимограмм пероксидаз семян сои после 15-минутного прогрева при разных температурах.

Воздействие высоких температур в течение 15 минут и дальнейшее прогревание семян сои в течение 5 часов при температуре 45 °С (температурный стресс) приводит к изменению количества и появлению новых форм фермента (рис. 3).

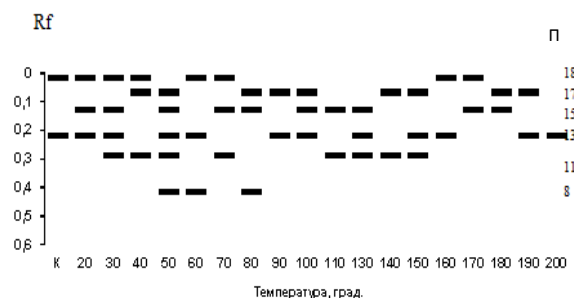


Рисунок 3 – Схемы энзимограмм пероксидаз семян сои после 15-минутного прогрева при разных температурах и дополнительного прогрева семян в течение 5 часов при температуре 45 °С.

Установлено, что прогрев семян сои в условиях температурного стресса способствует восстановлению фракционного состава белков, что соответствует литературным данным [2]. При температуре 70 и 110 °С выявлено наибольшее

количество множественных форм фермента, отсутствующих при кратковременном прогревании и в контроле, что свидетельствует о высоком адаптационном потенциале сои. Причиной усложнения спектра может быть следствие агрегации молекул, изменения их заряда и другие причины, которые отражают перестройки в клетках при прогреве растений [3]. Прогревание при 180–190 °С не приводит к увеличению форм, а, наоборот, к обеднению спектра, что, по-видимому, является следствием процесса денатурации фермента. Нами выявлено, что после прогревания семян сои при 200 °С в течение 15 минут остается только одна форма пероксидазы П13 со средней электрофоретической подвижностью, и дальнейшее прогревание при температуре 45 °С в течение 5 ч не приводит к исчезновению данной формы. Следовательно, установлено, что форма пероксидазы П13 – самая термоустойчивая из всех выявленных форм в данном эксперименте.

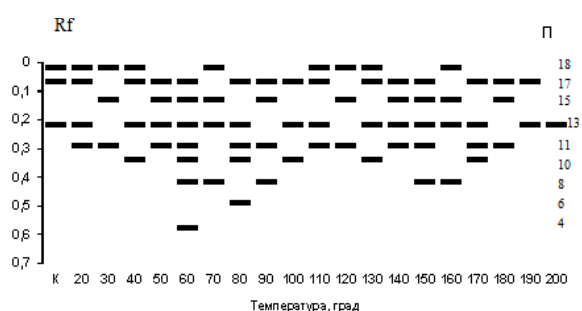


Рисунок 4 – Схемы энзимограмм пероксидаз семян сои в период последствия стресса (через 48 ч после 15-минутного прогрева при разных температурах и дополнительного прогревания в течение 5 ч при температуре 45 °С).

Увеличение количества форм пероксидаз наблюдается и через 48 ч после воздействия стресса. Усложнение электрофоретических спектров пероксидаз может быть следствием агрегации молекул, изменением их заряда, изменением состава углеводной компоненты. Эти изменения, в конечном счете, отражают изменение активности генов в клетках при

прогреве семян. Таким образом, прогрев семян сои приводит к изменению количества множественных форм пероксидаз, что, вероятно, увеличивает термоустойчивость сои.

Выводы. Из полученных данных можно заключить, что реакция сои на температурный стресс при предварительном прогреве при разных температурах имеет качественно различный характер, следовательно, механизмы обеспечения их устойчивости, которые выражаются в изменении активности пероксидазы, неодинаковы. Это может быть связано с синтезом стресс-белков, в том числе пероксидаз, которые выполняют защитные функции. Увеличение количества множественных форм пероксидаз является следствием процесса адаптации сои к температурному стрессу. Выявлено несколько форм пероксидаз семян сои с высокой термоустойчивостью.

Благодарности. Выражаю огромную благодарность научному руководителю к.б.н., профессору Л.Е. Иваченко за неоценимую помощь, оказанную при выполнении исследований, сотрудникам ГНУ ВНИИ сои РАСХН г. Благовещенска за предоставленный биологический материал, генеральному директору ЗАО «Аметис» В.С. Остронкову и председателю совета директоров ЗАО «Аметис» С.А. Лашину за оказание материальной поддержки при выполнении данной работы.

Список литературы

1. *Рогожин, В.В.* Влияние высоких положительных температур на резистентность семян пшеницы и караганы древовидной (*Caragana arborescens* Lam.) / В.В. Рогожин, А.Ю. Романова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 1997. – №1 – С. 36–41.
2. *Сарсенбаев, К.Н.* Роль ферментов в устойчивости растений / К.Н. Сарсенбаев, Ф.А. Полимбетова // АН КазССР, Главный бот. сад. – Алма-Ата: Наука, 1986. – 515 с.
3. *Шуляковская, Т.А.* Динамика изоферментного состава пероксидазы и содержания пигментов в хвое видов *Picea*

dietr, интродуцированных в Южную Карелию / Т.А. Шуляковская, М.К. Ильинова, И.Т. Кищенко // Экологические проблемы Севера. – 2003. – Вып. 6. – С. 123–127.

4. *Суворов, В.И.* Изменение активности пероксидазной системы при действии гипертермии и засоления NaCl / В.И. Суворов, В.А. Чудинова // Вестник Пермского университета. – Пермь, 2004. – Вып. 2. – С. 151–153.

5. *Иваченко, Л.Е.* Ферменты сои / Л.Е. Иваченко // Монография. – Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2010. – 214 с.

6. *Малый практикум по физиологии растений* / Под ред. А.Т. Макроносова. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 184 с.

7. *Плешков, Б.П.* Практикум по биохимии растений / Б.П. Плешков. – М.: Колос, 1985. – 175 с.

8. *Левитес, Е.В.* Генетика изоферментов растений / Е.В. Левитес. – Новосибирск: Наука, 1986. – 145 с.