

## ВПЛИВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ І СИНТЕТИЧНИХ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ ТА ПЕРОКСИДАЗИ У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ

І. М. КУРИЛЕНКО, Т. О. ПАЛЛАДІНА

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного, НАН України, Київ;  
e-mail: ikurilenko@yahoo.com

*Исследовали влияние солевого стресса при 10-дневном культивировании проростков кукурузы на среде Хогланда, содержащей 0,1М NaCl, и регуляторов роста (ивина и метиура) на активность ферментов антиоксидантной защиты каталазы и пероксидазы в корнях и листьях. Установлено, что при воздействии на растения стрессорного фактора активность каталазы и пероксидазы снижается, однако к концу эксперимента увеличивается. В листьях солевой стресс вызывает уменьшение активности каталазы с ее последующим повышением, в то время как активность пероксидазы значительно возрастает и существенно превышает уровень в контроле. Предпосевная обработка зерновок кукурузы препаратами метиур и ивин увеличивает активность обоих ферментов в корнях проростков, выращенных при действии солевого стресса. В листьях эти препараты стимулируют каталазную активность, существенно не влияя на пероксидазную. Полученные результаты свидетельствуют, что изменения активности каталазы и пероксидазы при солевом стрессе направлены на поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия, а обработка зерновок препаратами метиур и ивин, которым присущи антиоксидантные свойства, индуцирует увеличение активности ферментов.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* каталаза, пероксидаза, солевой стресс, регуляторы роста, *Zea mays L.*

Засолення ґрунтів є одним із головних абіотичних факторів, що лімітують продуктивність сільськогосподарських рослин у всьому світі. Механізм виникнення сольового стресу в рослинних організмах полягає в порушенні осмотичного та іонного гомеостазу у клітинах, до якого, як і за дії інших негативних факторів, додається вплив вторинного оксидативного стресу. У клітинах посилюється утворення активних форм кисню (АФК) – супероксид-радикала  $\cdot\text{O}_2$ , гідроксил-радикала  $\cdot\text{OH}$ , пероксиду водню  $\text{H}_2\text{O}_2$  та синглетного кисню  $\text{O}_2^*$ , серед яких найстійкішим є пероксид водню. Ферментативне розщеплення  $\text{H}_2\text{O}_2$  здійснюється каталазою і пероксидазою, через що ці ферменти відіграють значну роль у системі антиоксидантного захисту. Каталаза (КФ 1.11.1.6) характеризується специфічністю лише до пероксиду водню. У рослинних клітинах вона міститься, переважно, в пероксисомах та гліоксисомах, де накопичується  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що було підтверджено дослідями, проведеними із тканинами листків [1] і коренів [2], а також з мікротільцями, мітохондріями та цитоплазмою [3]. У реакціях, які каталізує пероксидаза (КФ 1.11.1.7), пероксид водню є акцептором електронів і бере участь в окисленні багатьох субстратів, зокрема більшості фенолів, ароматичних амінів і деяких легкоокислювальних сполук, наприклад аскорбінової кислоти. У рослинах пер-

оксидазу виявлено в різних компартментах – клітинних стінках, пероксисомах, мітохондріях, хлоропластах, цитоплазмі, вакуолях [4] та ядрах (активність ферменту тестовано також у хромосомах і ядерцях) [5]. На відміну від більшості клітинних структур, де пероксидаза не виявляє специфічності до субстратів, у мітохондріях, хлоропластах і цитоплазмі встановлено наявність аскорбатпероксидази [6].

Відомості стосовно впливу сольового стресу на активність каталази досить неоднозначні, що, вірогідно, пояснюється неоднаковою стійкістю до нього рослин. Так, при вирощуванні проростків томатів на високому для цієї культури рівні засолення середовища в листках резистентного виду спостерігається посилення активності каталази, тимчасом як у солечутливого – її зниження [7]. Зменшення активності цього ферменту за дії стресорного чинника виявлено також у листках шовковиці [3], вігні [8] та проростків рису [9], хоча інші дослідники, які працювали з останнім об'єктом, не встановили за таких умов змін активності каталази ані в листках [10], ані в коренях [11]. Щодо пероксидази, то стимуляцію її активності в разі засолення середовища показано на багатьох рослинних об'єктах [3,4,8,9].

Метою роботи було з'ясувати зміни в активності каталази та пероксидази у тканинах проростків кукурудзи за дії сольового стресу, зумов-

леного наявністю в живильному середовищі NaCl, а також під впливом синтетичних фізіологічно активних речовин росту метіуру та івіну. Раніше нами було встановлено спроможність цих сполук зменшувати спричинене сольовим стресом гальмування росту проростків кукурудзи на тлі зниження в листках і коренях процесів пероксидного окислення ліпідів [12]. Згідно з нашим припущенням, сприятлива дія на рослини зазначених препаратів може бути пов'язана з індукцією ними ферментів антиоксидантного захисту.

### Матеріали та методи

Проростки кукурудзи (*Zea mays* L.) гібриду Колективний 225 МВ вирощували у водній культурі на живильному середовищі Хогланда при 24 °С в умовах 16-годинного світлового дня (освітлення здійснювали люмінесцентними лампами 50 Вт/м<sup>2</sup>). Оброблення рослин регуляторами росту (РР) метіуром та івіном проводили шляхом передпосівного намочування зернівок протягом доби в 10<sup>-7</sup> М розчинах препаратів як описано в роботі [13]. Для індукції сольового стресу 7-добові проростки культивували 10 діб за наявності в живильному середовищі 0,1 М NaCl.

Активність каталази та неспецифічної пероксидази визначали в коренях та листках через 3, 9, 24, 48 та 240 год дії на рослин високої концентрації NaCl. Корені та листки розтирали в порцеляновій ступці в 50 мМ Tris-HCl-буфері (рН 7,8) у співвідношенні 1 : 10 при температурі 0–4 °С. Гомогенат центрифугували 10 хв у центрифугі Jouan GR20.22 (Франція) при 6000 об/хв. В одержаному супернатанті реєстрували активність зазначених ферментів.

Активність каталази визначали спектрофотометричним методом (СФ-2000, Россия) при λ 410 нм [14]. Розрахунки здійснювали, застосовуючи коефіцієнт мілімолярного поглинання молібденового комплексу ( $\epsilon = 22,2 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) і виражали в ммольях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/хв на 1 г сирової речовини.

Активність неспецифічної пероксидази також визначали спектрофотометричним методом з використанням як субстрату пірогалолу при λ = 430 нм [15]. Активність ферменту обчислювали з використанням коефіцієнта мілімолярного поглинання пурпургаліну ( $\epsilon = 2,47 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) і виражали в ммольях пурпургаліну/хв на 1 г сирової маси.

Досліди проводили у трьох біологічних та трьох аналітичних повторностях.

Одержані результати вважали статистично вірогідними, якщо  $p < 0,05$ . Обчислення активності ферментів та побудову графіків здійснювали за допомогою прикладної програми "Microsoft Excel 2000".

В експериментах використовували такі реактиви: Tris («Merck», Німеччина), соляну кислоту, трилон Б, пероксид водню, молібдат амонію, пірогалол кваліфікації х. ч. та ч. д. а. українського виробництва.

### Результати та обговорення

Визначення активності каталази у тканинах проростків контрольного варіанту впродовж 10 діб (починаючи від 7-добового віку) свідчить, що активність каталази в листках значно вища, ніж у коренях (рис. 1; А, Б). При цьому в коренях після деякого підвищення активності ферменту на 9-ту годину експерименту спостерігається дворазове зниження її з подальшим зростанням до початкового рівня. У листках активність каталази через одну добу збільшується, а через 2 зменшується, після чого вже не змінюється до кінця досліду. Активність пероксидази в коренях проростків на порядок перевищує активність каталази, тимчасом як у листках вона збільшується лише в 1,5 раза. До кінця експерименту пероксидазна активність у коренях поступово зростає, починаючи від дев'ятої години експерименту, а в листках знижується майже вдвічі (рис. 2; А, Б).

У тканинах коренів і листків проростків за дії на них NaCl динаміка активності каталази виявилася подібною до контрольного варіанту, хоча її значення впродовж перших двох діб були нижчими (рис. 1; А, Б). Тривале вирощування рослин на сольовому середовищі (до 10 діб) спричинює підвищення активності ферменту в досліджуваних органах у 1,5 раза порівняно з контролем.

Активність пероксидази в коренях проростків кукурудзи за культивування в умовах засолення знижується у 1,5 раза вже на дев'яту годину стресорного впливу (рис. 2, А). У разі більшої тривалості дії сольового стресу активність ферменту поступово зростає, і через 10 діб вірогідної різниці між контрольним та дослідним варіантами не виявлено. У листках проростків, вирощених на NaCl, активність пероксидази значно підвищується порівняно з контрольним варіантом, досягаючи піку на дев'яту годину експозиції, а надалі знижується до рівня контролю (рис. 2, Б).

Активність каталази в коренях проростків, вирощених із зернівок оброблених РР порівняно з необробленими, передусім метіуром, через три години сольового стресу істотно знижується (рис. 3, А). Пік, який спостерігається за дії NaCl без оброблення зернівок РР на дев'яту годину, не виявляється, але реєструється через одну добу з наступним стрімким падінням через 48 год і новим посиленням активності ферменту на десятую добу. На відміну від коренів, у листках ак-

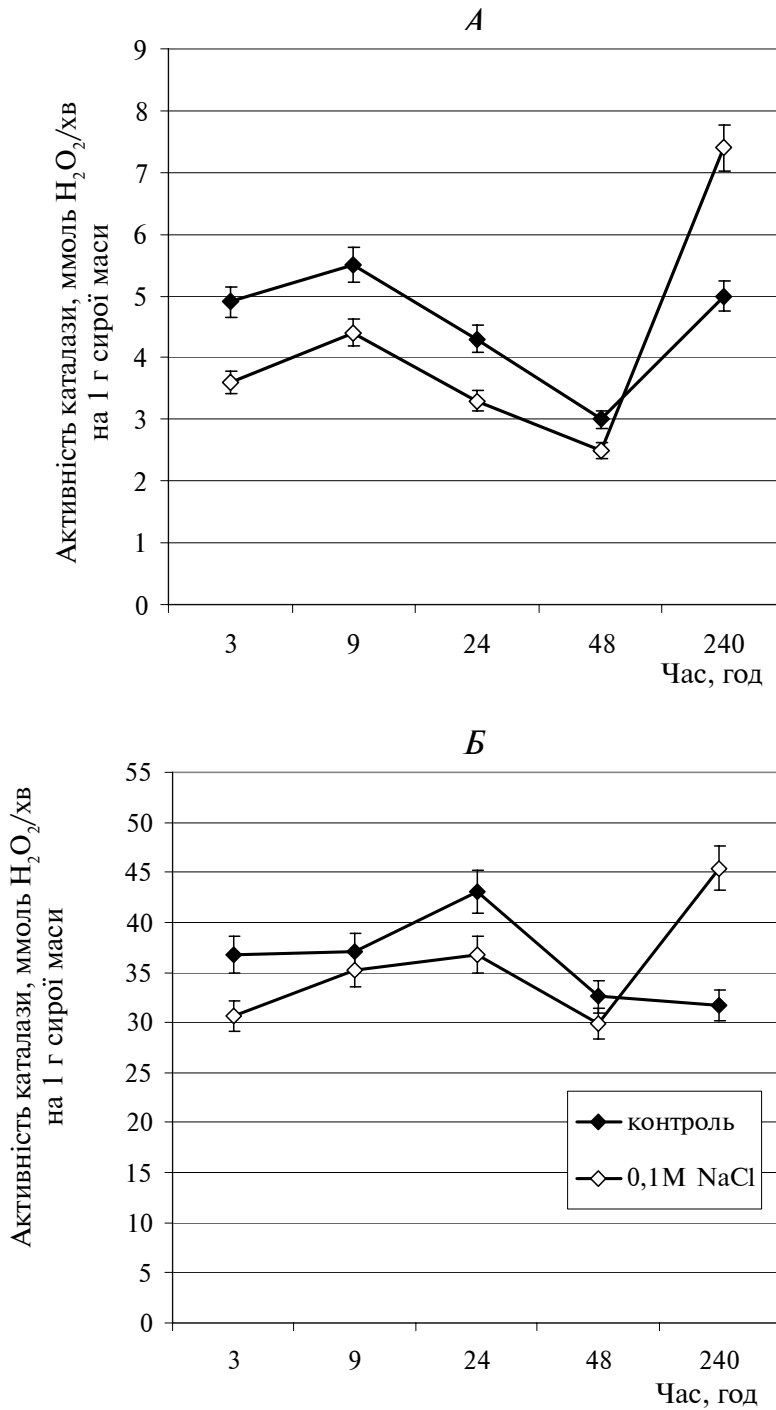


Рис. 1. Активність каталази в коренях (А) та листках (Б) проростків кукурудзи за 10-добової дії на них сольового стресу ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ ;  $p \leq 0,05$ ).

тивність каталази на третю годину сольової експозиції є такою самою, як і без оброблення зернівок РР, а на дев'яту годину спостерігається її інтенсифікація порівняно із “сольовим” контролем. Через одну добу активність ферменту знижується у варіанті з метіуром, у той час як в експериментах з івіном залишається більшою, ніж у контролі (рис. 3, Б). Через дві доби активність

каталази в обох варіантах досліду з РР перевищує “сольовий” контроль, дедалі зростаючи у варіанті з івіном (на десяту добу експозиції).

Визначення активності пероксидази у проростках, вирощених із оброблених РР зернівок за дії NaCl, свідчить про значну інтенсифікацію її в коренях вже на дев'яту годину стресорного впливу (рис. 4, А). При подовженні його дії на

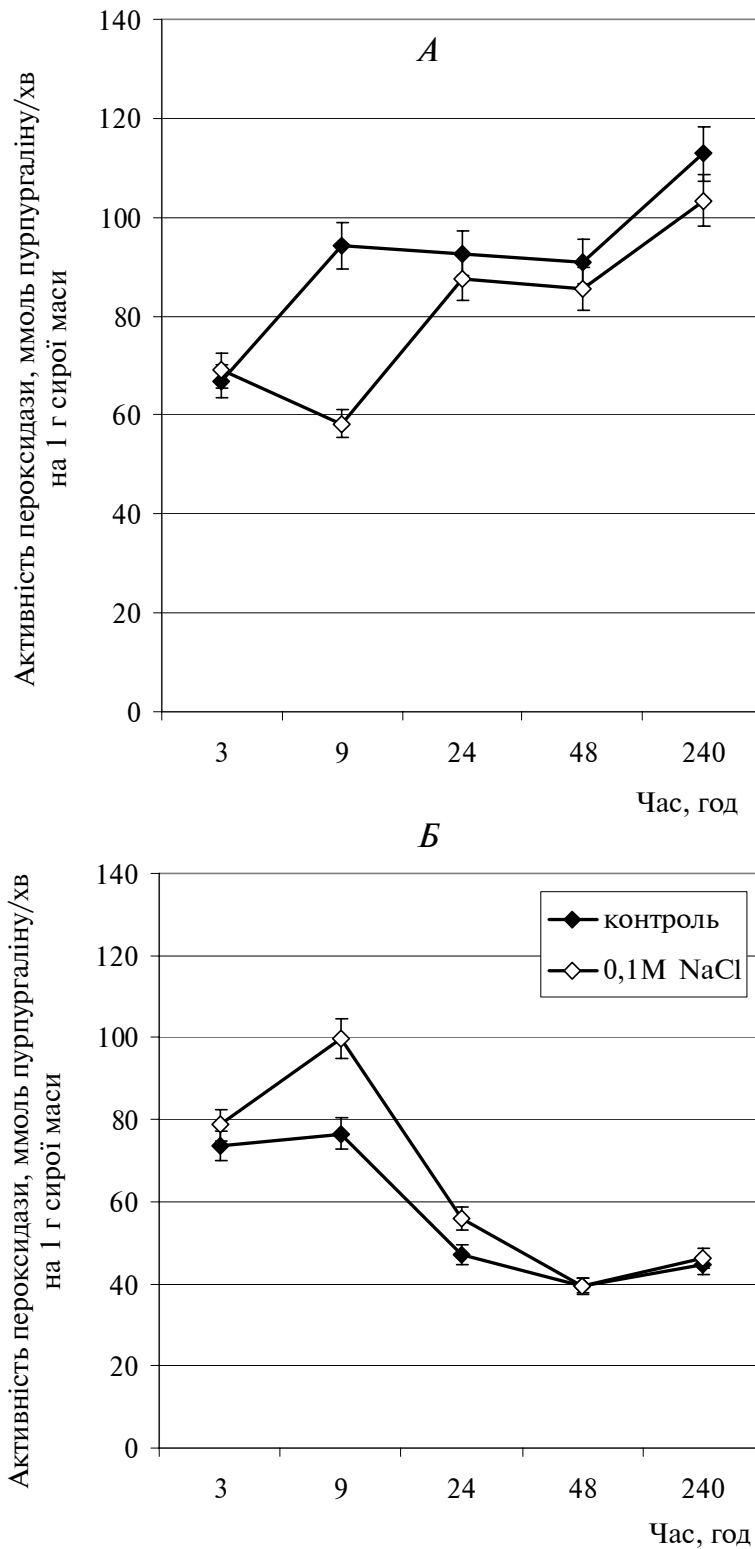


Рис. 2. Активність пероксидази в коренях (А) та листках (Б) проростків кукурудзи за 10-добової дії на них сольового стресу ( $M \pm t$ ;  $n = 3$ ;  $p \leq 0,05$ ).

проростки (до 10 діб) спостерігається поступове зростання активності пероксидази в коренях рослин, оброблених РР, причому на другу добу екс-

перименту вплив івіну дещо послаблюється, тимчасом як метіуру постійно зростає. Натомість у листках проростків істотного ефекту цих регуля-

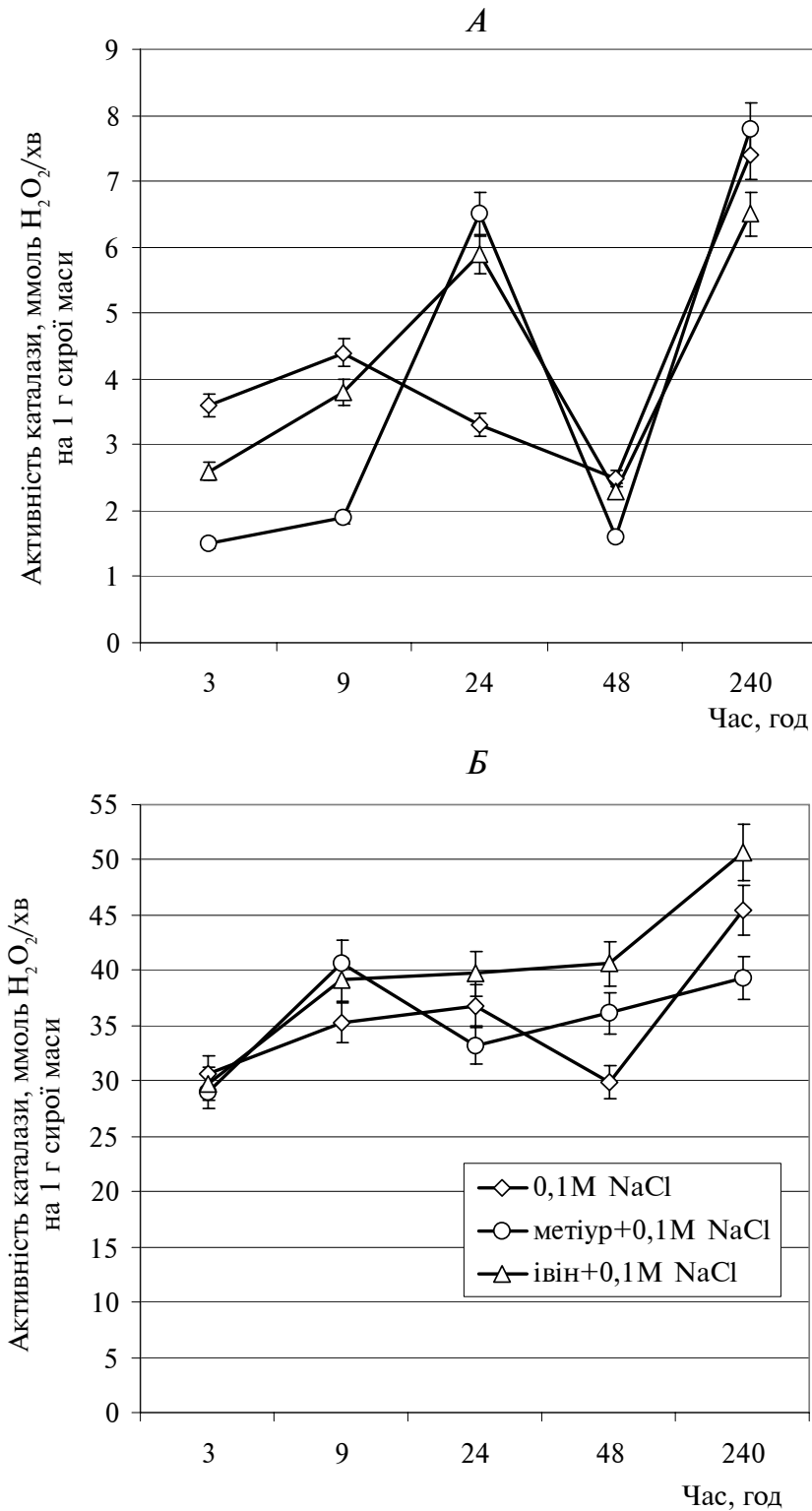


Рис. 3. Активність каталази в коренях (А) та листках (Б) проростків кукурудзи за 10-добової дії на них сольового стресу та передпосівного оброблення зернівок регуляторами росту ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ ;  $p \leq 0,05$ ).

торних сполук на активність пероксидази не спостерігається (рис. 4, Б).

Порівняння одержаних даних із результата-

ми наших попередніх досліджень [12] свідчить, що в коренях проростків контрольного варіанту дослідження зниження активності каталази протягом

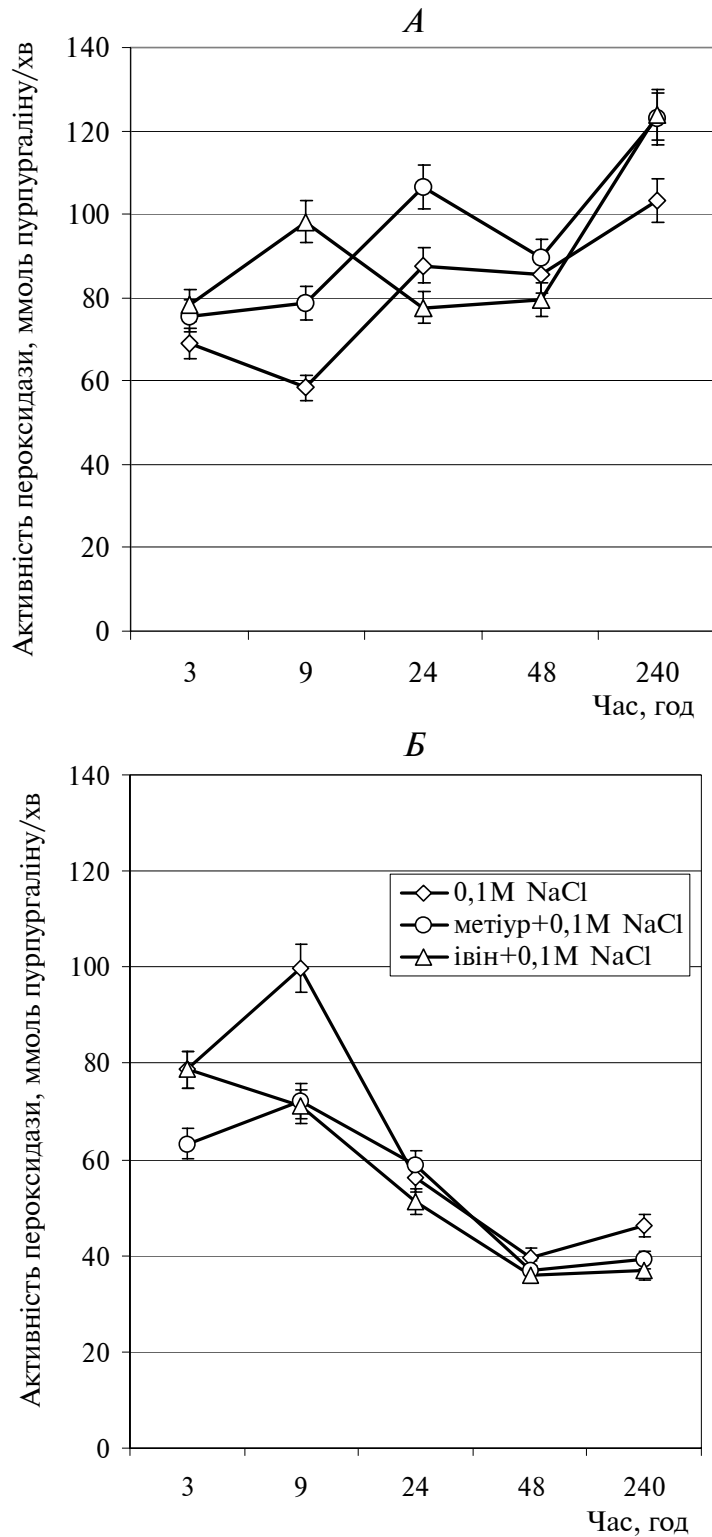


Рис. 4. Активність пероксидази в корнях (А) та листках (Б) проростків кукурудзи за 10-добової дії на них сольового стресу та передпосівному обробленню зернівок регуляторами росту ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ ;  $p \leq 0,05$ ).

перших двох діб експерименту відбувається на тлі посилення інтенсивності пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), яке визначали за рівнем

$H_2O_2$ -ініційованої хемілюмінесценції (ІХЛ). Таким чином, на цьому етапі інтенсивність пероксидних процесів переважає активність каталази

як компонента антиоксидантної системи. У листках проростків, незважаючи на різке збільшення рівня ІХЛ, значних змін активності каталази не спостерігається, що може бути зумовлено незначним накопиченням пероксиду водню як специфічного субстрату каталази. Наприкінці експерименту зміни ІХЛ та активності каталази були односпрямованими, що виявлялося в підвищенні цих показників у коренях та зниженні в листках.

У свою чергу, зазначена нами інтенсифікація вже досить високої активності пероксидази в коренях, яка відбувається водночас із посиленням ІХЛ, може бути пов'язана з участю ферменту не лише в детоксикації пероксиду водню, але й в утворенні АФК [16]. Крім того, ймовірно, що підвищення пероксидазної активності є наслідком прискореного старіння рослин у водній культурі [5]. Високу активність пероксидази в коренях можливо обумовлено наявністю в них різних ізоформ ферменту [17]. Зміни його активності в листках, на відміну від коренів, були дзеркальним відображенням коливань у рівні ІХЛ [12], що свідчить про рівновагу систем ПОЛ та антиоксидантного захисту.

Активність каталази у тканинах за умов сольового стресу знижується порівняно з контрольним варіантом протягом двох перших діб, хоча в цей період у коренях вона підвищується на дев'яту годину дії NaCl, яке збігається зі спадом ІХЛ, а в листках — на 24 год. Наприкінці експерименту підвищення каталазної активності в коренях та листках, навпаки, відбувається на тлі зниження інтенсивності ІХЛ [12]. Це може свідчити про відновлення окисно-антиоксидантної рівноваги лише після тривалої дії стресора внаслідок адаптації до нього проростків. Причиною низької активності каталази порівняно з контрольним варіантом протягом перших діб дії стресорного чинника може бути підвищення концентрації АФК, які здатні безпосередньо впливати на фермент [18]. Крім того, зниження активності каталази в коренях та листках за сольового стресу вірогідно обумовлюється пригніченням синтезу білка ферменту або його фотоінактивацією [9].

Динаміка активності пероксидази в коренях та листках проростків, які вирощували у присутності високої концентрації NaCl, є дзеркальним відображенням змін інтенсивності ІХЛ [12], причому рівень пероксидазної активності в коренях

завжди нижчий, ніж у контролі. Отже, підтримання сталого рівня прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в разі впливу на рослини сольового стресу відбувається за участю пероксидази, хоча у знешкодженні АФК, що утворюються в цих умовах, беруть також участь інші ферменти, зокрема супероксиддисмутаза та ферменти аскорбат-глутатіонового циклу [9]. Висока активність пероксидази в листках проростків на тлі низької активності каталази під час сольового стресу свідчить про важливу роль першого з цих ферментів у детоксикації пероксиду водню. Таке збільшення активності пероксидази може відбуватися внаслідок підвищення синтезу ферменту *de novo*, змін співвідношення між його ізоформами та/або модифікації вже наявних молекул. Крім того, воно може бути зумовлено змінами механічних властивостей клітинних стінок, під час адаптації рослин до засолення середовища [3].

Стимулювання ферментативної активності у оброблених РР проростках, в умовах сольового стресу може бути безпосередньою відповіддю рослин на зростання інтенсивності ПОЛ, яке при передпосівному обробленні зернівок івіном відбувається сильніше в коренях, а при обробленні метіуром — у листках [12]. Відсутність істотного впливу РР на активність пероксидази в листках проростків, культивованих за наявності в середовищі високої концентрації NaCl, можливо пов'язана з досить високим рівнем активності ферменту і без дії на рослини цих сполук. Активація антиоксидантних ферментів у проростках після оброблення зернівок РР, імовірно, відбувається внаслідок зумовлених ними змін в експресії генів. Так, показано, що в ембріональних клітинах квасолі метіур індукує синтез *de novo* білка з молекулярною масою 30 кДа, тоді як івін стимулює синтез загальних білків [19]. Вплив РР на функціонування систем антиоксидантного захисту у проростках кукурудзи вірогідно спричинюється антиоксидантними властивостями фізіологічно активних сполук [12], до яких у випадку метіуру додається ще й антирадикальна дія.

Одержані результати дають підставу вважати, що механізм захисної дії препаратів метіуру та івіну на рослини під час сольового стресу пов'язаний, зокрема, з підвищенням активності каталази та пероксидази, які запобігають ушкодженню рослинних клітин високими концентраціями пероксиду водню.

**EFFECT OF THE SALT STRESS  
AND SYNTHETIC GROWTH  
REGULATORS ON CATALASE  
AND PEROXIDASE ACTIVITY  
IN CORN SEEDLINGS**

*I. M. Kurylenko, T. A. Palladina*

Institute of Botany, National Academy of Sciences  
of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: ikurilenko@yahoo.com

**S u m m a r y**

Activity modifications of two enzymes included in antioxidant system have been studied in roots and leaves of corn seedlings during 10-day exposition to 0.1 M NaCl. In roots of salt-stressed seedlings both activities were reduced but their decreasing was changed at rising at the exposition end. The changes of catalase activity in corn leaves had the same character but peroxidase one rose greatly and was considerable higher than in the leaves of the control seedlings. Seed pretreating with preparations methiure and ivine enhanced activities of the both enzymes in roots whereas in leaves they increased catalase activity only. Obtained results demonstrate that under the salt stress conditions catalase and peroxidase activities are directed to the maintenance of prooxidant-antioxidant balance, and methiure and ivine, that reveal the antioxidant properties, induce enzyme activities.

**Key words:** catalase, peroxidase, salt stress, growth regulators, *Zea mays L.*

1. *Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. et al. // Cell. Mol. Life Sci. — 2000. — 57. — P. 779–795.*
2. *Shalata A., Mittova V., Volokita M. et al. // Physiol. Plant. — 2001. — 112. — P. 487–494.*
3. *Harinasut P., Poonsopa D., Roengmongkol K. et al. // Science Asia. — 2003. — 29. — P. 109–113.*
4. *Шевякова Н. И., Стеценко Л. А., Мещеряков А. Б. и др. // Физиол. раст. — 2002. — 49, № 5. — С. 670–677.*
5. *Андреева В. А. Фермент пероксидаза. — М.: Наука, 1988. — 128 с.*
6. *Noctor G., Foyer C. A. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1998. — 49. — P. 249–279.*
7. *Shalata A., Tal M. // Physiol. Plant. — 1998. — 104. — P. 169–174.*
8. *Cavalcanti F. R., Oliveira J. T. A., Martins-Miranda A. S. et al. // New Phytologist. — 2004. — 163, N 3. — P. 563–571.*
9. *Lee D. H., Kim Y. S., Lee C. B. // J. Plant Physiol. — 2001. — 158. — P. 737–745.*
10. *Fadzilla N. M., Finch R. P., Burdon R. H. // J. Exp. Bot. — 1997. — 48. — P. 325–331.*
11. *Tsai Y.-C., Hong C.-Y., Liu L.-F. et al. // Physiol. Plant. — 2004. — 122. — P. 86–94.*
12. *Куриленко І. М., Палладіна Т. О. // Укр. біохім. журн. — 2001. — 73, № 6. — С. 56–60.*
13. *Пономаренко С. П., Николаенко Т. К., Троян В. М. и др. Регуляторы роста растений. — К., 1992. — 178 с.*
14. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.*
15. *Nakano Y., Asada K. // Plant Cell Physiol. — 1981. — 22, N 5. — P. 867–880.*
16. *Часов А. В., Гордон Л. Х., Колесников О. П. и др. // Цитология. — 2002. — 44, № 7. — С. 691–696.*
17. *Sukalovic V. H. T., Vuletic M. // Plant Sci. — 2003. — 164. — P. 999–1007.*
18. *Колупаєв Ю. Є. Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень). — Харк. держ. аграр. ун-т. — Харків, 2001. — 173 с.*
19. *Циганкова В. А. Індукція синтетичними регуляторами росту органогенезу in vitro і на ранніх етапах онтогенезу рослин. — Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К. 2003. — 24 с.*

Отримано 11.04.2005