

УДК 581.5 : 577.15

Иваченко Л.Е., Лаврентьева С.И., Кузнецова В.А.
Благовещенский государственный педагогический университет

АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗ, ПЕРОКСИДАЗ, АМИЛАЗ, ЭСТЕРАЗ И РИБОНУКЛЕАЗ СОИ В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

L. Ivachenko, S. Lavrent'eva, V. Kuznetsova
Blagoveshchensk State Pedagogical University

ACTIVITY OF CATALASE, PEROXIDASE, AMYLASE, ESTERASE AND RIBONUCLEASE OF SOYBEAN UNDER CONDITIONS OF TEMPERATURE STRESS

Аннотация. Исследовано действие температурного стресса на активность и множественные формы каталазы, пероксидазы, амилазы, эстеразы и рибонуклеаз проростков культурной и дикорастущей сои. Показано, что дикорастущая соя, обладающая высоким адаптивным потенциалом, характеризуется повышенной удельной активностью и небольшим количеством множественных форм ферментов. Невысокая удельная активность ферментов культурной сои компенсируется увеличением их гетерогенности, что повышает устойчивость растения при температурном стрессе.

Ключевые слова: температурный стресс, ферменты, множественные формы, культурная соя, дикорастущая соя.

Abstract. The impact of temperature stress on the activity and multiple forms of catalase, peroxidase, amylase, esterase and ribonuclease of cultivated and wild soybean sprouts is investigated. It is shown, that wild soybean having a high adaptive potential is characterized by an increased specific activity and a small amount of multiple forms of enzymes. Low specific activity of enzymes in cultivated soybean is compensated for by an increase in heterogeneity, which improves the stability of the plant under conditions of temperature stress.

Key words: temperature stress, enzymes, multiple forms, Glycine max, Glycine soja.

В ответ на действие экстремальных температур при одновременном ослаблении синтеза обычных клеточных белков вследствие нарушений в белоксинтезирующем аппарате или в регуляции генной активности синтезируются белки теплового шока [1; 8]. Синтез их рассматривается как природа быстрой адаптации растительных клеток. Предполагается, что белки теплового шока составляют основу индуцированной теплоустойчивости, выполняя важные защитные, регуляторные и структурные функции. Значительный интерес представляет отзывчивость ферментов на изменение температуры. В связи с вышеизложенным, цель нашей работы – изучить влияние температурного стресса на энзиматическую активность проростков дикорастущей и культурной сои.

В эксперименте использовали семена культурной сои (*Glycine max (L.) Merr.*) сорта «Гармония» и дикорастущей сои (*Glycine soja Sieb. et Zucc.*) форму КА-1344, полученные из ГНУ ВНИИ сои РАСХН (г. Благовещенск, Амурская область). Для изучения влияния температуры на активность ферментов семена сои термостатировали при температуре 4°C, 10°C, 23°C, 37°C, 42°C и 45°C в течение 5 часов. Экстракты растворимых белков сои готовили из исследуемого материала (500 мг) путем гомогенизации на холоде с последующим центрифугированием. Содержание белка определяли по Лоури. Активность ферментов определяли соответствующими стандартными методами: каталазу – газометрическим [2], пероксидазу – по Бояркину [7], эстеразную активность по Ван Асперну, амилазу – фотокolorиметрическим [2], рибонуклеазу – по методу Рассела. Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах активности на мг белка. Электрофоретические спектры исследуемых ферментов выявляли

методом электрофореза на колонках 7,5%-го полиакриламидного геля. Выявление на геле зон с ферментативной активностью (форм ферментов) проводили соответствующими гистохимическими методами [4; 6; 10]. Поскольку стандартным критерием для характеристики множественных форм ферментов является их относительная электрофоретическая подвижность (Rf), разнокачественность сортов сои оценивали по выявленным формам ферментов согласно их Rf. Нумерация форм проведена от более высокоподвижных (к аноду) к низкоподвижным формам. Каждой форме ферментов было присвоено свое сокращенное обозначение в соответствии со значениями их Rf (для каталаз – K1-K8, пероксидаз – П1-П18, рибонуклеаз – Р1-Р12, эстераз – Э1-Э14, амилаз – А1-А10). Редко

встречающиеся дополнительные формы обозначили условным знаком (*) [5].

Биохимические исследования проводили в лаборатории молекулярной биологии БГПУ в шести аналитических повторностях. Статистическую обработку материала и расчет коэффициентов корреляций проводили по методу Плохинского с помощью программы Microsoft Office Excel, 2007. Анализом энзиматической активности проростков дикорастущей и культурной сои при температурном стрессе установлены значительные отличия. При температуре 4°C в проростках дикорастущей и культурной сои выявлена сходная удельная активность каталаз (рис. 1).

При 10°C наблюдался первый максимум активности каталаз проростков дикорастущей сои, в то время как в проростках куль-

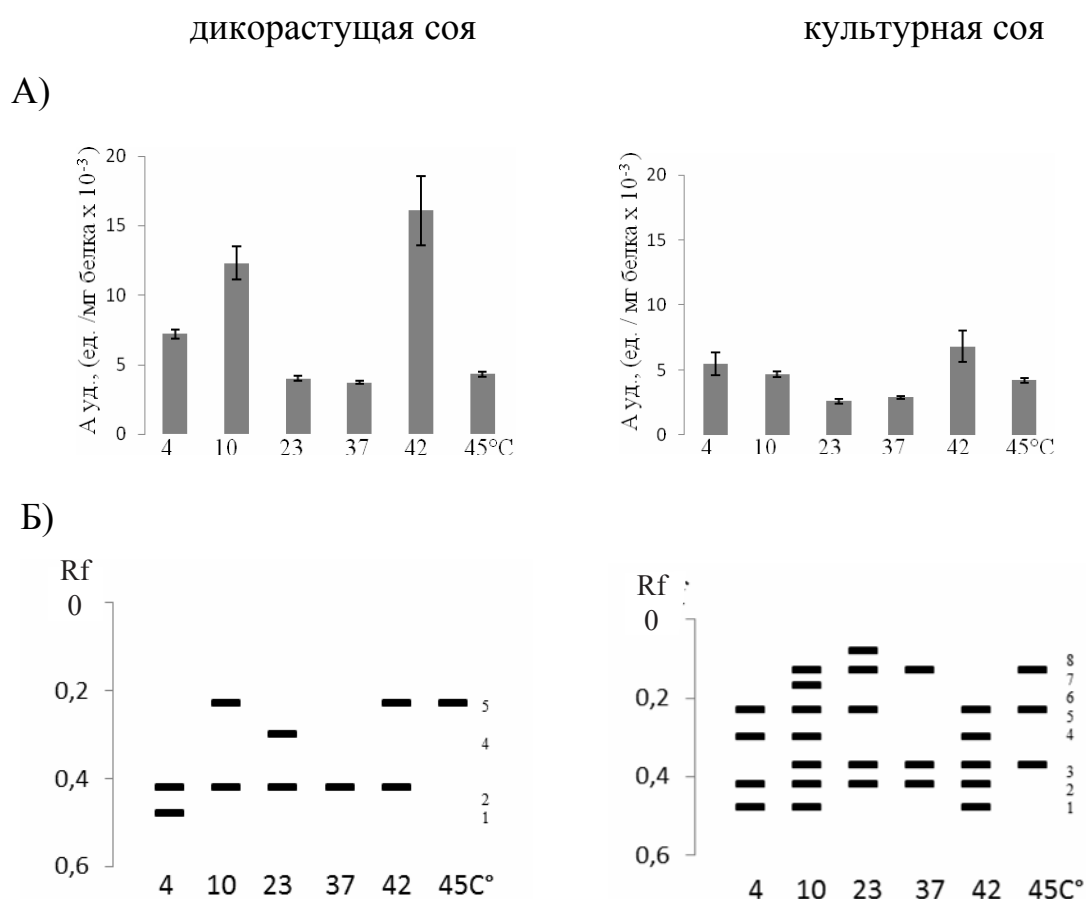


Рис. 1. Удельная активность (А) и схема энзимограмм каталаз (Б) проростков семян дикорастущей и культурной сои в условиях температурного стресса. Справа на энзимограммах указана нумерация выявленных форм фермента

туре 4°C в семенах дикорастущей сои, кроме формы K2, была обнаружена дополнительная форма K1, которая, вероятно, также повышает адаптивный потенциал сои при холодовом стрессе. В проростках дикорастущей сои при температуре 23°C, кроме постоянной формы K2, была выявлена форма K4. Этот факт интересен, так как в проростках культурной сои комбинация формы K2 с K1, K5 и K4 приводила к повышению удельной активности каталазы при температурном стрессе (4°C, 10°C и 42°C).

Изучение влияния температуры на пероксидазную активность семян сои показало самую высокую активность фермента при температуре 10°C (рис. 2). При повышении температуры до 42-45°C активность пероксидаз проростков сои менялась незначительно, что можно объяснить процессами денатурации белков. Результаты исследования активности пероксидаз семян сои различного филогенетического происхождения показали, что фермент высокоактивен в семенах дикорастущей сои.

Методом электрофореза установлено, что при температуре 4°C и 45°C в проростках дикорастущей сои появилась только одна форма пероксидаз со средней электрофоретической подвижностью – П5, а в проростках культурной сои – форма П6. При других температурах выявлялись высокомолекулярные формы с низкой электрофоретической подвижностью, которые обуславливают более высокую активность фермента. Проращивание семян культурной сои при температуре 23°C, 37°C и 42°C приводило к возникновению дополнительных форм пероксидаз со средней электрофоретической подвижностью и невысокой активности фермента. Появление этих же форм со средней электрофоретической подвижностью семян дикорастущей сои, пророщенных при температуре 37°C, снижало активность фермента до минимума. При температуре 23°C и 42°C только в семенах дикорастущей сои были обнаружены формы с высокой электрофоретической подвижностью.

Проращивание семян сои в условиях температурного стресса показало, что удельная активность эстераз проростков семян дико-

растущей сои при температуре от 4°C до 37°C почти в 2 раза выше, чем у культурной (рис. 3).

Причем максимум активности фермента в проростках дикорастущей сои наступал при температуре 37°C и сохранялся достаточно высоким в условиях повышенных температур (42°C и 45°C). Удельная активность эстераз проростков культурной сои при этих условиях достигала значений активности фермента дикорастущей сои. В условиях пониженных температур (4°C и 10°C) в проростках культурной сои активность эстераз крайне низкая, хотя в проростках дикорастущей сои фермент имел достаточно высокую активность. Причем следует отметить, что при минимальной активности эстераз в условиях пониженной температуры (4°C) было выявлено максимальное количество форм (6), что, видимо, повышает адаптивный потенциал сои в стрессовых условиях.

В проростках семян дикорастущей сои обнаружено 9 форм эстераз, имеющих специфическое распределение. Повышенное количество форм фермента, имеющих различную электрофоретическую подвижность, было отмечено при 42°C (5) и 45°C (6). При температурном стрессе (4°C, 10°C, 42°C и 45°C) была выявлена форма Э12, а при 45°C – Э7. Для сорта Гармония установлено более высокое количество форм эстераз. При проращивании семян в условиях температурного стресса было обнаружено 12 форм фермента. Наиболее встречаемой являлась форма Э8 (кроме 42°C). При повышении температуры до 45°C происходило увеличение количества форм фермента до 5. Анализ изменения количества форм эстераз проростков сои в условиях температурного стресса показал, что самыми адаптивными являются формы Э3 и Э8 в проростках дикорастущей сои и формы Э4, Э8 и Э11 в проростках культурной сои. Причем форма Э4 проявлялась в проростках дикорастущей сои только при повышенной температуре, а в проростках культурной сои встречалась в различных условиях. Кроме того, установлено, что если в условиях температурного стресса в проростках культурной сои отсутствовала форма Э4, то появля-

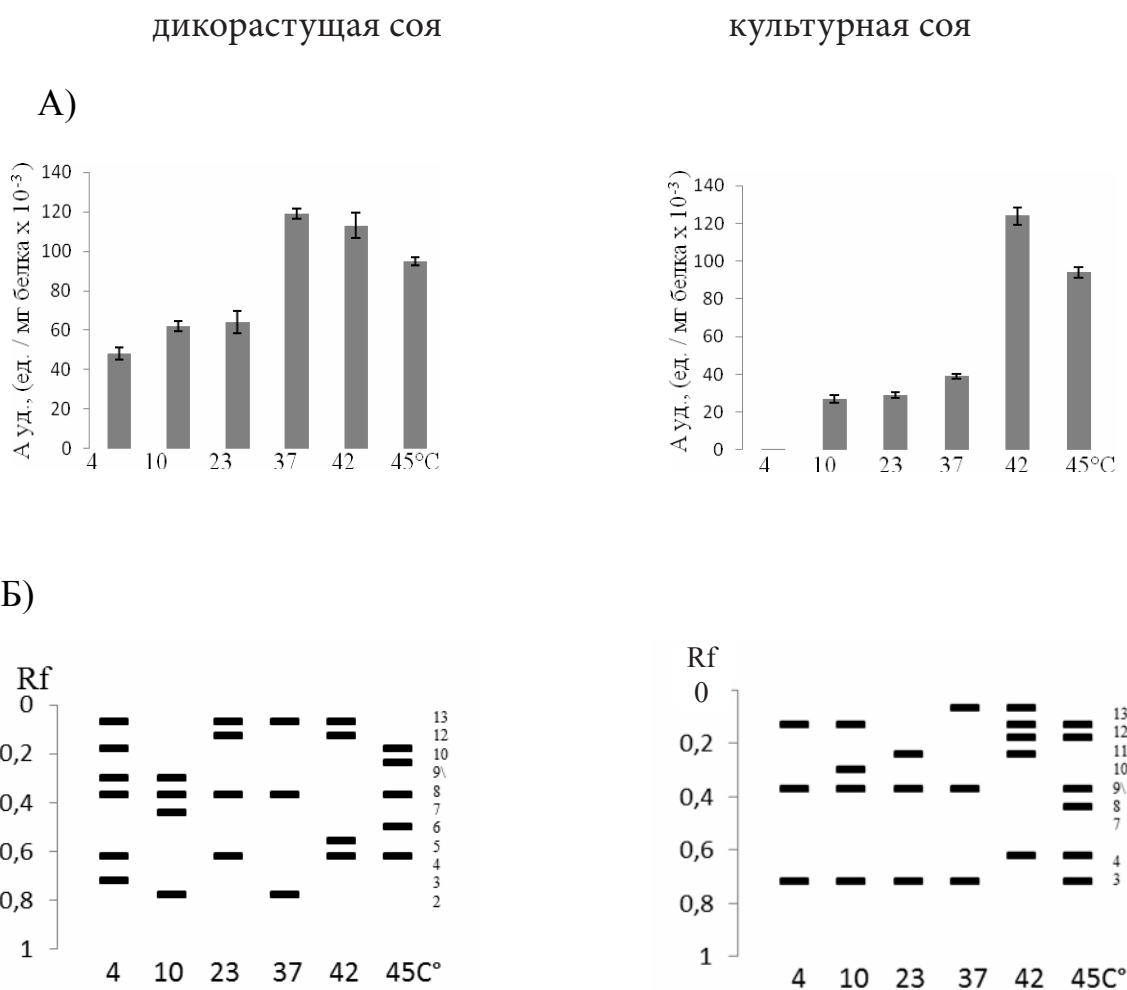


Рис. 3. Удельная активность (А) и схема электрограмм эстераз (Б) проростков семян дикорастущей и культурной сои в условиях температурного стресса. Справа на электрограммах указана нумерация выявленных форм фермента

лась высокоподвижная форма Э2. Форма Э9 проявлялась в условиях холодового стресса. Форма Э11 в проростках дикорастущей сои была обнаружена при тепловом стрессе, а в проростках культурной сои при проращивании в условиях 4°C и 45°C. Значительный интерес вызывал анализ проявления формы Э12 с низкой электрофоретической подвижностью. Эта форма была отмечена в проростках дикорастущей сои как при повышенной, так и при пониженной температуре, а в проростках культурной сои – при оптимальных условиях и температуре 42°C.

При изучении влияния температуры на удельную активность амилаз проростков сои

было выявлено, что при нормальных условиях удельная активность фермента дикорастущей сои в 2,5 раза выше, чем культурной (рис. 4).

В условиях пониженных температур (4°C) наблюдалось незначительное повышение удельной активности амилаз проростков культурной сои, тогда как для дикорастущей в этих же условиях удельная активность фермента постепенно повышалась, достигая первого пика активности при 23°C. Но максимально активен фермент при температуре 42°C. Проращивание семян сои при температуре 45°C вызывало снижение удельной активности амилаз культурной и дикорастущей сои, так как, по-видимому, при повыше-

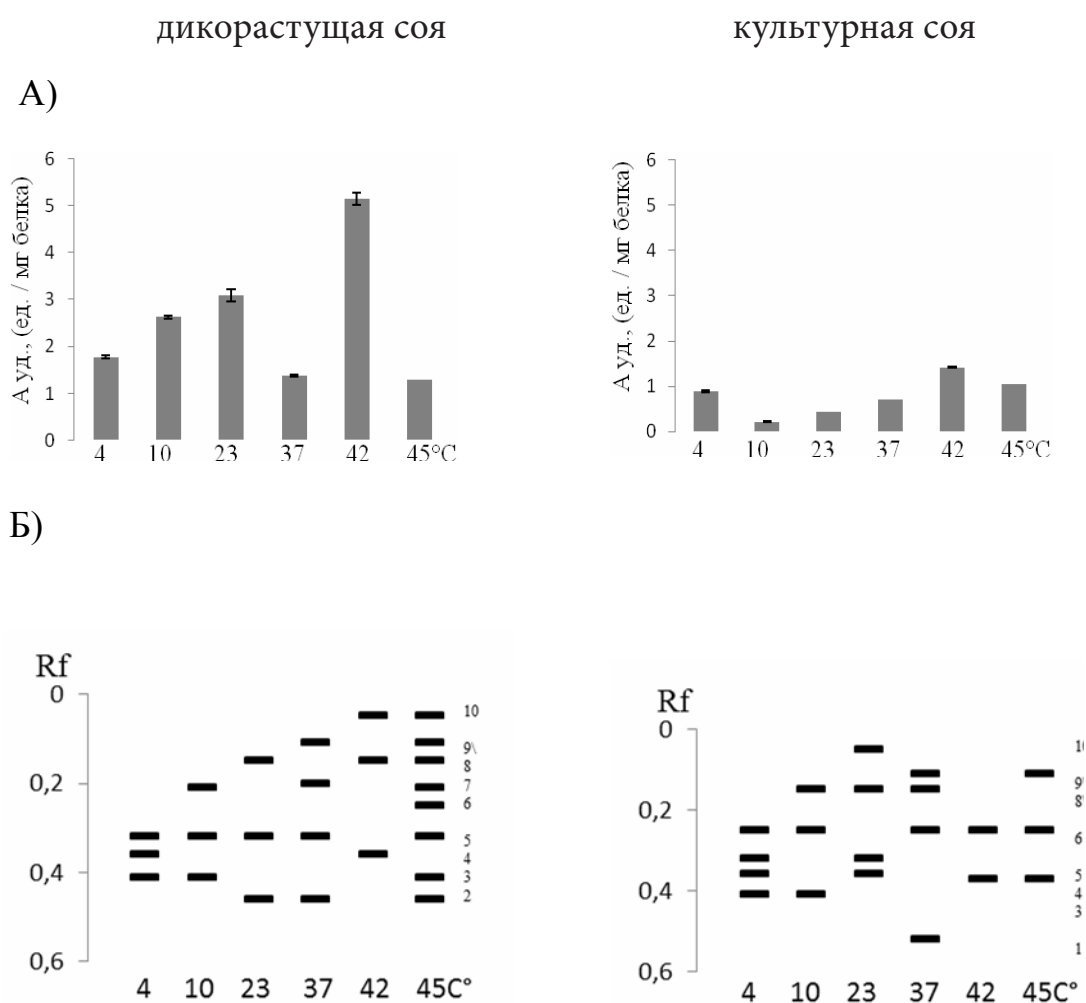


Рис. 4. Удельная активность (А) и схема энзимогамм амилаз (Б) проростков семян дикорастущей и культурной сои в условиях температурного стресса. Справа на энзимогаммах указана нумерация выявленных форм фермента

нии температуры происходила инактивация форм β -амилаз сои [9].

В проростках дикорастущей сои установлено 9 форм амилаз, 8 из которых обнаружены при температуре 45°C. При других температурах проростки сои содержали всего 3-4 формы амилаз. Во всех исследованных образцах выявлена форма А5 (кроме 42°C, где выявлена форма А4). Кроме того, в условиях повышенной температуры обнаружены дополнительные формы А6 и А8, которые широко проявились в проростках культурной сои. В проростках сои сорта Гармония в условиях температурного стресса установлено 8 форм амилаз, что меньше, чем в пророст-

ках дикорастущей сои. Причем количество форм амилаз проростков сои, выросших при разных температурах, выявлено всего по 2-4 в образце. Форма А5 проявилась только в оптимуме и при невысокой температуре. Значительный интерес вызвала форма А4, которая проявлялась при сильном стрессе. Установлено, что комбинация форм А4 с А8 либо с А6 приводила к увеличению активности амилаз, а следовательно, происходит повышение адаптивного потенциала сои.

Значительные различия установлены при изучении влияния температуры на активность рибонуклеаз семян дикорастущей и культурной сои. Наивысшую удельную ак-

тивность фермент проявлял при нормальной температуре (23°C) в семенах дикорастущей сои (рис. 5). Понижение температуры до 10°C, как и повышение до 45°C приводило к снижению активности рибонуклеаз в 2 раза, что, видимо, связано с увеличением синтеза стрессовых белков, в том числе белков теплового шока и снижением гидролиза РНК. В семенах культурной сои, наоборот, при нормальной температуре была выявлена самая низкая активность фермента. Причем изменение температуры в пределах от 10°C до 37°C не вызывало изменения удельной активности

рибонуклеаз сои. В условиях теплового шока происходило незначительное увеличение активности фермента, что можно объяснить процессами денатурации рибонуклеаз. Следует отметить, что снижение температуры до 4°C привело к повышению активности рибонуклеаз в 2 раза по сравнению с нормальной температурой (23°C). Анализ показал, что в условиях температурного стресса удельная активность рибонуклеаз семян дикорастущей сои снижалась, следовательно, ее адаптивный потенциал падал, что, видимо, связано с увеличением числа белков-стрессоров.

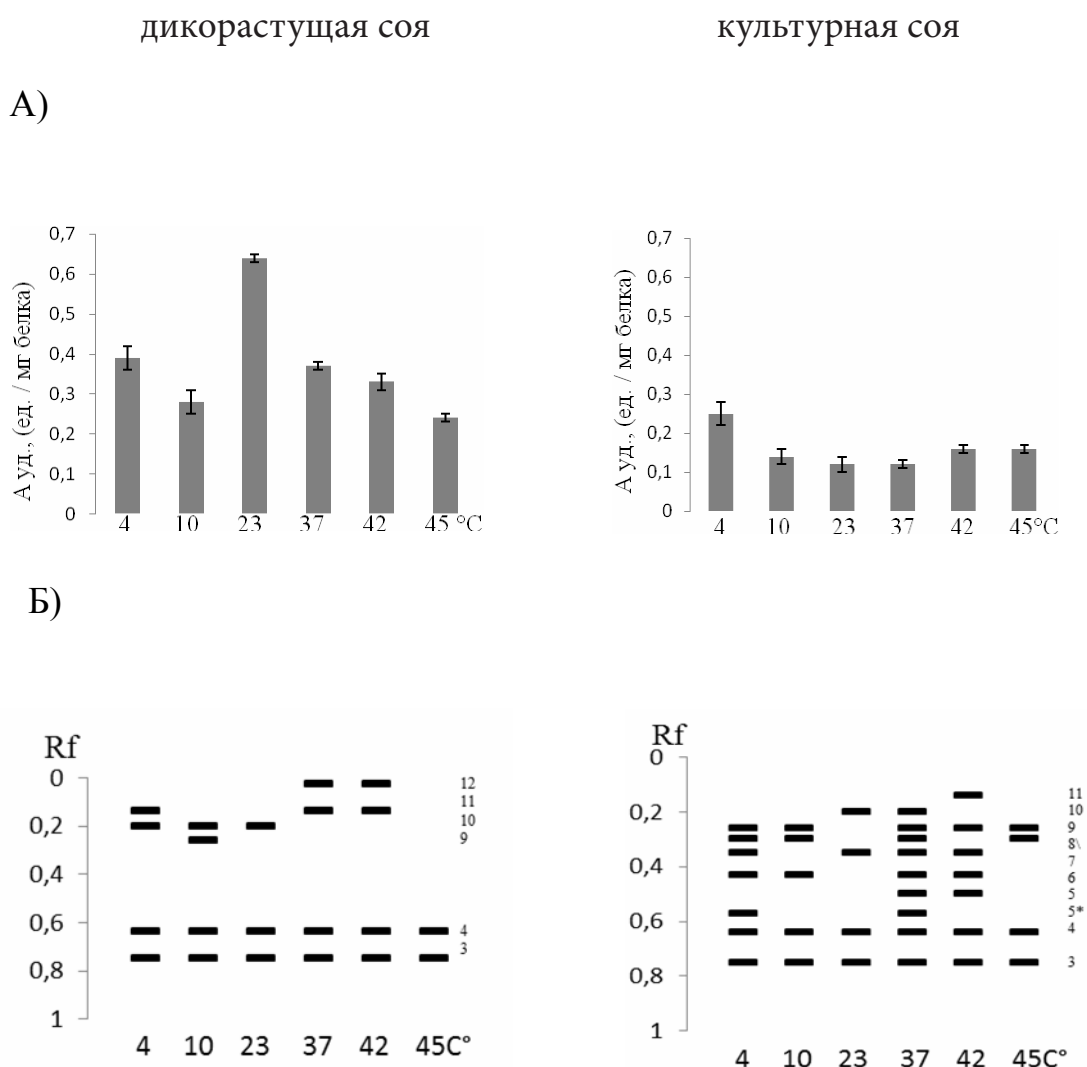


Рис. 5. Удельная активность (А) и схема энзимогамм рибонуклеаз (Б) проростков семян дикорастущей и культурной сои в условиях температурного стресса. Справа на энзимогаммах указана нумерация выявленных форм фермента

Методом электрофореза было установлено большее количество форм рибонуклеаз семян культурной сои. Следует отметить стабильное присутствие двух форм фермента (Р3 и Р4) с высокой электрофоретической подвижностью во всех исследуемых образцах. Наличие этих же низкомолекулярных форм рибонуклеаз нами было обнаружено при ранее проведенных экспериментах [3]. На основании высокой электрофоретической подвижности рибонуклеаз установлено, что фермент в семенах сои имеет невысокую молекулярную массу. В проростках семян дикорастущей сои были обнаружены по 1-2 дополнительные формы рибонуклеаз, отсутствующие в образцах, полученных при проращивании сои в условиях 45°C. В проростках культурной сои повышенное число форм фермента выявлено при температуре 37°C, что, видимо, связано с активацией метаболических процессов. Снижение температуры до 4°C привело к увеличению числа множественных форм рибонуклеаз сои, что соотносится с повышением удельной активности фермента. Повышение температуры до 45°C привело к уменьшению форм рибонуклеаз проростков сои, что, возможно, связано с их денатурацией. Появление новых форм рибонуклеаз в проростках культурной сои, возможно, указывает на повышение ее адаптивного потенциала в условиях измененной температуры.

Таким образом, установлено, что адаптивный потенциал дикорастущей сои связан с повышением удельной активности каталаз, пероксидаз, амилаз, эстераз и рибонуклеаз, а культурной – с появлением в ее семенах до-

полнительных множественных форм исследованных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гарбуз Д.Г. Исследование механизмов термостойкости: эволюция генетических локусов и мутагенез / Д.Г. Гарбуз и др. // Динамика генофондов: материалы отчетной конференции памяти Ю.П. Алтухова. – М., 2007. – С. 118-121.
2. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков и др. – Л., 1987. – 430 с.
3. Иваченко Л.Е. Активность и множественные формы рибонуклеазы в семенах районированных сортов сои Амурской области / Л.Е. Иваченко, В.И. Шаройко, С.А. Лескова // Сб. научн. тр. «Проблемы экологии Верхнего Приамурья» (Вып. 5). – Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2000. – С. 58-65.
4. Иваченко Л.Е. Методы изучения полиморфизма ферментов сои / Л.Е. Иваченко и др. – Благовещенск: изд-во БГПУ, 2008. – 142 с.
5. Иваченко Л.Е. Ферменты как маркеры адаптации сои к условиям выращивания: монография. – Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2011. – 192 с.
6. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск: Наука, 1986. – 145 с.
7. Малый практикум по физиологии растений / под ред. А.Т. Мокроносова. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 184 с.
8. Панасенко О.О. Структура и свойства малых белков теплового шока / О.О. Панасенко, М.В. Ким, Н.Б. Гусев // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – № 1. – С. 59-98.
9. Norbi S.W. Further Studies on the Electrophoretic Patterns of the Multiple Forms of Amylase in Soybean Seeds / S.W. Norbi, R.W. Rinne // Crop Sc. – 1985. – V. 25. – № 6. – P. 990-994.
10. Wendel J.L. Visualization and interpretation of plant isozymes / J.L. Wendel, N.F. Weeden // In: D.E. Soltis and P.S. Soltis (eds.), *Isozymes in plant biology*. – Portland: Dioscorides Press, 1989. – P. 5-45.