

УДК 581.1.035.3:631.589:577.152.1

Е. Н. КАРАСЕВА, Т. Г. ЯНЧЕВСКАЯ

АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ У *DIOSCOREA ALATA* L.

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: ledymc_net@mail.ru*

С помощью электрофоретических исследований изучены активность и число молекулярных форм пероксидазы для нового растения диоскорей, выращиваемого в искусственных условиях на модифицированных субстратах ТРИОНА® с помощью различных гидрогелей, с целью выявления факторов его стрессоустойчивости. Установлено, что пероксидазы листьев *Dioscorea alata* L. представляют собой чувствительный сенсор на изменение влажности корнеобитаемой среды, регулируемой с помощью гидрогелей.

Ключевые слова: пероксидаза, гидрогель, ионообменный субстрат, стрессоустойчивость, *Dioscorea alata* L.

E. N. KARASEVA, T. G. YANCHEVSKAYA

ACTIVITY PEROXIDASES AS AN INDICATOR STRESS HAVE *DIOSCOREA ALATA* L.

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: ledymc_net@mail.ru*

The are studies examined activity and number of molecular forms of peroxidase for the new plants cultivated *Dioscorea alata* L. on modified substrates TRIONA ® using different hydrogels in artificial conditions in order to identify stress factors by using the electrophoretic. It was found the peroxidase to leaves of *Dioscorea alata* L. represent sensitive sensor to change humidity root environment, regulated by using the hydrogels.

Keywords: peroxidase, hydrogel, ion exchange substrate, stress, *Dioscorea alata* L.

Введение. Значительную роль в ответных реакциях растений на условия окружающей среды оказывают окислительно-восстановительные процессы, в частности реакции, протекающие с участием кислородных радикалов. Образование активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный кислород (O_2^*), супероксид-радикал (O_2^-), гидроксил-радикал (OH^\cdot) и перекись водорода (H_2O_2), называемое окислительным взрывом, является одним из ранних ответов на внешнее воздействие [1]. В клетках, как системах жизнеобеспечения растения в целом, поддерживается динамическое равновесие между образованием активных форм кислорода и их детоксикацией, которое осуществляется с помощью многокомпонентной системы антиоксидантной защиты, состоящей из низкомолекулярных (флавоноиды, стероиды, гликозиды, хиноны, пероксидаза) и высокомолекулярных (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза) компонентов. Одним из них является пероксидаза, способная реагировать на широкий спектр факторов, приводящих к нарушению гомеостаза АФК у растений.

Под влиянием внешних факторов у пероксидаз могут изменяться активность и число изоформ. К настоящему времени установлено, что стресс-протекторное действие некоторых биологически активных веществ может проявляться в их способности уменьшать активность пероксидазы и количество ее изоформ.

В связи с этим с помощью электрофоретических исследований нами изучено действие различных модификаций гидрогелей в ассоциации с биологически активными веществами на активность и число молекулярных форм пероксидазы с целью выявления факторов стрессоустойчивости

к изменению водного баланса ионообменного субстрата ТРИОНА® для нового растения диоскореи, выращиваемого в искусственных условиях [2].

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили растения диоскореи (*Dioscorea alata* L.). Их выбор обусловлен ценными хозяйственными, фармакологическими свойствами и декоративным экзотическим видом. Черенки *Dioscorea alata* L. укореняли на Биотехнических комплексах, установленных в закрытом помещении с искусственным освещением, на которых размещали пластиковые контейнеры размером 20×20 см² с вариантами модифицированного субстрата, в которых размещали черенки с густотой посадки по 5 шт. В качестве светового источника использовали натриевые ДНАТ-400, люминесцентные ЛБ-40 лампы, температуру поддерживали на уровне 20 ± 2 °С днем и 17 ± 2 °С ночью [3].

Модификацию субстрата проводили путем внесения определенных концентраций различных гидрогелей марки ЕСОФЛОС А-07 (КНР) в следующих вариантах: гидрогель с бентонитом 43К (вариант 1), гуматом 13К (вариант 2), калием 03К (вариант 3), гидрогель без удобрений мелкой и крупной фракций (варианты 4 и 5 соответственно), применяя описанные в работе [4] методы. Гель вносили в субстрат ТРИОНА® в набухшем состоянии в концентрациях 1,0 и 0,5 г/л [4–6]. Для определения изоферментов пероксидаз и ферментативной активности применяли методику, приведенную в [7–10].

Результаты и их обсуждение. Согласно полученным данным (рис. 1, 2, табл. 1), пероксидазный комплекс анионных пероксидаз *Dioscorea alata* L. имеет следующий компонентный состав изоферментов: минорные с Rf 0,039; 0,043; 0,064; 0,74; 0,31; 0,177; 0,5 (минорными называются компоненты, в которых интенсивность окраски находится на пределе разрешения метода) и мажорные с Rf 0,36; 0,63; 0,54; 0,72; 0,82 (мажорными считаются компоненты, интенсивность окраски которых по бензидину является максимальной для данного метода определения). Как видно из полученных данных (рис. 1, 2, табл. 1), практически все используемые гидрогели оказывают свое влияние на активность и изоферментный спектр пероксидаз. На рис. 1, 2 видны существенные различия в степени окраски пероксидазы (пропорционально ее активности) в зависимости от концентрации гидрогелей. Контрольный вариант представлен двумя основными изоформами Rf = 0,65 и Rf = 0,72. При добавлении в среду бентонита с концентрацией 0,5 г/л наблюдаются изменения в содержании изоформы пероксидазы с Rf = 0,65. Дальнейшее увеличение концентрации гидрогеля с бентонитом до 1 г/л приводит к увеличению активности изоформы с Rf = 0,65

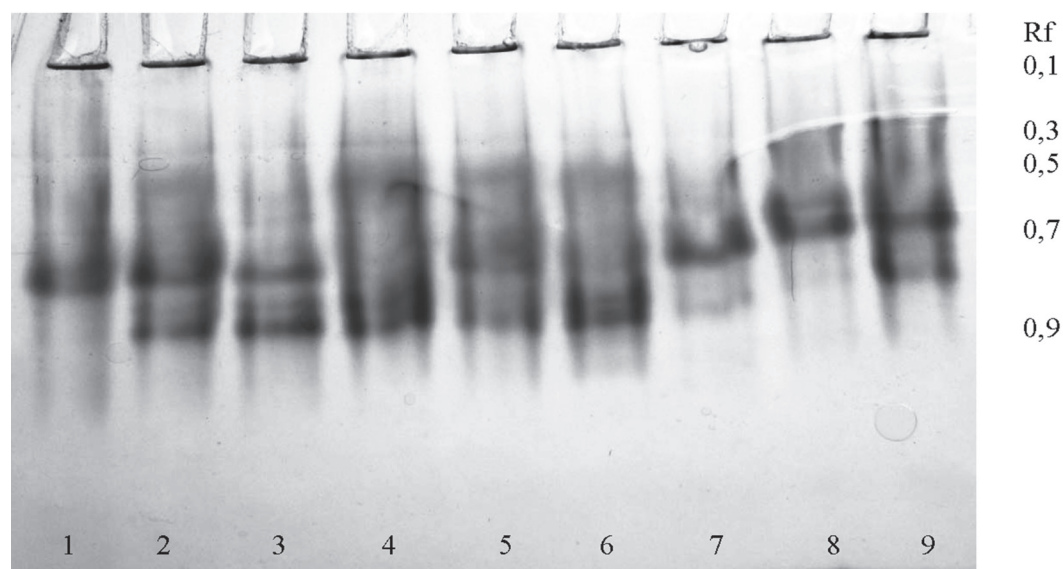


Рис. 1. Изоферментный спектр пероксидазы листьев *Dioscorea* под действием ДНАТ-400 на модифицированном ионообменном субстрате: 1 – с бентонитом в концентрации 0,5 г/л; 2 – с бентонитом в концентрации 1,0 г/л; 3 – с гуматом в концентрации 0,5 г/л; 4 – с гуматом в концентрации 1,0 г/л; 5 – с гидрогелем крупной фракции в концентрации 0,5 г/л; 6 – с гидрогелем крупной фракции в концентрации 1,0 г/л; 7 – с калием в концентрации 0,5 г/л; 8 – с калием в концентрации 1,0 г/л; 9 – без модификации (контроль)



Рис. 2. Изоферментный спектр пероксидазы листьев *Dioscorea* при облучении светом ДНАТ-400 на модифицированном ионообменном субстрате с гидрогелем мелкой фракции в концентрациях 0,5 г/л (1) и 1,0 г/л (2)

и $R_f = 0,8$. Также увеличивается активность минорной компоненты (0,34).

R_f Гумат, как и бентонит, оказывает сильное влияние на динамику изоферментов пероксидазы. В частности, на треке № 3 (табл. 1) наблюдается увеличение активности изоформ с $R_f = 0,819$ и $R_f = 0,65$. Белковые полосы в электрофоретических исследованиях листьев диоскореи на среде с гуматом отличаются по интенсивности окрашивания с бентонитом, что говорит о разном вовлечении этих изоформ в эффекты, вызываемые воздействием гидрогеля с бентонитом и гуматом на растения *Dioscorea alata* L. Согласно литературным данным [9], существуют эффекты воздействия различных концентраций одновалентных и двухвалентных катионов на активность пероксидазы растений. Полученные нами на треках № 7 и № 8 (табл. 1) экспериментальные данные отражают влияние K^+ в концентрациях 0,5 и 1 г/л на растения *Dioscorea alata* L. Максимальной активностью обладает изоформа с $R_f = 0,65$ (рис. 1, 2), без видимого превалирования других форм.

Таким образом, пероксидазы *Dioscorea alata* L. представляют собой чувствительный сенсор на различные типы воздействия с гидрогелем. Вместе с тем сам фракционный состав гидрогеля оказывает влияние на активность и изоферментный спектр пероксидазы: чем выше концентрация гидрогеля, тем более высокая активность пероксидазы. Существенное

влияние на активность пероксидазы оказывает и количество добавленного гидрогеля, что видно из треков № 1 и № 2 (рис. 1, 2). Модифицированный ионообменный субстрат ТРИОНА® с бентонитом, гуматом, крупной фракцией в концентрации 1,0 г/л оказывает максимальное влияние на активность и изоферментный спектр пероксидазы. В то же время гидрогель с концентрацией 0,5 г/л оказывает минимальное влияние и, следовательно, не является стресс-образующим фактором для растений *Dioscorea alata* L.

Т а б л и ц а 1. Компьютерная обработка электрофореграммы рис. 1, 2

К-во изоформ	Трек 1	Трек 2	Трек 3	Трек 4	Трек 5	Трек 6	Трек 7	Трек 8	Трек 9	Трек 10	Трек 11
Band	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
1	0,039	0,043	0,057	0,32	0,36	0,39	0,012	0,008	0,064	0,066	0,074
2	0,31	0,34	0,5	0,48	0,65	0,65	0,65	0,093	0,177	0,3	0,279
3	0,455	0,45	0,56	0,71	0,82	0,79	0,72	0,176	0,194	0,519	0,313
4	0,63	0,63	0,65	0,8				0,54	0,65	0,524	0,536
5		0,734	0,728					0,65	0,72	0,609	0,91
6		0,821	0,819					0,72			

Спектральный состав света также оказывал воздействие на активность пероксидазы. Из представленных данных (рис. 3, табл. 2) следует, что ДНАТ-400 является мощным активатором пероксидазы у *Dioscorea alata* L. На рис. 3 представлены экспериментальные данные по изоферментному составу пероксидазы растений *Dioscorea alata* L., выращенных под действием люминесцентного источника света ЛБ-40. В данном варианте активность и изоферментный спектр пероксидаз изменяется несущественно. Возможно, это связано с тем, что ДНАТ-400, являясь высокоэнергетичным светом, приводит к образованию АФК, а следовательно, и к повышению активности пероксидазы, чего не наблюдается при использовании ЛБ-40. Полученные нами данные (рис. 3) демонстрируют влияние концентрации гидрогеля на активность изоферментного спектра пероксидаз при облучении растений от источника света ЛБ-40.

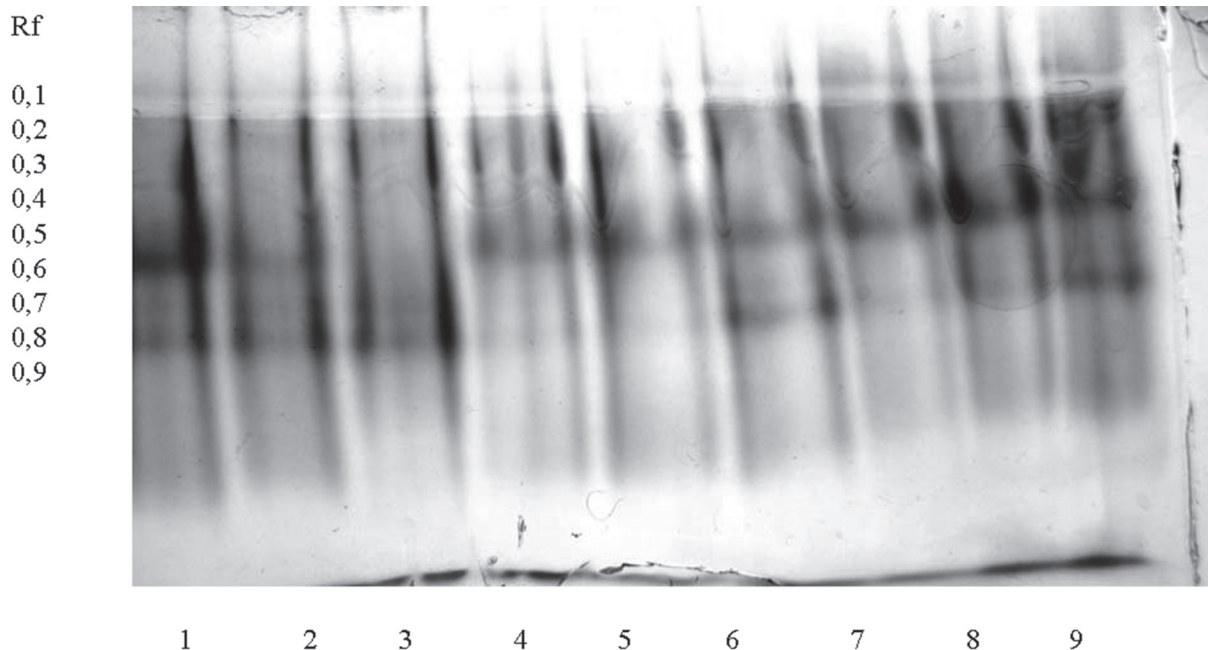


Рис. 3. Изоферментный спектр пероксидазы листьев *Dioscorea* под действием ЛБ-40 на модифицированном ионообменном субстрате: 1 – с гидрогелем мелкой фракции в концентрации 1,0 г/л; 2 – с гидрогелем мелкой фракции в концентрации 0,5 г/л; 3 – с бентонитом в концентрации 1,0 г/л; 4 – с бентонитом в концентрации 0,5 г/л; 5 – с гуматом в концентрации 1,0 г/л; 6 – с гуматом в концентрации 0,5 г/л; 7 – с калием в концентрации 0,5 г/л; 8 – с гидрогелем крупной фракции в концентрации 0,5 г/л; 9 – без модификации (контроль)

Т а б л и ц а 2. Компьютерная обработка электрофореграммы рис. 3

К-во изоформ	Трек 1	Трек 2	Трек 3	Трек 4	Трек 5	Трек 6	Трек 7	Трек 8	Трек 9
Band	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
1	0,121	0,039	0,103	0,054	0,089	0,08	0,039	0,041	0,043
2	0,411	0,56	0,566	0,093	0,567	0,096	0,302	0,134	0,283
3	0,565	0,74	0,671	0,099	0,8	0,127	0,328	0,214	
4	0,848	0,84		0,562		0,554	0,56	0,224	
5						0,8	0,8	0,245	
6								0,57	
7								0,84	

Таким образом, показано, что как и при облучении ДНАТ-400, гидрогели (с бентонитом, гуматом, калием и без удобрений крупной и мелкой фракций) различной концентрации влияют на активность и динамику изоферментов. Например, треки № 1 и № 2 (табл. 2) демонстрируют влияние концентрации гидрогеля с 0,5 и 1 г/л. Наблюдается увеличение активности изоферментов пероксидазы с $Rf = 0,565$. Подобным образом гидрогель с бентонитом в тех же концентрациях влияет на активность и изоферментный спектр пероксидазы (треки № 3 и № 4, рис. 3). Гидрогель с гуматом в концентрации 0,5 г/л оказывает обратный эффект на активность изучаемого фермента, т. е. более низкая концентрация оказывает большее влияние на активность изоформы с $Rf = 0,8$. Возможно, это связано с тем, что более низкая концентрация оказывает меньшее влияние на растение в целом, и при таком влиянии изоферментный состав пероксидазы близок к контролю. Добавление гидрогеля с K^+ приводит к общему снижению пероксидазной активности, что, возможно, связано со стресс-протекторной ролью ионов K^+ для растений *Dioscorea alata* L.

Закключение. Используя новый класс почвенных мелиорантов – гидрогелей различного состава, способных поглощать и удерживать в набухшем состоянии огромное количество влаги с растворенными в нем питательными веществами, можно модифицировать влажностные свойства ионообменного субстрата ТРИОНА® для ускорения процессов адаптации нового для Беларуси интродуктора диоскорей (*Dioscorea alata* L.). Согласно полученным данным, гидрогели

различной концентрации и разного фракционного состава влияют на активность и динамику изоферментов пероксидазы. Таким образом, пероксидазы *Dioscorea alata* L. представляют собой чувствительный сенсор на различные типы воздействия с гидрогелем. Спектральный состав света также оказывает воздействие на активность пероксидазы. Исходя из полученных экспериментальных данных по изоферментному составу пероксидазы растений *Dioscorea alata* L., выращенных под действием искусственного света ламп ЛБ-40 и ДНАТ-400, установлено, что ДНАТ-400, являясь высокоэнергетичным светом, приводит к образованию АФК, а следовательно, и к повышению активности пероксидазы, чего не наблюдается при использовании ЛБ-40.

Список использованных источников

1. Тарчевский, И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
2. Янчевская, Т. Г. Оптимизация минерального питания растений / Т. Г. Янчевская. – Минск: Беларус. навука, 2014. – 458 с.
3. Спектральные характеристики источника света и особенности роста растений в условиях искусственного освещения / Н. И. Протасов [и др.] // Физиол. раст. – 1990. – Т. 37. – Вып. 2. – С. 30–35.
4. Солдатов, В. С. Ионнообменные равновесия в многокомпонентных системах / В. С. Солдатов, В. А. Бычкова. – Минск: Наука и техника, 1988. – 360 с.
5. Янчевская, Т. Г. Оптимизация содержания катионов и анионов в среде корнеобитания для максимального коэффициента размножения картофеля *in vivo* / Т. Г. Янчевская, В. А. Бобров // Ботаника: исследования. – 2008. – Т. 35. – С. 495–506.
6. Янчевская, Т. Г. Ионнообменные питательные субстраты – их уникальные свойства и области применения / Т. Г. Янчевская, К. В. Бахнова, А. Л. Ольшаникова // Ботаника: исследования. – Минск: Право и экономика, 2005. – Вып. 33. – С. 361–366.
7. Хайрулин, Р. М. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. Активация анионных изоформ пероксидазы в проростках пшеницы при инфицировании спорами *Tilletia caries* / Р. М. Хайрулин, З. Р. Юсупова, Н. Б. Трошина // Физиол. раст. – 2000. – Т. 47, № 1. – С. 114–119.
8. Юсупова, З. Р. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы грибными патогенами / З. Р. Юсупова, Р. М. Хайрулин, И. В. Максимов // Физиол. раст. – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 910–917.
9. Beauchamp, C. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // J. Analyt. Biochem. – 1971. – Vol. 44, N 3. – P. 276–287.
10. Molinari, S. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes / S. Molinari, E. Loffredo // Physiol. & Mol. Plant Patol. – 2006. – Vol. 68, N 1–3. – P. 69–78.

Поступила в редакцию 21.03.2016