

Shalakhmetova@mail.ru

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Л.Н. ГУМИЛЕВ АТЫНДАҒЫ
ЕУАЗИЯ ҰЛТТЫҚ
УНИВЕРСИТЕТІ



L.N. GUMILYOV EURASIAN
NATIONAL UNIVERSITY

ЕВРАЗИЙСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Л.Н. ГУМИЛЕВА

ХАБАРШЫ

1995 жылдың қантарынан жылына 6 рет шығады

II бөлім

№ 6 (103) · 2014

ВЕСТНИК

выходит 6 раз в год с января 1995г.

II часть

HERALD

Since 1995

II part

Астана

УДК 577.151

Г.А. Шалахметова, Р.Б. Улекова, О.Ж. Бакенова, ¹З.Аликулов

Регуляция активности альдегидоксидазы пероксидом водорода при прорастании семян пшеницы

(Казакский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

¹ (Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева, Астана, Казахстан)

На самых ранних этапах процесса выхода семени из состояния покоя АО альейрона продуцирует активные радикалы кислорода, изменяя рН в сторону цитозольного закисления и, таким образом, индуцируют процесс прорастания семени.

Ключевые слова: Пероксид водорода, фитогормон, абсцизовая кислота, альдегидоксидаза, альейроновый слой.

Многие годы молекула перекиси водорода (H_2O_2) рассматривалась как активной формой кислорода, главным образом, как токсичный клеточный метаболит. На сегодняшний день известно, что она функционирует как сигнальная молекула, которая вызывает ответы на различные стимулы как в растительных, так и в животных клетках [1]. H_2O_2 генерируется из различных источников нормального метаболизма в растительных клетках: транспорт электронов в процессе фотосинтеза и дыхания; энзиматический источник H_2O_2 , включая НАД(P)H-оксидазу, пероксидазы клеточных стенок, аминоксидазы и другие флавиносодержащие ферменты. H_2O_2 также продуцируется в растительных клетках в ответ на широкий спектр разнообразия биотических и абиотических стрессов [2].

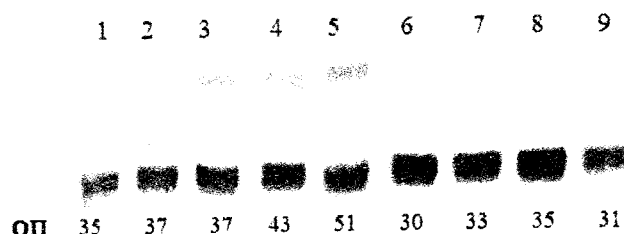
Перекись водорода является медиатором различных физиологических и биохимических процессов, включая гиперчувствительную устойчивость, процесс прорастания семян, развитие латеральных корней, запрограммированную клеточную смерть, закрытие устьиц и др. Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) регулирует многие важные аспекты роста и развития растений. Альдегид оксидаза (АО), которая участвует в биосинтезе АБК, прямо коррелирует с эндогенным содержанием этого гормона, поэтому активность фермента АБК-АО является показателем уровня фитогормона АБК и потому нам, представилось интересным изучение взаимодействия между H_2O_2 и альдегидоксидазой.

Использованные материалы и методы

Объектами исследований служили семена пшеницы и альейрон (*Triticum aestivum* L.). Для обеззараживания семян и половинки зерновок поверхностно обрабатывали 0,1 % NaClO с 1% Tween 20 в течение 20 мин. и тщательно промывали дистиллированной водой. Проращивание и инкубацию проводили в термостате при 28 °С. Активность альдегидоксидазы определяли нативным электрофорезом, используя программу Scion Image [3]. Количественное определение H_2O_2 будет проводиться с помощью Assay Kit (DINO-250), согласно протокола. Эксперименты проводились в трехкратной биологической и аналитической повторности.

Полученные результаты и их обсуждение

Нами было показано, что перекись водорода индуцирует процесс прорастания в семенах пшеницы. На рисунке 1 показано влияние перекиси водорода и аскорбиновой кислоты на активность АО1 при прорастании семян сорта *Лютеценс 70*. Установлено, что концентрация 10 мМ H_2O_2 вызывает процесс прорастания и незначительно увеличивает активность ААО1, однако концентрация перекиси 100 мМ снижает активность ААО1 и ингибирует прорастание семян [4].



1- контроль (H_2O); 2- 10 мМ H_2O_2 ; 3- 4 мМ аскорбиновая кислота; 4- 10 мМ H_2O_2 + 4 мМ аскорбиновая кислота; 5- 10 мМ H_2O_2 + 6 мМ аскорбиновая кислота; 6- 100 мМ H_2O_2 ; 7- 6 мМ аскорбиновая кислота; 8- 100 мМ H_2O_2 + 4 мМ аскорбиновая кислота; 9- 100 мМ H_2O_2 + 6 мМ аскорбиновая кислота, ОП - оптическая плотность

Рисунок 1.- Влияние перекиси водорода и аскорбиновой кислоты на активность АО1 при прорастании семян сорта Лютеценс 70

Нами показано, что частота прорастания семян пшеницы возрастала при обработке H_2O_2 . Концентрация H_2O_2 , дающая максимальную частоту прорастания, зависела от длительности предварительного замачивания. Известно, что O_2 повышает прорастание семян растений и такая индукция рассматривается как результат окислительного дыхания митохондрий. Поскольку H_2O_2 приводит к повышению уровня O_2 , причину индукции прорастания семян можно рассматривать как ускорение окислительного дыхания. Однако, ингибитор дыхания азид (NaN_3) в концентрации 10^{-5} М, индуцировал прорастание семян пшеницы (почти 2-кратное увеличение относительно контроля) и это указывает на то, что индукционные эффекты H_2O_2 не являются результатом повышенного поглощения кислорода, а окислительное дыхание не является лимитирующей стадией прорастания семян.

Наши результаты показали также, что процент прорастания семян пшеницы увеличивался обработкой интактных семян этанолом. Максимальный процент прорастания достигался при инкубации семян в этаноле в течение 12 часов, в то время как при инкубации в воде такой эффект достигается после 24 часов (таблица 1).

Таблица 1 - Эффект предварительной инкубации семян зерна пшеницы в этаноле и воде

Время инкубации семян в этаноле или воде (час)	4	8	12	16	20	24
% прорастания семян после инкубации в этаноле	65	80	88	90	87	88
% прорастания семян после инкубации в воде	63	70	73	80	85	88

Этанольный экстракт отрубей, полученных из покоящихся семян пшеницы, сильно ингибировал прорастание семян в зависимости от его концентрации. Такое ингибирование прорастания предотвращалось добавлением H_2O_2 в среду проращивания в концентрации 10 мМ. Водный экстракт алейронового слоя слабее ингибировал прорастание по сравнению с этанольным экстрактом. Наши результаты показали, что антиоксидантные свойства водного экстракта быстро теряются при хранении. Эти результаты указывают на присутствие ингибиторов прорастания в алейроновом слое семян, которые могут разрушаться окислением H_2O_2 . Изучение антиоксидантов в зерне пшеницы показало, что содержание водо- и жирорастворимых антиоксидантов возрастает по мере созревания зерна.

По-видимому, предварительное замачивание семян приводит к окислению антиоксидантов, таким образом увеличивается процент прорастания. Наши наблюдения показали, что антиоксиданты оболочки семян могут являться ингибиторами прорастания, а H_2O_2 образуется растениями для индукции прорастания семян. Полученные результаты предполагают, что временное окисленное состояние зародыша, которое индуцируется H_2O_2 , может инициировать прорастание, а антиоксидантные ингибиторы могут предотвращать индукцию окисленного состояния в семенах.

Нами проведено изучение цитозольного содержания H_2O_2 в покоящихся и прорастающих семенах пшеницы. По мере прорастания зерновок в течение суток содержание H_2O_2

увеличивалось незначительно. Однако через 3 суток уровень перекиси водорода повышался почти в 3, 5 раза.

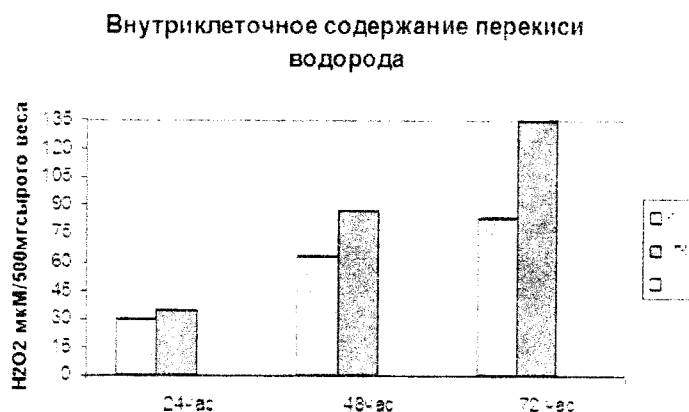


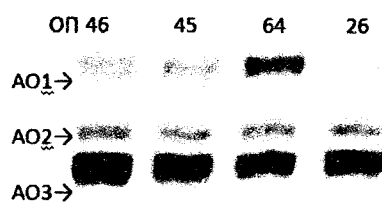
Рисунок 2.- Динамика накопления перекиси водорода в алейроновом слое зерна пшеницы

Изучали влияние ГК на динамику накопления перекиси водорода в алейроновом слое зерна пшеницы в зависимости от времени инкубации (рисунок 2). Как видно из рисунка, в контрольных вариантах (без добавления ГК) внутриклеточная концентрация возрастала с мере продолжительности времени инкубации, при этом увеличение происходило после 24 часов инкубации. Иная картина наблюдалась в характере генерации H_2O_2 в клетках алейронового слоя под действием ГК. Инкубация алейроновых слоев с ГК в дозе 5 мкМ в течение 24 и 48 часов приводила к увеличению внутриклеточного содержания H_2O_2 , приблизительно на 30 и 82 мкМ, соответственно в расчете на 0,5 г сырой ткани. Присутствие ГК в инкубационной среде в течение 72 часов приводило к увеличению внутриклеточного содержания H_2O_2 в клетках алейронового слоя зерна и достигала значения 135 мкМ.

Нами было изучено изменение активности и изоферментного состава АО в процессе выхода семени из состояния покоя. В сравнительно недавних исследованиях показано, что перекись водорода индуцирует изменение цитозольной pH. Было отмечено, что в устьичных клетках наблюдали стартовое увеличение АФК индуцируемое АБК в течение 30 сек.

Как видно на рисунке 3, активность катодного изофермента АО1 алейрона увеличилась после 1 часа инкубации в 10 мМ H_2O_2 , а присутствие 1 мМ ИУК в инкубационной среде снижало активность этого же изофермента более чем в 2 раза. Напротив, анодные изоферменты АО 3 проявляли высокую активность, по сравнению с катодными изоформами АО. Следует отметить, что изофермент АО 3 из алейрона покоящегося зерна обладал самой высокой активностью.

Воздействие H_2O_2 в концентрации 7-10 мМ усиливало активность изоферментов АО1 и АО3 на раннем этапе прорастания. Индуцирующее действие на прорастание семян и усиление активности АО3 оказывала и ИУК. В то же время, присутствие данных агентов влияет на изменение активности АО1.



1 - АО алейрона покоящегося зерна; 2 - АО алейрона, инкубируемого в H_2O ; 3 - АО алейрона, инкубируемого в 5мМ H_2O_2 ; 4 - АО алейрона, инкубируемого в 1мМ ИУК

Рисунок 3.- Активность и спектры изоферментов АО алейрона зерна пшеницы

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что уже на самых ранних этапах процесса выхода семени из состояния покоя, возможно, что АО алейрона продуцирует активные

радикалы кислорода, изменяя рН в сторону цитозольного закисления и, таким образом, индуцируют процесс прорастания семени.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Szilvia Z. Tor, Valeria Nagy, Jos T. Puthur, Larszlor Kovacs, and Gyo?zo? Garab. The Physiological Role of Ascorbate as Photosystem II Electron Donor: Protection against Photoinactivation in Heat-Stressed Leaves.- 2011- Plant Physiology .v.156.pp382-392
- 2 Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. Москва: Наука, 2002.-322с.
- 3 Шалахметова Г.А., Ыргынбаева Ш.М., Мамытова Н.С., Галиева Л.Д., Кузовлев В.А., Хакимжанов А.А. Фитогормональная регуляция процессов покоя и прорастания семян пшеницы // Вестник КазНУ. Сер. Биол. - 2006. - Т.29, №3. - С.83-87.
- 4 Nenghui Ye, Guohui Zhu, Yinggao Liu, Aying Zhang, Yingxuan Li, Rui Liu, Lu Shi, Liguojia, and Jianhua Zhang. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination abscisic acid in rice seeds/2012. J.Exp.Botany . 63(5): 1809-1822.

REFERENCES

- 1 Szilvia Z. Tor, Valeria Nagy, Jos T. Puthur, Larszlor Kovacs, and Gyo?zo? Garab. The Physiological Role of Ascorbate as Photosystem II Electron Donor: Protection against Photoinactivation in Heat-Stressed Leaves.- 2011- Plant Physiology .v.156.pp382-392
- 2 Tarchevsky I.A. Signalling system of plant cells. Moscow:Nauka, 2002. -322с.
- 3 Shalakhmetova G.A., Yrgynbaeva Sh, A., Mamytova N.S., Galieva L.D., Kusovlev V.A., Khakimzhanov A.A. Phytohormonal regulation the processes of dormancy and germination in wheat seeds. // Vestnik KazNU. Biol.Ser. - 2006. - T.29, №3. - p.83-87.
- 4 Nenghui Ye, Guohui Zhu, Yinggao Liu, Aying Zhang, Yingxuan Li, Rui Liu, Lu Shi, Liguojia, and Jianhua Zhang. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination abscisic acid in rice seeds/2012. J.Exp.Botany . 63(5): 1809-1822.

Шалахметова Г.А., Улекова Р.Б., Бакенова О.Ж., Аликулов З.

Бидай дәндерінің өнуі кезінде альдегидоксидазаның белсенділігін сутегінің асқын тотығымен реттелуі

Тұқымдық дәндердің тыныштық жағдайынан шығу үрдісінің бастапқы кезеңдерінде алейрондағы АО оттегінің белсенді радикалдарын түзіп, цитозольдың рН мәнін қышқыл бағытка өзгертеді, сонымен, дәндердің өну үрдісін іске қосады.

Түйін сөздер: Сутегі пероксиді, фитогормон, абсцис қышқылы, альдегидоксидаза, тұқымдардың алейронды қабаты.

Shalakhmetova G.A., Ulekova R.B., Bakanova O.Zh., Alikulov Z.

Regulation of aldehyde oxidase activity by hydrogen peroxide during wheat seed germination

At early stages of dormancy breaking AO of aleurone produces active oxygen radicals which change pH toward acidity and, thus induces germination process of seeds.

Keywords: Hydrogen peroxide, phytohormone, abscisic acid, aldehyde oxidase, aleurone layer of seeds.

Об авторах:

Шалахметова Г.А. - к.б.н., доцент кафедры общей генетики Казахского национального университета им.Аль-Фараби, e-mail: Shalakhmetova@mail.ru

Улекова Р.Б. - магистрант кафедры общей генетики Казахского национального университета им.Аль-Фараби

Бакенова О.Ж. - магистрант кафедры общей генетики Казахского национального университета им.Аль-Фараби

Аликулов З. - к.б.н., профессор Евразийского национального университета им.Л.Н.Гумилева, e-mail: Zer-kaz@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.14