

Функции систем биологического окисления

УДК 633.11:631.53.011:581.142:577.152.1

ОБ УЧАСТИИ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В МЕХАНИЗМАХ ПОКОЯ И ПРОРАСТАНИЯ ЗЕРНОВОК У ПШЕНИЦЫ

В.В. РОГОЖИН¹, Т.Т. КУРИЛЮК¹, Т.В. РОГОЖИНА²

Оценили активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и пероксидазы в зерновках и проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Установлено, что дегидрогеназы необходимы для сохранения жизнеспособности семян и при запуске процессов, связанных с их прорастанием. Пероксидаза, катализирующая реакции с участием кислорода и перекиси водорода, регулирует содержание этих веществ в покоящихся зернах. Значительное возрастание активности пероксидазы при прорастании зерновок может свидетельствовать об участии фермента в активизации пусковых механизмов дыхания.

Ключевые слова: зерна пшеницы, покой, прорастание, ферменты, дегидрогеназы, пероксидаза.

Keywords: grains of wheat, rest, germination, enzyme, dehydrogenase, peroxidase.

Семена культурных растений в отсутствие воды и при низкой температуре находятся в состоянии вынужденного покоя, которое характеризуется их пониженной функциональной активностью при сохранении высокой жизнеспособности. После восстановления нормальных условий происходит возобновление интенсивной дыхательной деятельности и последующее прорастание семян (1).

Регулирование физиолого-биохимических процессов, лежащих в основе действия механизмов покоя, осуществляется комплексом биологически активных веществ, которые участвуют в росте и развитии растительного организма, обеспечивая сохранение его жизнеспособности. Переход в состояние покоя сопровождается понижением активности биосинтетических процессов и дыхания митохондрий, что связано с разобщением окислительного фосфорилирования и переключением аэробных метаболических процессов на анаэробные (2). При этом скорость последних выше. Показателями интенсивности анаэробных метаболических процессов может служить активность ферментов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) и алкогольдегидрогеназы (АДГ), аэробных — пероксидазы (ПО).

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — ключевой фермент пентозофосфатного пути превращения углеводов. Она катализирует реакции окисления глюкозо-6-фосфата в присутствии НАДФ⁺, который необходим для метаболизма липидов (жирных кислот и стероидов) (3). При этом стероидные гликозиды могут выполнять в организме роль антиоксидантов, регулировать проницаемость мембран и активировать процессы деления и роста клеток (4, 5). Изоцитратдегидрогеназа катализирует лимитирующую стадию в цикле трикарбоновых кислот, который протекает в матриксе митохондрий. Алкогольдегидрогеназа катализирует обратимые реакции окисления алифатических спиртов с участием НАД⁺ (6). Соотношение концентраций альдегида и спирта отражает интенсивность протекания анаэробных биоэнергетических реакций. Снижение этого показателя сопровождается активацией катаболических процессов, тогда как повышение приводит к состоянию более глубокого покоя. Однако роль такого регуляторного механизма в прорастании семян у культурных и дикорастущих растений изу-

чена недостаточно.

Пероксидаза совместно с СОД и каталазой входит в единую систему антиоксидантной защиты живых организмов, предотвращающую разрушительное действие активных форм кислорода (7, 8). Фермент способен катализировать реакции окисления различных биологически активных соединений (НАДН, индолил-3-уксусная кислота, аскорбиновая кислота, флавоноиды и др.), среди которых следует выделить антиоксиданты (АО) — вещества, способные подавлять образование свободных радикалов и ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) (9, 10).

Период прорастания семян делится на три этапа (11): активация метаболизма (этап физического набухания); подготовка к началу роста растяжением (наклеивание семян за счет перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша); собственно рост органов проростка. Известно, что для нормального прорастания в воздушно-сухих семенах должны присутствовать все компоненты белоксинтезирующей системы: рибосомы, тРНК, факторы инициации и элонгации, аминокислоты и аминокил-тРНК-синтетазы, все ферменты метаболизма, белки теплового шока и их мРНК. Во влажных семенах наблюдается активное потребление кислорода, который может вызывать окислительное повреждение тканей. В развитии окислительного стресса важную роль играют активные формы кислорода (АФК): O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$, $HOCl$ и др. (12). Накопление АФК в клетках приводит к нарушению процессов транскрипции и репликации, изменяет состав липидов мембран. Супероксидные радикалы модифицируют белки, нарушают структуру ДНК, разрушают гормоны и другие функционально активные вещества (13).

Целью нашей работы было изучение активности основных оксидоредуктаз (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и пероксидазы) в период хранения и прорастания зерновки, а также оценка их участия в регуляции состояния покоя и процессов прорастания семян.

Методика. Исследования проводили на зерновках пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Приленская 19, которые помещали в дистиллированную воду на 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 23 °С на свету в течение 7 сут, смачивая дистиллированной водой (10 мл на чашку Петри). Число семян в одной чашке — 100 шт., повторность опыта 4-кратная. Жизнеспособность зерновок пшеницы определяли тетразольным методом (14).

Для анализа продуктов реакции тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и количества антиоксидантов семена или проростки семян (1 г сырой массы) гомогенизировали в фарфоровой ступке с 3 мл 50 % раствора этанола. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 7000 g. Содержание малонового диальдегида (МДА) исследовали по реакции с тиобарбитуровой кислотой (при $\lambda = 532$ нм, $\epsilon = 155$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) (10) с нашими модификациями. К 0,5 мл супернатанта последовательно добавляли 0,5 мл 1 % раствора Тритона X-100, 0,2 мл 0,6 М HCl и 0,8 мл 0,06 М ТБК. Смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин и охлаждали при 15 °С в течение 30 мин. Для стабилизации окраски вносили 0,2 мл 5 мМ трилона Б и 5-10 мл 96 % этанола. Контролем служил образец, в который добавляли те же растворы, кроме ТБК. Антиоксиданты анализировали согласно описанной методике (15). К 0,2 мл супернатанта последовательно добавляли 0,2 мл 0,5 % о-фенантролина, разведенного в 96 % этаноле, и 0,2 мл 0,2 % FeCl₃ в 96 % этаноле. Затем объем раствора доводили до 3 мл 96 % этано-

лом и выдерживали 10 мин в темноте. Количество антиоксидантов определяли по калибровочному графику, построенному для кверцетина.

При определении активности пероксидазы и других ферментов навески семян или проростков (1 г) гомогенизировали в фарфоровой ступке, добавив 3 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,0). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 7000 g. Активность пероксидазы оценивали по начальной скорости окисления о-дианизидина перекисью водорода при 22 °С. Для этого к 2,1 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,0) добавляли 0,2 мл супернатанта и 0,1 мл 0,43 мМ раствора о-дианизидина в 96 % этаноле. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ перекиси водорода. Увеличение поглощения раствора ($\lambda = 460$ нм, $\varepsilon = 30 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) при окислении о-дианизидина регистрировали после быстрого перемешивания (16). За единицу активности фермента принимали количество о-дианизидина (мкмоль), окисленного за 1 мин, в расчете на 1 г сухой массы образца. Активность алкогольдегидрогеназы, НАДФ⁺-изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по ранее разработанным методикам (17-19).

Активность АДГ оценивали по скорости окисления этанола и образования НАДН ($\lambda = 340$ нм, $\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). К 2,2 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера (рН = 10) добавляли 0,1 мл 36 мМ раствора НАД⁺ и 0,1 мл 0,41 М раствора этанола. Реакцию инициировали введением 0,1 мл супернатанта. За меру активности фермента принимали количество НАД⁺ (мкмоль), восстановленного за 1 мин в процессе окисления этанола. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли посредством последовательного внесения в кювету 2,2 мл 0,01 М Трис-НСl буфера (рН 7,4), 0,1 мл 0,1 М раствора MgCl₂, 0,1 мл 0,025 М раствора НАДФ⁺ и 0,1 мл 0,05 М раствора глюкозо-6-фосфата. Реакцию инициировали введением 0,1 мл супернатанта. За меру активности фермента принимали количество НАДФН (мкмоль), восстановленного за 1 мин в процессе окисления глюкозо-6-фосфата. Для определения активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в кювету последовательно вносили 2,6 мл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 7,5), 0,1 мл 4 мМ раствора НАДФ⁺, 0,1 мл 0,1 М раствора MnCl₂, 0,1 мл 0,1 М изоцитрата Na. Реакцию инициировали введением 0,2 мл супернатанта. Активность фермента определяли по скорости окисления изоцитрата и образования НАДФН при $\lambda = 340$ нм ($\varepsilon = 6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

В покоящихся зерновках пшеницы урожая разных лет (2002-2007 годы) изучали активность пероксидазы и АДГ, а также других резервных катоболических и анаболических дегидрогеназ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы.

Спектрофотометрические исследования осуществляли на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S («Varian», США). В работе использовали НАД⁺, НАДФ⁺, Г6ФДГ («Reanal», Венгрия), этанол, очищенный перегонкой, о-дианизидин марки «ч.», очищенный возгонкой в вакууме, перекись водорода (30 % водный раствор) и антиоксиданты марки «о.ч.».

Статистическую обработку данных проводили по Т.Ф. Лакину (20). Приведены средние значения и их отклонения.

Результаты. Количество МДА в эндосперме и корнях у проростков пшеницы на 4-7-е сут проращивания различалось незначительно — соответственно 26,3-45,7 и 46,6-53,5 нмоль/г сухой массы, тогда как в зеленых семядолях содержание МДА было в 4-15 раз выше и изменялось от 219 до 623 нмоль/г сухой массы. Количество антиоксидантов в эндосперме составляло 0,379-0,579, в корнях — 0,650-1,980, в зеленых семядолях — 2,060-4,790 мг/г сухой массы. То есть в проростках изменение содержания малонового диальдегида всегда находилось в обратной зависимости от ко-

личества антиоксидантов. При этом скорость ПОЛ в различных частях растения была неодинакова: наибольшую в сочетании с самым высоким содержанием антиоксидантов отмечали в зеленых проростках, меньшие показатели — в корнях и эндосперме (табл. 1)

1. Динамика содержания антиоксидантов и малонового диальдегида в зерне и проростках пшеницы сорта Приленская 19

Время проращивания, сут	Зерно		Корни		Надземная часть	
	АО	МДА	АО	МДА	АО	МДА
4-е	0,579±0,180 (100)	26,3±1,4 (100)	1,690±0,150 (100)	53,4±4,2 (100)	3,010±0,240 (100)	219,0±12,0 (100)
6-е	0,379±0,090 (65,5)	39,4±3,1 (149)	0,650±0,080 (38,5)	46,6±3,6 (87,4)	2,060±0,180 (68,4)	623,0±18,0 (284)
7-е	0,555±0,120 (95,8)	45,7±3,3 (95,8)	1,980±0,180 (117,0)	53,5±3,8 (100,2)	4,790±0,350 (159,0)	494,0±15,0 (225,0)

Примечание. АО — антиоксиданты, мг/г сухой массы; МДА — малоновый диальдегид, нмоль/г сухой массы. В скобках указаны значения в процентах к исходному (на 4-е сут).

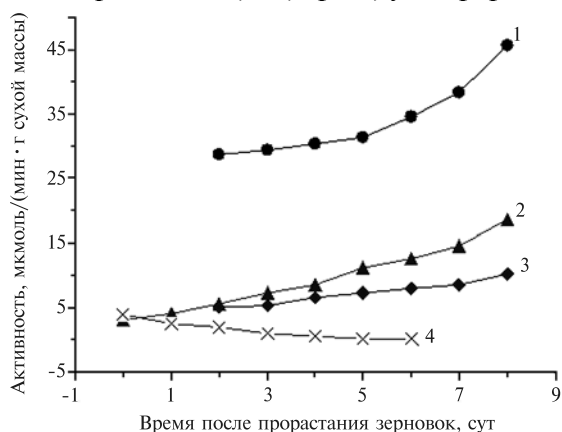
2. Активность алкогольдегидрогеназы и пероксидазы в жизнеспособных прорастающих и покоящихся зерновках пшеницы сорта Приленская 19

Время проращивания, сут	АДГ	ПО
Контроль (сухие)		
	3,8±0,3	3,0±0,3
Проросшие		
1-е	2,1±0,3	7,2±0,7
3-и	0,7±0,1	8,5±0,8
Непроросшие жизнеспособные		
1-е	4,3±0,4	2,4±0,2
3-и	4,6±0,4	3,5±0,2

Примечание. АДГ — алкогольдегидрогеназа, мкмоль/(мин · г сухой массы); ПО — пероксидаза.

В нейтрализации действия продуктов ПОЛ участвуют АДГ и пероксидаза. АДГ катализирует реакции восстановления альдегидов, пероксидаза регулирует содержание перекиси водорода и АО. Последние служат субстратами фермента и способны участвовать как в окислительных, так и в пероксидазных реакциях. Набухание и дальнейшее прорастание зерновок сопровождалось понижением активности

АДГ по сравнению с таковой у зерновок, находящихся в состоянии вынужденного покоя (на 3-и сут более чем в 5,4 раза) (табл. 2). У непроросших, но жизнеспособных зерновок в этот период активность фермента повышалась на 13-21 %. Активность пероксидазы у прорастающих зерновок возрастала в 2,4-2,8 раза, у непроросших практически не изменялась.



Активность пероксидазы в корнях (1), зерновках (2) и побегах (3), а также активность алкогольдегидрогеназы в зерновках (4) пшеницы сорта Приленская 19 в зависимости от времени прорастания.

стков в 1,8-2,0, в зерне — в 4-5, в корнях — в 12-14 раз. При этом к 6-м сут активность АДГ снижалась практически до нуля. Индивидуальный харак-

Следовательно, АДГ необходима преимущественно для зерновок, находящихся в состоянии покоя, тогда как пероксидаза не только участвует в поддержании жизнеспособности покоящихся зерновок, но и способна инициировать окислительно-восстановительные реакции на начальных этапах прорастания семян.

Как видно из рисунка, в покоящихся семенах пшеницы активность АДГ и пероксидазы соизмерима. Прорастание зерновок сопровождалось возрастанием активности пероксидазы в надземной части проростков

тер возрастания активности пероксидазы в различных частях проростков пшеницы, по-видимому, был обусловлен разным соотношением низкомолекулярных АО (см. табл. 1). Отмечалась корреляция между активностью пероксидазы и содержанием АО в надземной части и корнях проростков.

В опытах на зерновках пшеницы, хранившихся в течение нескольких лет, было установлено, что при снижении жизнеспособности семян уменьшается активность дегидрогеназ, а с понижением всхожести уменьшается активность пероксидазы (табл. 3).

3. Активность оксидоредуктаз в зерновках пшеницы сорта Приленская 19 в зависимости от продолжительности периода хранения

Период, годы	Жизнеспособность, %	Всхожесть, %	Активность, мкмоль/(мин · г сухой массы)			
			АДГ	ПО	Г6ФДГ	ИЦДГ
2002-2003	99±1	96±2	2,89	3,15	1,75	2,83
			(100)	(100)	(100)	(100)
2002-2005	88±2	79±5	1,56	1,59	1,22	2,11
			(53,9)	(50,5)	(68,6)	(74,6)
2002-2007	56±2	24±2	1,26	0,75	0,78	1,39
			(43,6)	(23,8)	(44,6)	(49,0)

Примечание. АДГ — алкогольдегидрогеназа, ПО — пероксидаза, Г6ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ИЦДГ — изоцитратдегидрогеназа. В скобках указаны проценты от значения при хранении в течение 1 года.

Ранее мы показали, что пероксидаза участвует в поддержании жизнеспособности зерновок злаковых культур, находящихся в состоянии вынужденного покоя и испытывающих в этот период недостаток экзогенной воды, так как фермент способен катализировать реакции последовательного восстановления кислорода до воды, за счет чего восполняется потребность зародыша в воде (21-24).

Таким образом, дегидрогеназы, в том числе алкогольдегидрогеназа, необходимы прежде всего для сохранения жизнеспособности семян и при запуске процессов, связанных с их прорастанием, тогда как пероксидаза, катализирующая реакции с участием кислорода и перекиси водорода, регулирует содержание этих веществ в покоящихся зернах. При прорастании семян повышается интенсивность аэробных биоэнергетических процессов, происходит активация оксидаз. Резкое возрастание активности пероксидазы может свидетельствовать о том, что фермент участвует в активизации пусковых механизмов прорастания семян, инициируя реакции свободнорадикального окисления, которые через активизацию перекисного окисления липидов способствуют возрастанию дыхательной активности митохондрий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по прорастанию покоящихся семян. Л., 1985.
2. Кершенгольц Б.М. Этанол и ацетальдегид в организмах растений и животных. Автореф. докт. дис. М., 1991.
3. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М., 2007.
4. Богатский А.В., Назарова Н.Ю., Кинтя П.К. Модификация бислойных липидных мембран среди стероидных гликозидов. Докл. АН СССР, 1960, 252(1): 235-237.
5. Кинтя П.К. Природные биорегуляторы стероидной природы. Журн. Всес. хим. общества им. Д.И. Менделеева, 1988, 33(5): 584-586.
6. Рогожин В.В., Говорова Т.П., Кершенгольц Б.М. Селективный метод титрования активных центров алкогольдегидрогеназы хлор- и гидроксимеркурибензоатом. Биоорганическая химия, 1988, 14(12): 1626-1631.
7. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys., 1986, 247(1): 1-11.
8. Halliwell B. The toxic effects of oxygen on plant tissues. In: Superoxide dismutase /L.W. Oberley (ed.). CRC Press, Boca Raton., 1982, v. 1: 89-123.
9. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена. Изв. РАН, Се-

- рия химическая, 1996, 1: 25-32.
10. Владимирова Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
 11. Обручева Н.В., Антипова О.В. Физиология инициации прорастания семян. Физиология растений, 1997, 44(2): 287-302.
 12. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах. Успехи современной биологии, 1993, 113(3): 286-296.
 13. Коган А.Х., Кудрин А.Н., Кактурский Л.В., Лосев Н.И. Свободно-радикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда. Патофизиология и экспериментальная терапия, 1992, 2: 5-15.
 14. Жизнеспособность семян /Под ред. М.К. Фирсовой. М., 1975.
 15. Методы биохимического исследования растений /Под ред. А.И. Ермакова. Л., 1987.
 16. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизида перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена. Биохимия, 1977, 42(8): 1372-1379.
 17. Кершенгольц Б.М., Рогожин В.В. Влияние межсубъединичного взаимодействия в алкогольдегидрогеназе из печени лошади на кинетику окисления этанола. Биохимия, 1979, 44(4): 661-671.
 18. Рогожин В.В. Возможные механизмы регулирования активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы избытком субстрата и кофермента. Биоорганическая химия, 1996, 23(8): 575-579.
 19. Методы биохимических исследований /Под ред. М.Н. Прохоровой. Л., 1982.
 20. Лакин Т.Ф. Биометрия. М., 1990.
 21. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб, 2004.
 22. Рогожин В.В., Перетолчин Д.В. Кинетика оксидантного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии пероксидазы хрена. Вест. ЮУрГУ, Сер. химия, 2010, 11(187): 61-65.
 23. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Роль компонентов антиоксидантной системы в механизмах прорастания зерен пшеницы. Вест. АГАУ, 2010, 11(73): 31-38.
 24. Рогожин В.В., Курилюк Т.Т. Роль пероксидазы в механизмах покоя и прорастания зерен злаковых культур. Изв. ТСХА, 2010, 4: 22-31.

¹ФГБОУ ВПО Якутская государственная сельскохозяйственная академия,
677002 г. Якутск, ул. Красильникова, 15,
e-mail: vrogozhin@mail.ru;

²Филиал Байкальского государственного университета экономики и права,
677000 г. Якутск, Вилюйский тракт, 4 км, 3

Поступила в редакцию
27 ноября 2009 года

ABOUT PARTICIPATION OF OXIDOREDUCTASES IN MECHANISMS OF DORMANCY AND GERMINATION IN WHEAT CORN

V.V. Rogozhin¹, T.T. Kurilyuk¹, T.V. Rogozhina²

S u m m a r y

The authors estimated the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase (NAD⁺), alcohol dehydrogenase and peroxidase in wheat corn and seedlings (*Triticum aestivum* L.). It was established, that these dehydrogenases are required for the retention of seed viability and for the initiation of processes, related with seed germination. The peroxidase, catalyzing the reactions with participation of oxygen and hydrogen peroxide, regulates the content of these substances in dormant corn. Considerable increase of peroxidase activity during germination of corn seeds can suggest about participation of this enzyme in activation of starting mechanism of respiration.

Новые книги

Викторова Т.В., Асанов А.Ю. **Биология**. М.: изд-во «Академия», 2011, 320 с.

Хван Т.А. **Безопасность жизнедеятельности**: уч. пос. М.: изд-во «Феникс», 2010, 414 с.

В учебном пособии рассмотрены закономерности структурно-функциональной организации биологических систем на молекулярном, клеточном, организменном и биосферном уровнях. Использована информация о современных достижениях в различных областях биологических наук.

Изложены вопросы идентификации опасных и вредных факторов в системе «человек—среда», предупреждения воздействия негативных факторов и ликвидации их последствий на организм в бытовой и производственной среде в мирное время и в случае возникновения чрезвычайных ситуаций.