

Н.В. НУЖИНА

НДЛ «Інтродукованого та природного фіторізноманіття» ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Україна, 01032 м. Київ, вул. Симона Петлюри, 1

СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У *AYLOSTERA FLAVISTYLA* F. RITT., *ECHINOCACTUS GRUSONII* HILDM. ТА *MAMILLARIA BOCASANA* POS. (CACTACEAE) ЗА УМОВ ГІПЕРТЕРМІЇ

Наведено дані щодо перекисного окиснення ліпідів і зміни активності пероксидази та супероксиддисмутази у стеблах незагартованих однорічних рослин *Aylostera flavistyla* F. Ritt., *Echinocactus grusonii* Hildm. та *Mamillaria bocasana* Pos. (Cactaceae) після впливу високих температур (+40 або +50 °C) протягом трьох годин. Виявлено різні механізми пристосування досліджуваних видів до гіпертермії на біохімічному рівні. Для однорічних рослин *A. flavistyla*, *E. grusonii* та *M. bocasana* різке підвищення температури до +40 °C є стресом. Антиоксидантний захист при температурному стресі відбувається найінтенсивніше у *E. grusonii*, переважно за рахунок пероксидази. Активність супероксиддисмутази при стресі в досліджених видів знижується. Найменш стійкими до гіпертермії виявилися рослини *A. flavistyla*.

Ключові слова: *Aylostera flavistyla*, *Echinocactus grusonii*, *Mamillaria bocasana*, гіпертермія, пероксидаза, супероксиддисмутаза, малоновий діальдегід.

Представники родини *Cactaceae* Juss. належать до посухо- та жаростійких рослин. Деякі види можуть витримувати температуру ґрунту до +74 °C [11]. Однак види родини мають різну пристосованість до нестачі води та гіпертермії. Актуальність проблеми зникання рідкісних видів зростає в зв'язку з посиленням нестабільності клімату на планеті, що виявляється, зокрема, різкими перепадами температури [7].

Як відомо, гіпертермія, як і інші абіотичні стреси, спричиняє окисний стрес рослин з утворенням активних форм кисню та активацією перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [4, 12, 13]. Якщо при цьому синхронно збільшується активність антиоксидантних систем, то можна стверджувати, що адаптація є успішною. Згідно з відомою схемою антиоксидантного захисту клітин [6, 10], супероксидні аніон-радикали з періодом напіврозпаду менше ніж 1 с руйнуються за допомогою супероксиддисмутази (СОД). Утворений при цьому пероксид водню розкладається за допомогою каталази і пероксидаз. Ця трійка ферментів є первинною ланкою захисту від активних форм кисню.

© Н.В. НУЖИНА, 2016

Мета дослідження — встановити інтенсивність температурного стресу у деяких рідкісних та зникаючих видів родини *Cactaceae* та виявити механізми, які запобігають розвитку окисного стресу при гіпертермії.

Матеріал та методи

Об'єктами дослідження були види родини *Cactaceae* з колекції Ботанічного саду імені акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка: *Aylostera flavistyla* F. Ritt., *Mamillaria bocasana* Pos., *Echinocactus grusonii* Hildm. Останні два види занесено до Червоного списку Міжнародного союзу охорони природи. Для дослідів відбирали види з різними природними ареалами, тобто з різною пристосованістю до високих температур повітря.

Aylostera flavistyla поширена в Болівії (департамент Таріха). Зростає в горах до 2000 м н.р.м. серед уламкових порід [3]. Природний ареал *Echinocactus grusonii* — Центральна Мексика (штати Сан-Луїс-Потосі та Ідальго). Зростає на крутих схилах, у гірських ущелинах, на глинисто-вапнякових ґрунтах [3]. *Mamillaria bocasana* поширена в Мексиці (штати Сан-Луїс-Потосі та Сакатекас). Зростає в горах до

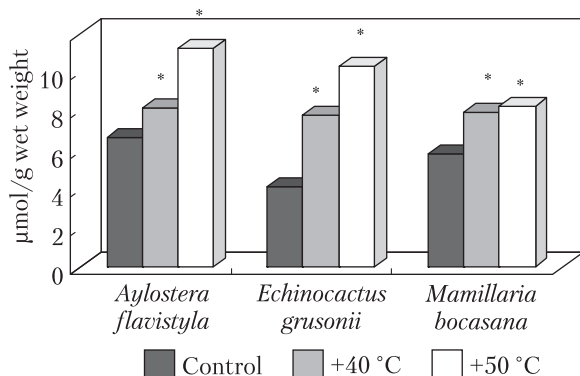


Рис. 1. Концентрація малонового діальдегіду у видів родини *Cactaceae*, де * — $p < 0,05$ (статистично значуща різниця щодо контрольного показника)

Fig. 1. Malonic dialdehyde concentration in the species of family *Cactaceae*, where * — $p < 0.05$ (compared with the control group)

1750—2300 м н.р.м. між камінням, у напівпустелях на вулканічних породах [3].

Для дослідів використовували стебла однорічних (висіяних одночасно) рослин. Узимку рослини утримували на добре освітленому місці за температури +10—15 °С. Досліди проводили в першій декаді травня (денна температура в оранжереях — +25—26 °С), на неадаптованих до високих температур рослинах. Рослини у горщиках з ґрунтом прогрівали у термостаті за температури +40 або +50 °С протягом 3 год. [2]. Температуру в термостаті контролювали термометром, розміщеним на рівні рослин. Контрольну групу рослин утримували за температури +26 °С. Усі досліди проводили в 3—4-разовій повторюваності. Активність пероксидази, СОД та кількість малонового діальдегіду (МДА) визначали за допомогою спектрофотометра СФ-2000 за методикою [2].

Перекисне окиснення ліпідів оцінювали за вмістом МДА, визначеним у кольоровій реакції з тіобарбітуровою кислотою, яка ґрунтується на утворенні в кислому середовищі забарвленого триметинового комплексу з характерним спектром поглинання з максимумом за довжини хвилі 533 нм.

Активність СОД визначали за допомогою методу, який ґрунтується на здатності СОД

конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні радикали, які надходять з реакції фотоокиснення рибофлавіну, за довжини хвилі 560 нм.

Активність пероксидази оцінювали за швидкістю реакції окиснення бензидину до утворення синього продукту його окиснення за наявності H_2O_2 і пероксидази за довжини хвилі 590 нм.

Результати та обговорення

Як відомо, ступінь ПОЛ — важливий показник для оцінки стану клітин рослин і розвитку в них стресової реакції. Накопичення МДА вказує на низьку стійкість рослин до дії зовнішніх чинників.

Збільшення концентрації МДА в усіх досліджених видів після дії гіпертермії свідчить про стресовий вплив різкої дії температури +40 °С і посилення стресу при прогріванні до +50 °С (рис. 1). Відносно стійкими до дії температури +50 °С виявилися рослини *M. bocasana*.

Контрольні рослини *E. grusonii* мали дещо меншу кількість МДА, відносно низьку активність СОД та пероксидази (порівняно з іншими двома видами), (рис. 2 та 3), що, можливо, вказує на більшу роль, яку відіграє у захисті рослин від негативних зовнішніх чинників морфологічна та анатомічна будова.

За літературними даними, посилення гіпертермії або гіпотермії спричиняє рівномірне зниження активності СОД у багатьох видів рослин [9, 13]. Для деяких видів (зокрема *Hydrilla verticillata* L.) активність СОД збільшувалась за температури +45 °С і зменшувалась за температури +55 °С [8]. Зниження активності СОД в інших вищих і нижчих наземних рослин, імовірно, відбувається за рахунок денатурації ферменту [4]. Ми отримали схожі результати. Зниження активності СОД після дії високих температур у всіх досліджених видів, імовірно, спричинене руйнуванням ферменту. Для *A. flavistyla* активність СОД при дії температури +40 °С не відрізнялась достовірно від контрольного показника і була найвищою серед досліджених видів (див. рис. 2), тобто цей фермент відіграє провідну роль в

адаптивних реакціях рослин виду. Найбільша кількість СОД у контрольних рослин характерна для *M. bocasana*, що може свідчити про більшу толерантність виду до стресових чинників. Підвищення активності СОД за температури +50 °С порівняно із +40 °С у *M. bocasana* може пояснюватися залученням додаткових захисних механізмів при сильнішому стресі і, можливо, стимуляцією клітин до синтезу ферментів *de novo*. Збільшення вмісту СОД у цього виду може бути причиною меншого підвищення рівня МДА порівняно з іншими видами за температури +50 °С. Оскільки інтенсивність ПОЛ визначається, з одного боку, швидкістю генерації активних форм кисню, а з другого — ефективністю роботи антиоксидантної системи, провідну роль у відповіді на стрес відіграє СОД [10].

Після дії теплового стресу активність пероксидази зростала у *E. grusonii*, прямо пропорційно інтенсивності стресу. Ймовірно, при гіпертермії в цього виду не лише активуються наявні в клітинах ізоферменти пероксидази, а і синтезуються нові.

Рівень активності пероксидази в контрольних умовах у *M. bocasana* найменший, проте для цього виду характерне збільшення активності ферменту за температури +40 °С і менш інтенсивне збільшення активності — за температури +50 °С (див. рис. 3).

Зміни активності пероксидази внаслідок стресу у *A. flavistyla* відрізнялися від таких у попередніх видів: в нормі спостерігали найвищу активність пероксидази, яка достовірно не змінювалася при прогріванні до температури +40 °С, а за наявності інтенсивного стресового чинника (+50 °С) вона зменшувалася, можливо, через денатурацію ферменту.

У *M. bocasana* та *E. grusonii* пероксидаза відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті рослин, тоді як активність СОД значно знижується. Реакція антиоксидантної системи у *A. flavistyla* відрізняється від такої в інших видів. Для цього виду характерне незначуще зменшення активності досліджених антиоксидантних ферментів за температури +40 °С, тоді як за температури +50 °С відбувається

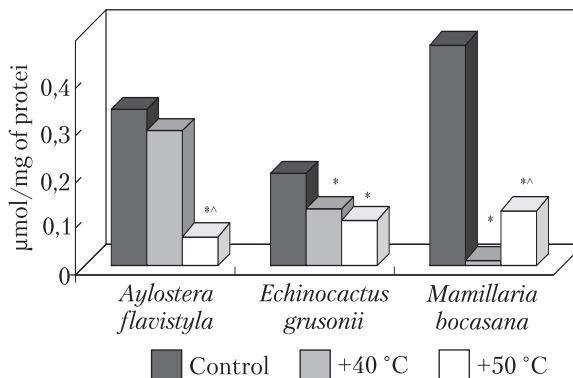


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази у видів родини *Cactaceae*, де * — статистично значуща різниця щодо контрольного показника ($p < 0,05$); ^ — відносно показника за температури +40 °С ($p < 0,05$)

Fig. 2. Superoxide dismutase activity in the species of family *Cactaceae*, where * — $p < 0.05$ (compared with the control group); ^ — compared with the + 40 °C group

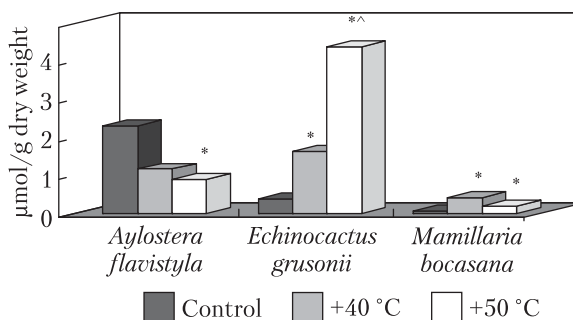


Рис. 3. Активність пероксидази у видів родини *Cactaceae*, де * — статистично значуща різниця щодо контрольного показника ($p < 0,05$); ^ — відносно показника за температури +40 °С ($p < 0,05$)

Fig. 3. Peroxidase activity in the species of family *Cactaceae*, where * — $p < 0.05$ (compared with the control group); ^ — compared with the + 40 °C group

пригнічення захисних ферментних реакцій. Можливо, для *A. flavistyla* характерна повільна активація захисних антиоксидантних систем, що компенсується високим вмістом СОД та пероксидази в нормі. Для *E. grusonii*, природний ареал якого має сприятливіші умови, захисні антиоксидантні механізми полягають переважно в швидкому підвищенні активності пероксидази, тоді як для інших видів, котрі зростають на гірських породах на висоті близько

2000 м н.р.м., характерна сповільнена біохімічна реакція, компенсована запасом антиоксидантних ферментів у нормі.

Висновки

Незважаючи на те, що всі досліджені види належать до сукулентів, отримані дані свідчать, що різке підвищення температури до +40 °C для них є стресом. Антиоксидантний захист при температурному стресі відбувається найінтенсивніше в *E. grisonii*, переважно за рахунок пероксидази. Найменш стійкими до гіпертермії виявилися однорічні рослини *A. flavistyla*.

Автор висловлює подяку науковому співробітнику НДЛ «Інтродукованого та природного фіторізноманіття» ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Катерині Михайлівні Баглай за наданий рослинний матеріал.

1. *Методы* определения редокс-статуса культивируемых клеток растений / Г.В. Сибгатулина, Л.П. Хаертдинова, Е.А. Гумерова и др. — Казань: Казан. (Приволжский) Федеральный ун-т, 2011. — 61 с.
2. *Мусієнко М.М.* Протекторна роль цитокініну за дії теплового стресу на рослини пшениці / М.М. Мусієнко, В.В. Жук, Л.М. Бацманова // Укр. ботан. журн. — 2014. — Т. 71, № 2. — С. 244—249.
3. *Anderson E.F.* The cactus family / E.F. Anderson. — Portland, Oregon: Timber Press, 2001. — 776 p.
4. *Barkasdjieva N.T.* Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase / N.T. Barkasdjieva, K.N. Chrostov, K.N. Christina // Biol. Plant. — 2000. — Vol. 43. — P. 73—78.
5. *Bowler C.* Superoxide dismutase and stress tolerance / C. Bowler, M. Montagu, D. Inze // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1992. — Vol. 43. — P. 83—116.
6. *Grant J.J.* Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance / J.J. Grant, G.J. Loake // Plant Physiol. — 2000. — Vol. 124. — P. 21—29.
7. *Levitt J.* Plant responses to environmental stress / J. Levitt. — London, Academic Press, 1980. — Vol. 1.
8. *Panda S.K.* Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress / S.K. Panda, M.H. Khan // Braz. J. Plant Physiol. — 2004. — Vol. 16(2). — P. 115—118.
9. *Smirnov N.* The role of active oxygen in response to water deficit and desiccation / N. Smirnov // New Phytol. — 1993. — Vol. 125. — P. 27—58.
10. *Sunkar R.* Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance / R. Sunkar, A. Kapoor, J.K. Zhu // Plant Cell. — 2006. — Vol. 18. — P. 2051—2065.
11. *Temperatures* and thermal tolerances for cacti exposed to high temperatures near the soil surface / P.S. Nobel, G.N. Geller, S.C. Kee, A.D. Zimm // Plant, Cell & Environment. — 1986. — Vol. 9, N 4. — P. 279—287.
12. *Tolerance* of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences / J.A. Hernandez, J. Jimenez, P. Mullineaux, F. Sevilla // Plant Cell Environ. — 2000. — Vol. 23. — P. 583—862.
13. *Zhang J.* Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. / J. Zhang, M. Kirkham // Plant Cell Physiol. — 1994. — Vol. 35. — P. 785—791.

REFERENCES

1. *Sibgatullina, G.V., Haertdinova, L.R., Gumerova, E.A. et al.* (2011), Metody opredelenija redoks-statusa kul'tiviruemykh kletok rastenij. [Methods of redox status determining of the cultured plant cells]. Kazan: Kazanskij (Privolzhskij) Federalnyj universitet, 61 p.
2. *Musijenko, M.M., Zhuk, V.V. and Bacmanova, L.M.* (2014), Protektorna rol cytokininu za dii teploвого stresu na roslyny pshenyци [The protective role of cytokines by the action of heat stress on wheat plants]. Ukr. Bot. J., vol. 71, N 2, pp. 244—249.
3. *Anderson, E.F.* (2001), The cactus family. Portland, Oregon: Timber Press, 776 p.
4. *Barkasdjieva, N.T., Chrostov, K.N. and Christina, K.N.* (2000), Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase. Biol. Plant., vol. 43, pp. 73—78.
5. *Bowler, C., Montagu, M. and Inze, D.* (1992), Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., vol. 43, pp. 83—116.
6. *Grant, J.J. and Loake, G.J.* (2000), Role of active oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiol., vol. 124, pp. 21—29.
7. *Levitt, J.* (1980), Plant responses to environmental stress. London, Academic Press, vol. 1.
8. *Panda, S.K. and Kha, M.H.* (2004), Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. Braz. J. Plant Physiol., vol. 16(2), pp. 115—118.
9. *Smirnov, N.* (1993), The role of active oxygen in response to water deficit and desiccation. New Phytol., vol. 125, pp. 27—58.
10. *Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K.* (2006), Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. Plant Cell, vol. 18, pp. 2051—2065.

lation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, vol. 18, pp. 2051–2065.

11. Nobel, P.S., Geller, G.N., Kee, S.C. and Zimm, A.D. (1986), Temperatures and thermal tolerances for cacti exposed to high temperatures near the soil surface. *Plant, Cell & Environment*, vol. 9, N 4, pp. 279–287.
12. Hernandez, J., Jimenez, J., Mullineaux, P., and Sevilla, F. (2000), Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.*, vol. 23, pp. 583–862.
13. Zhang, J. and Kirkham, M. (1994), Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. *Plant Cell Physiol.*, vol. 35, pp. 785–791.

Рекомендував до друку В.Ф. Левон
Надійшла до редакції 22.01.2016 р.

Н.В. Нужина

НИЛ «Інтродуцированного и природного фиторазнообразия» ННЦ «Інститут биології» Київського національного університета імені Тараса Шевченка, Україна, г. Київ

СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У *AYLOSTERA FLAVISTYLA* F. RITT., *ECHINOCACTUS GRUSONII* HILDM. И *MAMILLARIA BOCASANA* POS. (*CACTACEAE*) В УСЛОВИЯХ ГИПЕРТЕРМИИ

Приведены данные о перекисном окислении липидов и изменении активности пероксидазы и супероксиддисмутазы в стеблях незакаленных однолетних растений *Aylostera flavistyla* F. Ritt., *Echinocactus grusonii* Hildm. и *Mamillaria bocasana* Pos. (*Cactaceae*) после воздействия высоких температур (+40 или +50 °C) в течение трех часов. Выявлены разные механизмы приспособления исследуемых видов к гипертермии на биохимическом уровне. Для однолетних растений

Aylostera flavistyla, *Echinocactus grusonii* и *Mamillaria bocasana* резкое повышение температуры до +40 °C является стрессом. Антиоксидантная защита при температурном стрессе происходит наиболее интенсивно у *E. grusonii*, преимущественно за счет пероксидазы. Активность супероксиддисмутазы при стрессе у исследуемых видов снижается. Наименее устойчивыми к гипертермии оказались растения *A. flavistyla*.

Ключевые слова: *Aylostera flavistyla*, *Echinocactus grusonii*, *Mamillaria bocasana*, пероксидаза, супероксиддисмутаза, малоновый диальдегид.

N.V. Nuzhyna

Educational and Scientific Centre “Institute of Biology” of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, Kyiv

ANTIOXIDANT SYSTEM OF *AYLOSTERA FLAVISTYLA* F. RITT., *ECHINOCACTUS GRUSONII* HILDM. AND *MAMILLARIA BOCASANA* POS. (*CACTACEAE*) UNDER HYPERTHERMIA

Data about lipid peroxidation and changing peroxidase and superoxidisedismutase activity in annuals non-hardened plant stems of *Aylostera flavistyla* F. Ritt., *Echinocactus grusonii* Hildm. and *Mamillaria bocasana* Pos. (*Cactaceae*) under exposure to high temperatures (+40 or 50 °C) for three hours. Different mechanisms of adaptation to hyperthermia studied species at the biochemical level were revealed. Sharp temperature increase to 40 °C is stress for annuals plants *A. flavistyla*, *E. grusonii* and *M. bocasana*. Antioxidant protection when the temperature stress is most intense in *E. grusonii*, to a greater extent by peroxidase. The superoxide dismutase in stress in the studied species is reduced. The least resistant plants were hyperthermia *A. flavistyla*.

Key words: *Aylostera flavistyla*, *Echinocactus grusonii*, *Mamillaria bocasana*, hyperthermia, peroxidase, superoxid dismutase, malonic dialdehyde.