

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 633.14:581.44.036.2:577.151

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СИСТЕМЫ СИНТЕЗА БТШ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ РЖИ В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОГО ТЕПЛООВОГО ШОКА

Шабуня П.С., Кузовкова А.А., Спиридович Е.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: polinashabunya@nm.ru

На основе полученных ранее данных о влиянии кратковременного теплового шока (ТШ) на активность антиоксидантных ферментов и экспрессию белков теплового шока (БТШ) в ядрах и хлоропластов проростков озимой ржи Пуховчанка на стадиях: прорастания (24 часа), развития coleoptily (72 часа) и 1-го полностью сформированного листа (168 часов) анализируется согласованность работы систем БТШ и антиоксидантных ферментов при тепловом стрессе. Показано, что активность цитоплазматических пероксидаз гваялового типа (ПГТ) положительно коррелирует с активностями цитоплазматической аскорбатпероксидазы и хлоропластной каталазы независимо от возраста проростков. В ядрах при ТШ интенсивность синтеза ядерных БТШ положительно коррелирует с изменениями активности ПГТ.

Биохимические процессы, происходящие в растении во время и после стресса, активно исследуются учеными с целью получения знаний для создания устойчивых к стрессу форм и сортов. Тепловой шок (ТШ) часто используется как модельный стресс для изучения отдельных компонентов ответной реакции растений. В настоящее время идентифицировано значительное количество стрессовых белков, принимающих участие в формировании защитного ответа на ТШ, выяснены единичные звенья в индукции и проявлении этой реакции. Однако окончательно неясно, как активируются и регулируются гены этих белков, какова их роль в метаболизме клетки. Установлено, что главным классом стрессовых белков при ТШ являются белки теплового шока (БТШ) [1]. В нормальных условиях большинство БТШ не обнаруживаются в вегетативных тканях, но быстро появляются в ответ на нагревание. В клетках растений они стабилизируют поврежденные стрессом белки, и таким образом содействуют их ренатurationи и/или деградациии в период восстановления [2].

Другой важный механизм, который включается в клетках в ответ на ТШ – это модификация антиоксидантной системы. Данные изменения являются следствием накопления активных форм кислорода (АФК). При ТШ АФК аккумулируются во всех компартментах клетки и являются активными участниками ответных реакций на стресс. Для их нейтрализации растения обладают хорошо развитыми антиоксидантными системами

двух типов: ферментной (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза) и неферментной (глутатион, аскорбат, α -токоферол, каротиноиды, фенольные соединения). В настоящее время все более очевиден факт индуцированного ТШ взаимодействия антиоксидантной системы и системы синтеза БТШ растений, когда их согласованное действие направлено на обеспечение нормального функционирования клетки в условиях стресса и после него. Показано, например, что экспрессия генов цитоплазматической аскорбатпероксидазы *Arabidopsis thaliana* регулируется ТШ через факторы транскрипции ТШ [3], и в генах этих ферментов присутствуют особые последовательности нуклеотидов HSE (heat shock elements), характерные для генов БТШ. С другой стороны высказывается предположение, что сами факторы ТШ в растениях активизируются как ТШ, так и окислительным стрессом, в частности, перекисью водорода [3,4]. Установлено, что обработка H_2O_2 растений петрушки [4] и томата [3] приводит к синтезу в их клетках низкомолекулярных БТШ. На основе результатов исследований [5,6] трансгенных растений различных видов, экспрессирующих чужеродные гены, повышающие устойчивость к различного рода стрессам, был составлен сигнальный путь развития ответной реакции растительной клетки на ТШ. В данном пути АФК участвуют как в активации факторов транскрипции ТШ, так и воздействуют на регуляторные элементы других генов, чьи продукты участвуют в ответе на ТШ. Вероятно, из-за неподвижного образа жизни растения приобрели не только более развитые антиоксидантную и БТШ системы, чем у животных, но и более тонкую систему регуляции этих и других защитных механизмов от ТШ. В растительных клетках присутствуют разнообразные вещества-антиоксиданты и антиоксидантные ферменты, а также уникальные органелльные низкомолекулярные БТШ, что возможно связано с функционированием в растениях большого количества факторов транскрипции ТШ (в среднем около 20 [7], тогда как в дрожжах и *Drosophila* выявлен 1 фактор ТШ, а у позвоночных – 3 [8-10]).

Проведенные нами исследования активности отдельных антиоксидантных ферментов и накопления БТШ в условиях ТШ в проростках ржи на ранних стадиях развития представляют новые данные, предполагающие существование взаимосвязи антиоксидантной системы и системы накопления БТШ в озимой ржи в стрессовых условиях. В наших работах [11,12] было показано, что такие антиоксидантные ферменты, как супероксиддисмутаза (СОД), аскорбатпероксидаза (АПО), каталаза и пероксидазы гваяколового типа (ПГТ), реагируют на ТШ по-разному, в зависимости от их локализации в клетке и стадии развития проростков ржи. Так, под действием кратковременного ТШ в цитоплазматической фракции активность исследуемых антиоксидантных ферментов или достоверно не

изменялась (для АПО и каталазы в проростках на стадии прорастания (24 часа) и для АПО, СОД и каталазы в проростках на стадии развития колеоптиля (72 часа)), или снижалась (для ПГТ и СОД в растениях на этапе прорастания и АПО и ПГТ из проростков в фазе 1-го полностью сформированного листа (168 часов)), или увеличивалась (для ПГТ из 72-часовых проростков и каталаз, СОД из 168-часовых проростков) по сравнению с контролем [11,12]. В то же время хлоропластные каталазы и пероксидазы характеризуются стабильным снижением активности в условиях ТШ независимо от возраста проростков, а ядерные ПГТ, напротив, – значительным усилением активности с максимальным ответом в 72-часовых проростках [11,12]. При этом количество новых органелльных (ядерных и хлоропластных) БТШ и интенсивность экспрессии нормальных белков зависели от возраста проростков и органеллы [12,13]. Так в условиях кратковременного ТШ БТШ активнее накапливались в хлоропластах проростков ржи, находящихся на более поздней стадии развития (6 БТШ в 168-часовых проростков против одного БТШ в 72-часовых) [13]. Наибольшее количество БТШ в ядре индуцировалось ТШ в проростках на стадиях прорастания и развития колеоптиля. В нуклеоплазме клеток 24-часовых проростков появлялся 1 БТШ, в 72-часовых растениях – 6 БТШ. Одновременно с эти ТШ независимо от стадии развития усиливал экспрессию нуклеоплазмальных белков с $M_m \sim 35-40$ кДа, которые, по-видимому, являются аналогами БТШ, экспрессирующимися и в нормальных условиях [12]. Интересно, что индуцированные ТШ основные изменения в белковом составе хлоропластов и ядер происходили в сходных по своим функциям компартментам – соответственно, строме и нуклеоплазме. В остальных же фракциях ядерных белков изменения были незначительными или не наблюдались вовсе [12].

Оценку взаимосвязей антиоксидантных ферментов и системы синтеза БТШ осуществляли с помощью корреляционного анализа с расчетом коэффициента Пирсона. Была выявлена сопряженность в работе некоторых из изученных ферментных систем, что подтверждают полученные достоверные коэффициенты корреляции (r). Так, изменения активности цитоплазматических ПГТ коррелировали с активностью цитоплазматической АПО ($r = 0,67$) и активностью хлоропластной каталазы ($r = 0,7$) независимо от возраста проростков и температурных условий. Как уже отмечалось выше, количество новых органелльных БТШ и интенсивность экспрессии нормальных белков зависели от возраста проростков и органеллы, и только в ядрах количество индуцированных высокой температурой БТШ находилось в прямой зависимости от активности ПГТ ($r = 0,97$). На основе уже существующей схемы общего защитного ответа растительной клетки на высокие температуры [5, 6] и полученных нами данных была

составлена подобная схема ответной реакции на ТШ и клетки озимой ржи, дополненная взаимодействием антиоксидантной системы и системы синтеза БТШ (рис. 1).

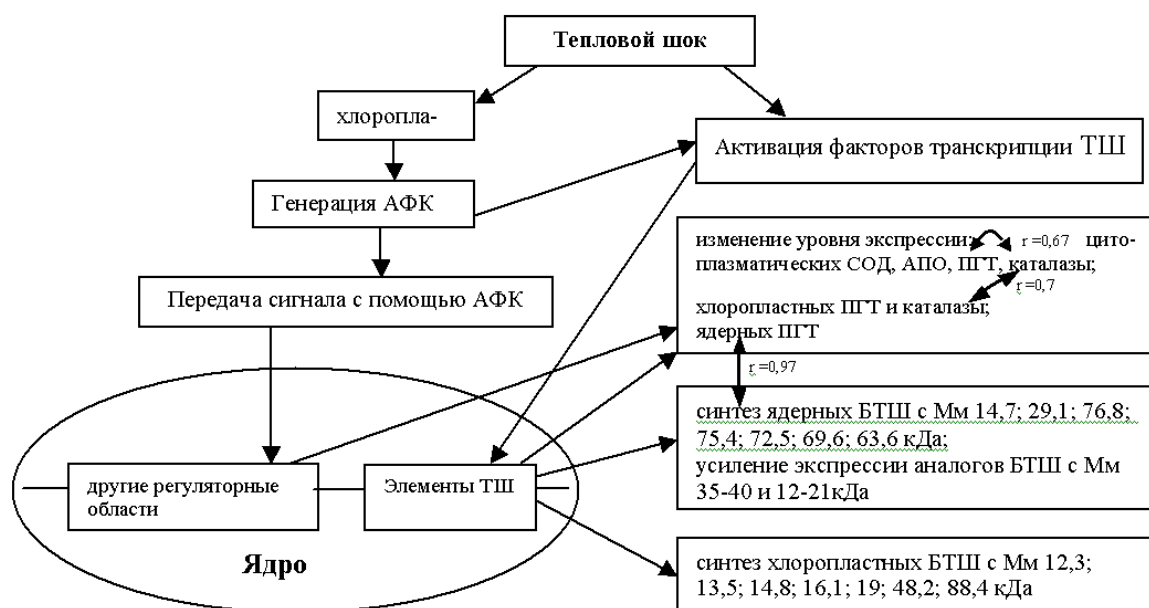


Рис. 1. Предполагаемая схема ответной реакции на тепловой шок клетки озимой ржи на ранних стадиях развития

Таким образом, защитный механизм клетки озимой ржи против ТШ – это сложная система сигналов и реакций, в которой важное место занимают генерация АФК и активация антиоксидантных ферментов, а также индукция синтеза БТШ.

Литература

1. Kimpel, J.A. Heat shock in plants / J.A. Kimpel, J.L. Key // Trends Biochem. Sci. – 1985. – Vol. 10, № 1. – P. 353–357.
2. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors / S.K. Baniwal [et al.] // J. Biosci. – 2004. – Vol. 29, № 4. – P. 471-487.
3. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells / N. Banzet [et al.] // The Plant Journal. – 1998. – Vol. 13, № 4. – P. 519-527.
4. Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock / H. Eckey-Kaltenbach [et al.] // Plant Mol. Biol. - 1997. - Vol. 33. - P. 343-350.
5. Acquired tolerance to temperature extremes / D.-Y. Sung [et al.] // Trends in Plant Science. – 2003. – Vol. 8, № 4. – P.179-187.
6. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response / W.Wang [et al.] // Trends in Plant Science. – 2004. – Vol. 9, № 5. – P.244-252.

7. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors / S.K. Baniwal [et al.] // J. Biosci. – 2004. – Vol. 29, № 4. – P. 471-487.
8. Morimoto, R.I. Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators / R.I. Morimoto // Genes Dev. - 1998. - Vol. 12. – P. 3788-3796.
9. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? / L. Nover [et al.] // Cell Stress Chaperones. - 2001. - Vol. 6. - P. 177-189.
10. Nakai, A. New aspects in the vertebrate heat shock factor system : HsFA3 and HSFA4 / A. Nakai // Cell Stress Chap. – 1999. – Vol. 4. – P.86-93.
11. Шабуня, П.С. Влияние кратковременного теплового шока на поведение антиоксидантных ферментов в проростках озимой ржи на ранних стадиях онтогенеза / П.С. Шабуня, А.А. Ленец, Е.В. Спиридович // Весці НАН Беларусі, Сер. біял. навук. - 2006. - № 1. - С. 16-22.
12. Шабуня, П.С. Активность антиоксидантных ферментов и экспрессия белков теплового шока в ядрах проростков озимой ржи (*Secale cereale* L.) в условиях кратковременного повышения температуры / П.С. Шабуня, А.А. Ленец, Е.В. Спиридович // Вестник ФФИ. - 2007. - №3. – С.48-60.
13. Шабуня, П.С. Влияние кратковременного теплового шока на накопление малых белков теплового шока в хлоропластах проростков озимой ржи на ранних стадиях онтогенеза / П.С. Шабуня, А.А. Ленец, Е.В. Спиридович // Весці НАН Беларусі, Сер. біял. навук. - 2006. - №.2. - С. 9-12.

Summary

Influence of short-time heat shock (HS) on activity of antioxidant enzymes and on expression of heat shock proteins (HSP) in nuclei and chloroplasts was investigated in winter rye (var. Puhovchanka) seedlings at the following stages of development: 1) germination, 2) coleoptile development, 3) first true leaf. It was revealed, that activity of cytoplasmic guaiacol peroxidases correlate positively with activities of cytoplasmic ascorbateperoxidase and chloroplast catalase irrespective of age. Intensity of nuclear HSP synthesis correlates positively with changes in nuclear guaiacol peroxidase activity under HS.