

УДК 581.19

УЧАСТИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ СЕМЯН СОИ К ВОЗДЕЙСТВИЮ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В.А. Кузнецова, Л.Е. Иваченко, М.П. Михайлова

Аннотация

При прорастивании семян сои (*Glycine max* (L.) Merril) с добавлением солей тяжелых металлов установлена корреляция между удельной активностью пероксидаз и их множественными формами. Показано, что сульфаты свинца и кадмия вызывают появление новых форм фермента с высокой электрофоретической подвижностью, что свидетельствует об участии выявленных форм в молекулярном механизме адаптации к окислительному стрессу. Внесение к солям тяжелых металлов биофлавоноида дигидрокверцетина, обладающего антиоксидантной активностью, привело к снижению удельной активности пероксидаз и появлению новых форм фермента, отсутствующих в контрольных образцах.

Ключевые слова: соя, множественные формы пероксидаз, дигидрокверцетин, тяжелые металлы, окислительный стресс, адаптация.

Введение

Соя – ценнейшая белково-масличная культура. В Амурской области находится половина соевых полей Российской Федерации. В мировом производстве растительного масла соя занимает первое место среди всех масличных растений, а по сборам белка лидирует среди всех зерновых и зернобобовых культур.

Развитие промышленности в Амурской области приводит к возрастающему поступлению тяжелых металлов (ТМ) в окружающую среду и к загрязнению почвы. Аккумуляция ТМ в растениях вызывает окислительный стресс, что снижает количество и качество урожая. Любой ТМ, накапливаясь в растении в большом количестве, может конкурировать с физиологически важными металлами за места в активных центрах каталитических систем, инактивируя их и нарушая тем самым важнейшие функции растительного организма [1].

Особое место в защитных реакциях растений от окислительного стресса, вызванного действием ТМ, принадлежит антиоксидантным ферментам, активность которых значительно возрастает в стрессовых условиях. Это приводит к нейтрализации свободных радикалов и пероксидов, образующихся при окислительном стрессе, что способствует повышению устойчивости растений. По увеличению активности антиоксидантных ферментов можно судить о проявлении защитной реакции клеток к действию ТМ [2].

Одним из важных антиоксидантных ферментов является пероксидаза, которая осуществляет контроль уровня пероксида водорода в клетках растений,

а также является универсальным индикатором стрессового состояния растений и критерием устойчивости к стрессу [3].

Под действием неблагоприятных условий среды, в том числе тяжелых металлов, спектр множественных форм пероксидаз подвергается значительной изменчивости, что обеспечивает устойчивость организма к воздействию внешних факторов и регуляцию гомеостаза. [4].

Если антиоксидантная система не справляется с защитой растительной клетки от действия стресса, актуально включить антиоксидант извне. Эффективным антиоксидантом является флавоноид дигидрокверцетин (ДГК), который в Амурской области получают из листовницы даурской. Способность ДГК предотвращать свободнорадикальные процессы, возникающие в клетках при окислительном стрессе, является важной для последующего роста и развития растений.

Цель настоящих исследований – изучить воздействие солей ТМ различных концентраций на активность пероксидаз семян сои и роль ДГК в процессе адаптации.

1. Материалы и методы

Материалом для исследований явились семена сои сорта Соната (*Glycine max* (L.) Merrill), полученные из ФГБНУ ВНИИ сои (г. Благовещенск), и дигидрокверцетин торговой марки «Лавитол» (ЗАО «Аметис», г. Благовещенск). Сою проращивали в течение 5 ч при добавлении солей сульфата цинка, сульфата меди, сульфата кадмия и ацетата свинца в следующих концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-6}$ М и ДГК в ранее отобранной концентрации $3 \cdot 10^{-6}$ М. Контрольными образцами являлись семена сои, пророщенные в дистиллированной воде.

Удельную активность пероксидаз определяли колориметрическим методом по Бояркину в модификации Мокроносова [5], содержание белка – методом Лоури [6]. Множественные формы пероксидаз выявляли методом электрофореза в 7.5%-ном полиакриламидном геле в щелочной буферной системе (рН 8.9) [7]. В качестве субстрата использовали бензидин. Локализацию форм пероксидаз устанавливали по относительной электрофоретической подвижности (Rf). Каждая форма пероксидаз сои согласно Rf была ранее обозначена как П1–П18 [8].

2. Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что проращивание семян сои в течение 5 ч с добавлением солей ТМ различных концентраций приводит к изменению удельной активности и множественных форм пероксидаз в зависимости от вида соли ТМ и их концентраций.

Установлено, что добавление солей кадмия и свинца значительно увеличивает удельную активность пероксидаз по сравнению с контрольным вариантом, что коррелирует с появлением высокомолекулярной формы П17.

Показано, что внесение солей биогенных металлов цинка и меди вызывает сходную зависимость: высокие концентрации солей этих металлов увеличивают активность фермента, невысокие незначительно изменяют активность по сравнению с контрольным образцом, что, видимо, свидетельствует о незначительном окислительном стрессе (рис. 1, а).

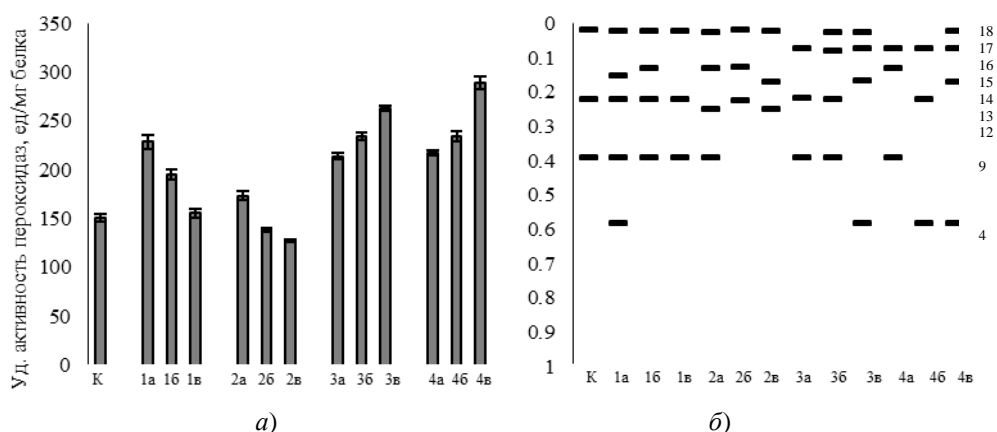


Рис. 1. Удельная активность (а) и схема электрограмм (б) пероксидаз сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением солей ТМ. К – контроль; 1 – ZnSO₄, 2 – CuSO₄, 3а – CdSO₄, 4 – Pb(CH₃COOH)₂. Концентрация солей металлов: а – 5·10⁻⁴ М, б – 5·10⁻⁵ М, в – 5·10⁻⁶ М. Справа указана нумерация выявленных форм фермента

Анализ электрофоретических спектров (рис. 1, б) показал, что форма П18 проявляется во всех исследуемых образцах, за исключением солей кадмия и свинца в высоких концентрациях. Формы П12 и П13 выявлены для всех образцов, пророщенных с добавлением солей биогенных металлов (медь и цинк), а также П13 выявлена во всех образцах со средней концентрацией ТМ. Форма П14 проявляется в условиях невысоких концентрациях металлов.

Форма со средней электрофоретической подвижностью П15 активна при окислительном стрессе, вызванном при добавлении биогенных металлов (медь и цинк) в высоких концентрациях.

Высокоподвижная форма П9 присутствует в контрольном образце и образцах, пророщенных в условиях высоких концентраций исследуемых солей.

Низкомолекулярная форма П4 выявлена в образцах, имеющих наиболее высокую удельную активность исследуемого фермента по сравнению с контрольными образцами, что показывает важную роль указанной формы в процессе адаптации сои к окислительному стрессу, вызванному солями ТМ.

При проращивании сои с добавлением солей ТМ в разных концентрациях внесение ДГК привело к изменению удельной активности и количества множественных форм пероксидаз (рис. 2).

Установлено, что высокомолекулярная форма П18, выявленная в контрольном варианте и в условиях, близких к нему, также сохраняется во всех концентрациях биогенных элементов.

Форма П17 в присутствии ДГК сохранилась только в условиях солей свинца всех концентраций и кадмия высокой концентрации. Форма П15 осталась в опытах 2б и 4а. Форма П14 со средней электрофоретической подвижностью сохранилась в условиях невысоких концентраций исследуемых металлов. Формы П12 и П13 выявлены в аналогичных образцах. Форма П10 появилась при воздействии ДГК (Кд), а также при его совместном влиянии с невысокими концентрациями биогенных металлов и высокими концентрациями токсичных металлов.

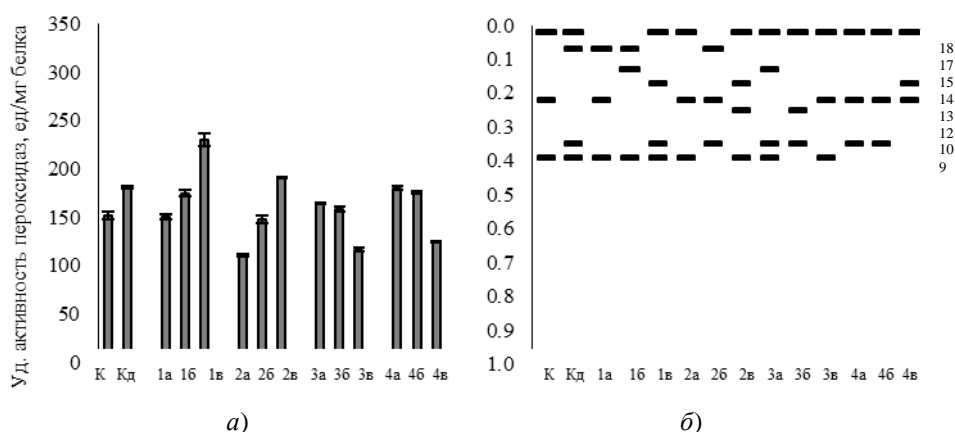


Рис. 2. Удельная активность (а) и схема энзимограмм (б) пероксидаз сои, полученных в условиях проращивания семян с добавлением солей тяжелых ТМ и ДГК. К – контроль, Кд – контроль с ДГК; 1 – $ZnSO_4$ + ДГК, 2 – $CuSO_4$ + ДГК, 3а – $CdSO_4$ + ДГК, 4 – $Pb(CH_3COOH)_2$ + ДГК. Концентрация солей металлов: а – $5 \cdot 10^{-4}$ М, б – $5 \cdot 10^{-5}$ М, в – $5 \cdot 10^{-6}$ М. Справа указана нумерация выявленных форм фермента

Заключение

Показана корреляция между удельной активностью пероксидаз сои и их множественными формами. Установлено, что увеличение удельной активности пероксидаз при стрессовом воздействии солей ТМ связано с появлением новых форм фермента относительно контрольного варианта. При проращивании сои в присутствии токсичных металлов появляются новые формы пероксидаз с высокой электрофоретической подвижностью, что свидетельствует об участии этих форм в молекулярном механизме адаптации к окислительному стрессу.

Выявлено, что защитный механизм при окислительном стрессе, вызванном действием ТМ, определяется особенностью ТМ и его концентрацией. Установлено, что совместное антиоксидантное действие фермента пероксидазы сои и низкомолекулярного антиоксиданта ДГК, добавляемого в среду, играет решающую роль в формировании защитного механизма семян сои в условиях окислительного стресса, что обуславливает устойчивость семян сои к воздействию ТМ.

Выражаем огромную благодарность сотрудникам ФГБНУ ВНИИ сои г. Благовещенска за предоставленный биологический материал, генеральному директору ЗАО «Аметис» В.С. Остронкову и Председателю Совета директоров ЗАО «Аметис» С.А. Лашину за оказание материальной поддержки при выполнении настоящей работы.

Исследования выполнены в рамках финансирования НИР № 343 Госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации.

Литература

1. Кобринец Л.А. Изменение активности ферментов антиоксидантной системы у проростков люпина, вызванной действием соединений свинца // Вестн. Брест. гос. техн. ун-та. – 2012. – № 2. – С. 86–89.

2. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / Под ред. И.П. Ермакова. – М.: Изд-во КДУ, 2007. – 140 с.
3. Стаценко А.П., Тужилова Л.И., Вьюговский А.А. Растительные пероксидазы – маркеры химического загрязнения природных сред // Вестн. ОГУ. – 2008. – № 10. – С. 188–191.
4. Шуляковская Т.А., Ильинова М.К., Кищенко И.Т. Динамика изоферментного состава пероксидазы и содержания пигментов в хвое видов *Picea dietr.*, интродуцированных в Южную Карелию // Экологические проблемы Севера. – 2003. – Вып. 6. – С. 123–127.
5. Малый практикум по физиологии растений / Под ред. А.Т. Мокроносова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994. – 184 с.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, No 1. – P. 265–275.
7. Davis B.J. Disc electrophoresis – II Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404–427.
8. Иваченко Л.Е. Ферменты как маркеры адаптации сои к условиям выращивания. – Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2011. – 192 с.

Поступила в редакцию
16.03.15

Кузнецова Виктория Александровна – аспирант кафедры химии, Благовещенский государственный педагогический университет, г. Благовещенск, Россия.

E-mail: kuzvika3385@yandex.ru

Иваченко Любовь Егоровна – доктор биологических наук, профессор кафедры химии, Благовещенский государственный педагогический университет, г. Благовещенск, Россия.

E-mail: ivachenko-rog@yandex.ru

Михайлова Мария Павловна – аспирант кафедры химии, Благовещенский государственный педагогический университет, г. Благовещенск, Россия.

E-mail: mihaylovamariya@mail.ru

* * *

PARTICIPATION OF TAXIFOLIN IN THE PROTECTION OF SOYA SEEDS FROM THE EFFECTS OF HEAVY METAL SALTS

V.A. Kuznetsova, L.E. Ivachenko, M.P. Mikhailova

Abstract

A correlation was revealed between the specific activity of peroxidases and their multiple forms during the germination of soya seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) in the presence of heavy metal salts. It was shown that lead and cadmium sulfates cause emergence of new forms of the enzyme with high electrophoretic mobility, which indicates that the identified enzyme forms are involved in the molecular mechanism of adaptation to oxidative stress. Addition of taxifolin (dihydroquercetin), a bioflavonoid antioxidant, to the salts of heavy metals caused decrease in the specific activity of peroxidases and favored emergence of new forms of the enzyme, which were absent in the control samples.

Keywords: soya, multiple forms of peroxidases, taxifolin, heavy metals, oxidative stress, adaptation.

References

1. Kobrinets L.A. Changes in the activity of antioxidant enzymes in seedlings of lupine caused by the action of lead compounds. *Vestn. Brest. Gos. Tekh. Univ.*, 2012, no. 2, pp. 86–89. (In Russian)
2. Polesskaya O.G. Plant Cells and Reactive Oxygen Species, Ermakov I.P. (Ed.). Moscow, Izd. KDU, 2007. 140 p. (In Russian)
3. Statsenko A.P., Tuzhilova L.I., V'yugovskii A.A. Vegetable peroxidases – markers of chemical pollution of the natural environments. *Vestn. Orenburg. Gos. Univ.*, 2008, no. 10, pp. 188–191. (In Russian)
4. Shulyakovskaya T.A., Il'inova M.K., Kishchenko I.T. Dynamics of peroxidase isoenzyme composition and pigment content in the needles of *Picea dietr.* species introduced in South Karelia. *Ekol. Probl. Sev.*, 2003, vol. 6, pp. 123–127. (In Russian)
5. Short Practical Course on Plant Physiology, Mokronosova A.T. (Ed.). Moscow, *Izd. Mosk. Gos. Univ.*, 1994. 184 p. (In Russian)
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
7. Davis B.J. Disc electrophoresis – II Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, pp. 404–427.
8. Ivachenko L.E. Enzymes as Markers of Soya Adaptation to Growing Conditions. Blagoveshchensk, Izd. Blagoveshchensk. Gos. Pedagog. Univ., 2011. 192 p. (In Russian)

Received
March 16, 2015

Kuznetsova Viktoriya Aleksandrovna – PhD Student, Department of Chemistry, Blagoveshchensk State Pedagogical University, Blagoveshchensk, Russia.

E-mail: kuzvika3385@yandex.ru

Ivachenko Lubov' Egorovna – Doctor of Biology, Professor, Department of Chemistry, Blagoveshchensk State Pedagogical University, Blagoveshchensk, Russia.

E-mail: ivachenko-rog@yandex.ru

Mikhailova Mariya Pavlovna – PhD student, Department of Chemistry, Blagoveshchensk State Pedagogical University, Blagoveshchensk, Russia.

E-mail: mihaylovamariya@mail.ru