

УДК 577.151.04:630*181.22

ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО ШОКА

Н. Е. Судачкова, Л. И. Романова, Н. В. Астраханцева, М. В. Новоселова

*Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – Обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28*

E-mail: nesudach@mail.ru, biochem@ksc.krasn.ru, astr_nat@mail.ru, biochem@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 05.02.2016 г.

Исследовали образцы хвои из средней части кроны и соскоб прикамбиальной зоны, включающий клетки камбия и нелигнифицированные клетки ксилемы, с пяти стволов 15-летних деревьев из насаждения сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. зеленомошно-разнотравной группы типов леса на дерново-подзолистой почве в Красноярской лесостепи. Изучали термостойчивость антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы, каталазы, глутатионредуктазы (ГР); ферментов углеводного и фенольного обмена: амилазы, инвертазы и фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ), участвующих в обеспечении ксилогенеза; и маркеров окислительного стресса: пероксида водорода и малонового диальдегида (МДА) в интервале температур 20–80 °С. Установлено, что положительный эффект от деятельности антиоксидантных ферментов в основном проявляется до 40 °С. С повышением температуры антиоксидантная защита ослабевает. Механизмы возникновения окислительного стресса в прикамбиальной зоне и в хвое в условиях пирогенного теплового шока различаются в связи с различной термостойкостью антиоксидантных ферментов в этих тканях. Наиболее чувствительна к повышению температуры каталаза как в прикамбиальной зоне, так и в хвое. В прикамбиальной зоне низкую устойчивость обнаруживают пероксидаза и ГР, тогда как СОД отличается более высоким уровнем термостойчивости. В хвое, наоборот, пероксидаза и ГР обнаруживают высокую термостойчивость, а СОД быстро снижает активность при повышении температуры. Амилаза, инвертаза и ФАЛ по термостойчивости превосходят исследованные антиоксидантные ферменты, что позволяет после пирогенного теплового шока быстро восстановить углеводный и фенольный обмен для обеспечения ксилогенеза.

Ключевые слова: *сосна обыкновенная, хвоя, камбий, тепловой шок, окислительный стресс, антиоксидантные ферменты, термостойчивость.*

DOI: 10.15372/SJFS20170101

ВВЕДЕНИЕ

Лесные биоценозы Сибири в естественных условиях периодически подвергаются действию лесных пожаров, влияющих на древесные растения через изменение температурного режима. Хвоя и живые клетки прикамбиальной зоны ствола и корней деревьев в условиях пожара испытывают тепловой шок, индуцирующий стрессовое состояние дерева. Тепловой шок может индуцировать окислительный стресс, обусловленный накоплением активных форм кислорода (АФК), представляющих опасность для клетки (Hasanuzzaman et al., 2013).

В процессе метаболизма растений постоянно образуются активные формы кислорода. В нормальных условиях негативное действие АФК уравнивается системой антиоксидантной защиты. Под действием стресса АФК накапливаются и развивается окислительный стресс, активирующий перекисное окисление липидов, что вызывает существенные изменения в структуре и функциях клеточных мембран (Мерзляк, 1989; Blokhina et al., 2003). Стресс, вызванный воздействием пожаров на древесные растения, сопровождается проявлениями окислительного стресса (Судачкова и др., 2015). Обычно в стрессовых условиях активизируется система

антиоксидантной защиты, важным компонентом которой является усиление активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы, каталазы, глутатионредуктазы (ГР). Ферменты углеводного обмена амилаза и инвертазы не участвуют непосредственно в нейтрализации АФК, но способствуют выходу растения из стрессового состояния путем увеличения уровня глюкозы, необходимой для обеспечения метаболизма любого растения (Kashefi et al., 2012) и дополнительно для ксилогенеза у древесных растений. Ферменты, участвующие в синтезе защитных веществ, такие как ФАЛ – ключевой фермент фенилпропаноидного метаболизма, ответственный за синтез вторичных метаболитов, усиливающих устойчивость растений к стрессам, также следует отнести к антистрессовым ферментам. Поскольку температура в кроне и камбиальной зоне во время низового пожара превышает максимальные значения температуры естественной среды обитания древесных растений Сибири, стрессовое состояние растений во время пожара сопряжено с высокотемпературным воздействием, изменяющим структуру белковых молекул и вызывающим тепловую денатурацию ферментов. Возникает вопрос, насколько дееспособна антиоксидантная защита в условиях гипертермии при огневом воздействии. Уровень термостабильности ферментов, как показали исследования (McEldoon, Dordick, 1996; Thongsook, Barrett, 2005; Plieth, Vollbehr, 2012), может сильно варьировать и зависит от многих факторов. Темпы снижения активности могут существенно различаться в зависимости от видовой принадлежности и уровня устойчивости (Almeselmani et al., 2009). Термоустойчивости ферментов растений уделяется большое внимание, но, как правило, обсуждается устойчивость к температурам не выше 40–45 °С. Устойчивость к экстремально высоким температурам, особенно у древесных растений, изучена недостаточно.

Цель работы – оценка возможностей эффективной антиоксидантной защиты и регенерации метаболических функций сосны обыкновенной в условиях теплового шока, аналогичного пирогенному воздействию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили образцы хвои из средней части кроны и соскоб прикамбиальной зоны, включающий клетки камбия и нелигнифицированные клетки ксилемы, взя-

тые 8 июня 2015 г. со стволов пяти 15-летних деревьев из естественного насаждения сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. зеленомошно-разнотравной группы типов леса в Емельяновском районе Красноярского края. Собранный материал гомогенизировали, развешивали по 2 г и до проведения химического анализа хранили в морозильной камере при температуре – 24 °С. Образцы тканей оттаивали в течение 10 мин при комнатной температуре (19–21 °С), после чего выдерживали в термостате 20 мин при температуре 20, 40, 60 или 80 °С. Начальное значение температуры 20 °С соответствует средней температуре камбиальной зоны ствола сосны в период вегетации (Судачкова и др., 2015). В навесках тканей определяли содержание пероксида водорода с йодидом калия (Velikova et al., 2000), малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (Dipietro, Leonardis, 1997). Активность ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту, предварительно очищенных на колонке с Sephadex-G-50, определяли спектрофотометрическими методами: супероксиддисмутазы (СОД) – по ингибированию фотохимического обесцвечивания нитросинего тетразолия в соответствии с методикой Kumar и Knowles (Kumar, Knowles, 1993), пероксидазы – по реакции окисления гваякола перекисью водорода (Putter, 1974) по несколько модифицированной методике (состав реакционной смеси: 1.5 мл фосфатно-цитратного буфера pH 4.7, 0.5 мл вытяжки, 0.5 мл 0.4 М гваякола, 0.5 мл 0.05 М H₂O₂), каталазы – по изменению концентрации H₂O₂, фиксируемой по оптической плотности при 240 нм (Aebi, 1974), глутатионредуктазы (ГР) – по методу Polle с соавторами (Polle et al., 1990). Определена также активность амилазы и кислой инвертазы с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты для определения глюкозы с модификацией относительно pH (4.7) (Bergmeyer, 1974) и фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ) (Запрометов, Шипилова, 1972), участвующих в обеспечении процесса ксилогенеза. Для анализа брали по три навески из среднего образца и каждую исследовали в трех химических повторностях. Результаты рассчитывали на единицу абсолютно сухого вещества.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования (Судачкова и др., 2015), температура камбиальной зоны при средней силе низового пожара колеблется от 37 до 95 °С, при слабой – от 30 до 53 °С, что

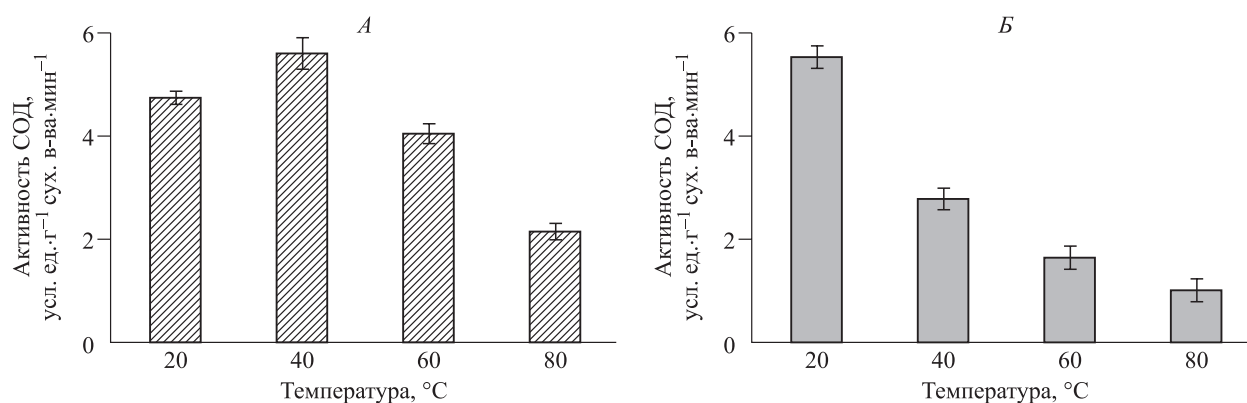


Рис. 1. Влияние температуры на активность СОД из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

превышает максимальную температуру камбиальной зоны сосны в данном районе и может быть причиной образования избыточного количества свободных радикалов. На переднем плане антиоксидантной защиты выступает СОД, поскольку основная функция этого фермента – перевод агрессивной формы супероксидного анион-радикала (O_2^-), образующегося в различных физиологических процессах, в более стабильное соединение H_2O_2 (Potikha et al., 1999). Сравнение реакции СОД на повышение температуры различных видов растений обнаруживает видоспецифичность термоустойчивости фермента. По данным болгарских исследователей (Bakardjieva et al., 2000), температурный оптимум СОД из хвои сосны обыкновенной составляет 30 °C, тисса ягодного – 50 °C, из листьев кукурузы – 50 °C, люцерны – 60 °C, при 70 °C в хвое сосны резко снижается активность, при 90 °C СОД полностью инактивируется у всех изученных видов. СОД из экстракта листьев пшеницы имеет температурный оптимум между 25 и 35 °C в зависимости от продолжительности температурного воздействия (1–5 ч), действие температуры 55 °C в течение 1 ч снижает активность фермента на 80 % (Vanowetz et al., 2007). Активность СОД в экстрактах из корней проростков пшеницы после 10-минутного прогрева при температуре 45 °C составляла 45–47 % (Карпец и др., 2009), оптимум активности СОД в листьях салата отмечен при 30 °C, при 35 °C наблюдалось существенное снижение (Han et al., 2013). В то же время сравнение активности СОД в листьях двух видов посконника показало, что при температуре 42 °C в течение 24 ч активность фермента выше, чем при 35 и 38 °C (Lu et al., 2008). Повышение активности СОД при 40 °C показано также для шелковицы (Chaitanya et al., 2002). В хвое сосны Веймутова активность фер-

мента достигает максимальных значений зимой и опускается до минимума летом, что также может свидетельствовать о низкой термостабильности фермента.

В нашем опыте в прикамбиальной зоне сосны обыкновенной максимум активности СОД наблюдался при 40 °C (рис. 1). На рис. 1 и далее на рис. 2–9 представлены средние значения и ошибки средних. При 60 °C сохранялось 85 % активности, при 80 °C – 45 %. В хвое сосны термостабильность фермента ниже: при 80 °C сохраняется лишь 18 % активности, а при 40 °C пик активности отсутствует.

Пероксидаза – многофункциональный фермент, присутствующий во всех наземных растениях (Passardi et al., 2005), но в стрессовых условиях его основная функция антиоксидантная – снижение уровня пероксида водорода в тканях. Термочувствительность этого фермента видоспецифична, что показано для тканей различных таксономических групп растений (Civello et al., 1995; Lu et al., 2008; Живетьев и др., 2010; Suha et al., 2013; Романова и др., 2013). В условиях нашего опыта при 40 °C активность пероксидазы в прикамбиальной зоне сосны составляет 86 % от исходной, при 60 °C быстро снижается до 18 % и при 80 °C сохраняется лишь 11 % активности (рис. 2).

В хвое активность фермента медленно увеличивается до 108 % от исходной при 60 °C и резко снижается до 62 % при 80 °C. Различия термоустойчивости тканей камбиальной зоны и хвои могут зависеть от множества факторов. Известно, что термостабильность пероксидазы сильно зависит от pH ткани, присутствия кальция, состава изоферментов (Anthon, Barrett, 2002; Plieth, Vollbehr, 2012; Кузнецова, 2012; Suha et al., 2013). Сведения о термоустойчивости пероксидазы тканей хвойных к высоким темпе-

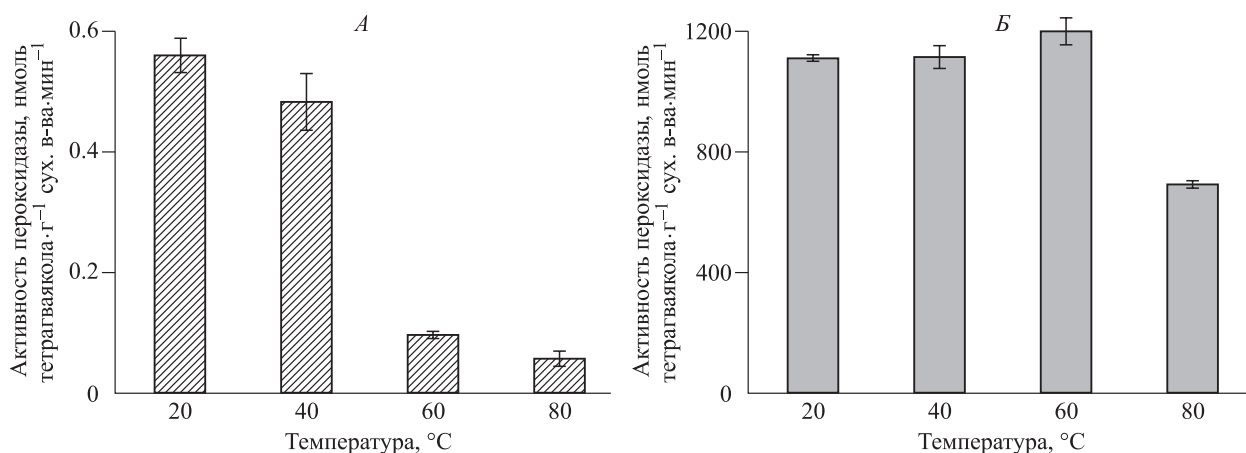


Рис. 2. Влияние температуры на активность пероксидазы из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

ратурам ограничены. Исследование термостабильности пероксидазы из хвои ели обыкновенной показало, что температурный оптимум фермента соответствует 50 °C, при 70 °C сохраняется около 45 % активности, а при 80 °C активность отсутствует (Polle et al., 1990). Пероксидаза из хвои засухоустойчивой сербской ели при температуре 60 °C за 20 мин снижает активность на 40 %, при 85 °C активность фермента уменьшается в 8 раз за 5 мин и поддерживает этот уровень до конца опыта (20 мин) (Laketa et al., 2009). Есть сведения о снижении активности фермента в хвое сосны обыкновенной зимой и повышении – весной (Романова и др., 2013). Не исключено, что ткани прикамбиальной зоны и хвои отличаются набором изоферментов, поскольку температура прикамбиальной зоны никогда не поднимается выше температуры хвои, непосредственно подверженной действию солнечной инсоляции, вследствие чего в камбиальной зоне могут отсутствовать термостойчивые изоформы фермента. Есть сведения об изменении изоферментного состава пероксидаз и сохранении 25 % исходной активности при 200 °C в семенах сои (Кузнецова, 2012).

Каталаза наряду с пероксидазой входит в систему антиоксидантной защиты, корректируя концентрацию пероксида водорода (Mhamdi et al., 2010). Фермент не отличается высокой термостойчивостью. Критическое значение для активности каталазы в листьях кукурузы соответствует 55 °C (Eyster, 1950), в листьях мальвы – 60 °C при оптимуме 30 °C (Arabaci, Usluoglu, 2013), в листьях шпината – 50–60 °C в зависимости от степени очистки фермента (Sapers, Nickerson, 1962). Оптимум для каталазы листьев фасоли отмечен при дневной температу-

ре 40 °C, при 45 °C активность снижается почти вдвое (Kumar et al., 2011), для культуры ткани женьшеня температурный оптимум составляет 20–25 °C, при 40 °C активность также снижается вдвое. Отмечено снижение активности каталазы в хвое сосны приморской под влиянием засухи (Schwanz et al., 1996). В нашем опыте каталаза в прикамбиальной зоне и хвое сосны обыкновенной обнаруживает максимальную активность при 20 °C, снижает активность при 40 °C до 30–50 % от исходной и сохраняет лишь 10–12 % активности при 60 °C и 3–4 % – при 80 °C (рис. 3).

Повышение активности ГР также считается индикатором окислительного стресса (Gill et al., 2013). Этот фермент контролирует уровень антиоксидантов в клетках, превращая окисленную форму глутатиона в восстановленную, способную обезвреживать активные формы кислорода, вызывающие окислительный стресс.

Анализ имеющихся сведений показал низкий уровень термостабильности фермента в тканях травянистых растений. ГР в листьях фасоли проявляет максимум активности при температуре 40/30 °C (день/ночь) и резко ее снижает при температуре 45/35 °C (Kumar et al., 2011), в листьях кукурузы фермент обнаруживает высокую активность при 5 °C, а при повышении температуры она существенно снижается (Kocsy et al., 2002), снижение активности глутатионредуктазы при повышении температуры от 0 до 30 °C зафиксировано для мятлика и овсяницы (Jiang, Huang, 2001). Исследование активности фермента в годичной динамике в тканях хвойных однозначно показало, что ее максимум наблюдается зимой, а в летние месяцы снижается до минимума (Esterbauer, Grill, 1978; Anderson et al., 1992; Taulavuori et al., 1999).

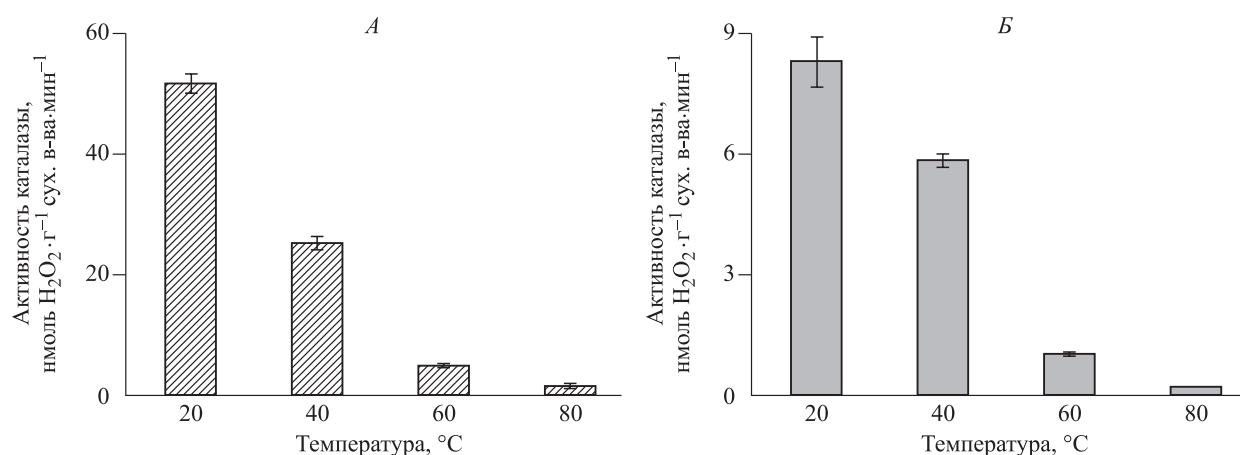


Рис. 3. Влияние температуры на активность каталазы из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

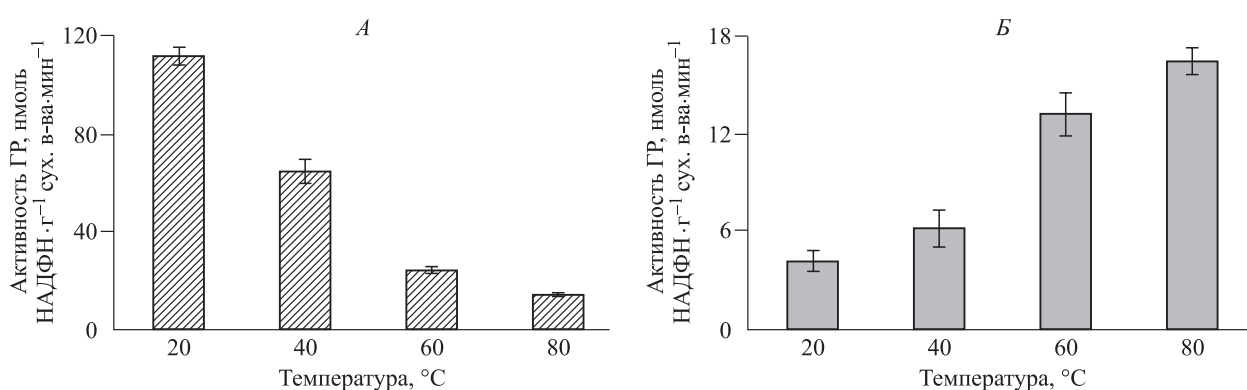


Рис. 4. Влияние температуры на активность ГР из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

В нашем опыте в прикамбиальной зоне сосны активность фермента при 80 °C составляет лишь 13 % от исходной (при 20 °C). В хвое при общей низкой активности термоустойчивость фермента кардинально отличается от зафиксированной в камбиальной зоне: активность при повышении температуры растет, достигая максимума при 80 °C (рис. 4).

Столь существенные различия термоустойчивости тканей хвои и прикамбиальной зоны могут быть следствием различий изоферментного состава этих объектов, поскольку известно, что в листьях преобладают изоформы ГР, локализованные в хлоропластах и отличающиеся по своим характеристикам от митохондриальных (Edwards et al., 1990). Отсутствие хлоропластов в прикамбиальной зоне свидетельствует о правомерности этого предположения.

Амилаза и инвертаза – ключевые ферменты, обеспечивающие растения материалом для построения клеточных структур различных тканей. Температурный оптимум активности амилазы для сельскохозяйственных культур колеблется в

диапазоне 30–50 °C в зависимости от вида и состава изоферментов (пшеница, просо, рис, кукуруза), инактивация фермента в листьях пшеницы происходит при 70 °C (Mohamed et al., 2009). Максимальная активность амилазы в хвое и лубе сосны обыкновенной и лиственницы сибирской обнаруживается в летний период (Sudachkova et al., 2004). Сравнение термоустойчивости амилазы из прикамбиальной зоны и хвои показало синхронность изменения активности фермента при повышении температуры (рис. 5).

Пока нет удовлетворительного объяснения снижению активности при 40 °C и последующему повышению при 60 °C. В целом фермент показал высокую термостабильность, сохраняя при 80 °C 74 % активности в прикамбиальной зоне и 54 % – в хвое. Известна α -амилаза повышенной термостойкости, выделенная из семян корейского кедра, которая имеет оптимум активности при 65 °C (Azad et al., 2009).

Инвертаза также обнаруживает более высокую термостабильность по сравнению с антиоксидантными ферментами. Оптимум актив-

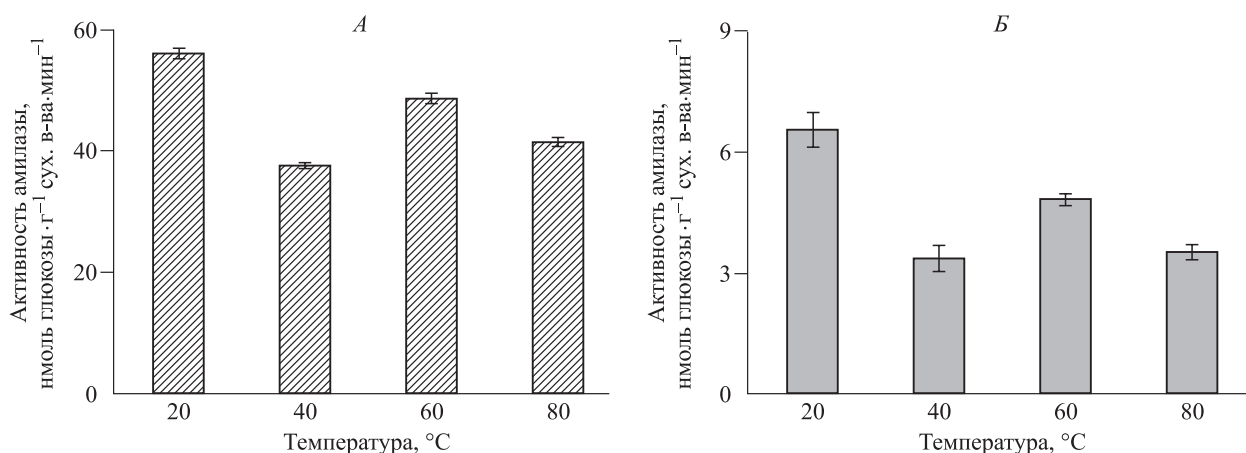


Рис. 5. Влияние температуры на активность амилазы из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

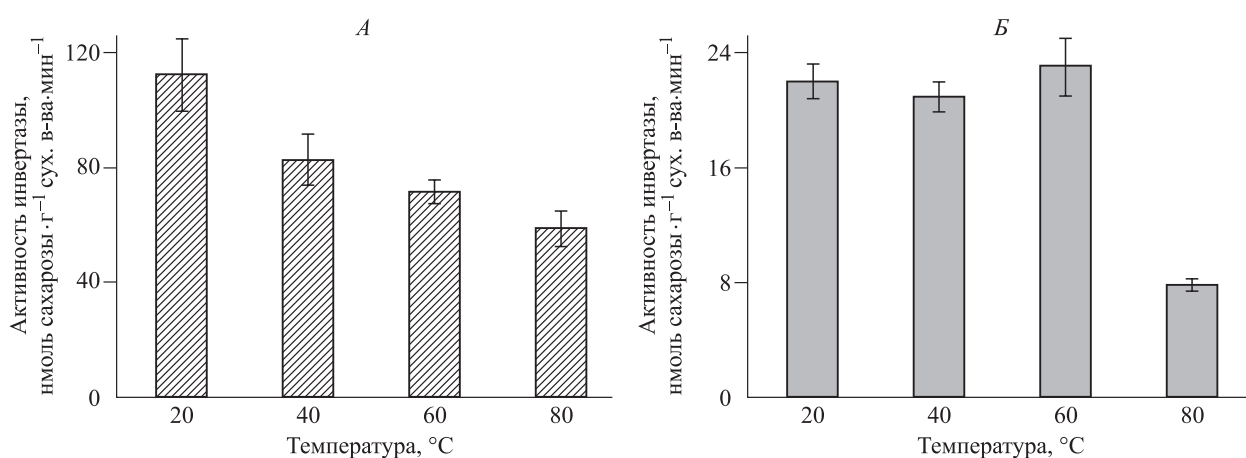


Рис. 6. Влияние температуры на активность инвертазы из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

ности инвертазы сахарного тростника соответствует 40–55 °C (Bhatia et al., 2012), томатов – 50 °C (Yucekan, Onal, 2012), винограда – 80 °C (Porntaveewat et al., 1994), цветов тропического дерева мадука – 40 °C, при 80 °C фермент инактивируется (Weerasooriya, Yatawara, 2003). По нашим данным, если в прикамбиальной зоне активность фермента плавно снижается при повышении температуры, сохраняя 52 % исходной активности при 80 °C, то в хвое активность остается постоянной до 60 °C, резко снижаясь до 36 % от исходной при 80 °C (рис. 6).

Ферменты, участвующие в синтезе защитных веществ, также следует отнести к стрессовым (Dixon, Paiva, 1995). ФАЛ – ключевой фермент фенилпропаноидного метаболизма, ответственный за синтез вторичных метаболитов, усиливающих устойчивость растений к стрессам. Фермент довольно термоустойчив: в клубнях топинамбура оптимум активности ФАЛ наблюдался при 50 °C, период полуинактивации,

равный 10 мин, достигается после инкубации фермента при 65 °C (Амбарцумян и др., 2000), в очищенном препарате фермента из прикамбиальной зоны ксилемы сосны обыкновенной оптимум активности отмечен при 50 °C, при 60 °C в течение 20 мин сохраняется 99 % активности (Судачкова, 1977). В нашем опыте в прикамбиальной зоне при 60 °C в течение 20 мин сохраняется 68 % активности, при 80 °C за то же время – 55 % исходной активности (рис. 7).

В хвое фермент при низкой активности обнаруживает высокую термостойкость: пик активности наблюдается при 40–60 °C, при 80 °C активность остается близкой к исходной (нагревание при 20 °C).

Показателями интенсивности окислительного стресса служит накопление в тканях пероксида водорода (Cheeseman, 2007) и МДА – продукта окисления полиненасыщенных жирных кислот, характеризующее степень окислительного повреждения липидов (Blokhina et al., 2003).

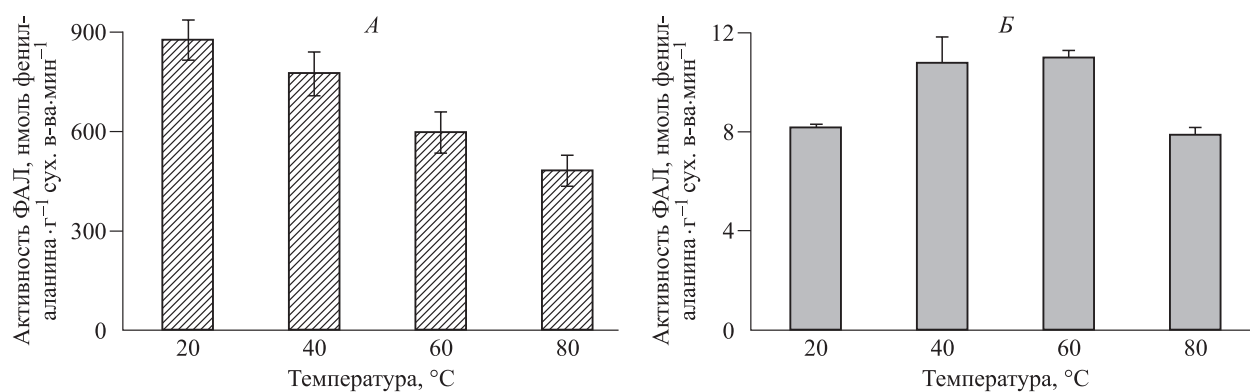


Рис. 7. Влияние температуры на активность ФАЛ из прикамбиальной зоны (А) и хвои (Б) сосны обыкновенной.

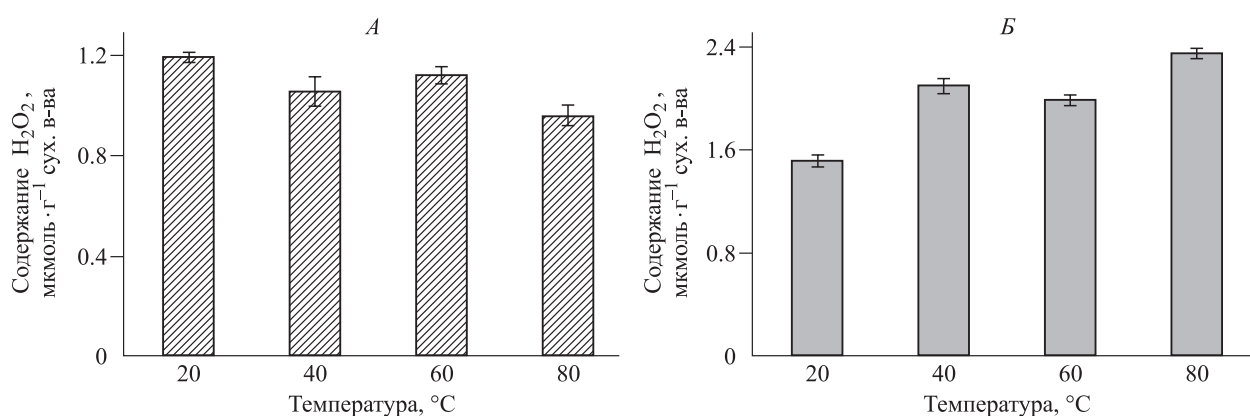


Рис. 8. Влияние температуры на содержание пероксида водорода в прикамбиальной зоне (А) и хвое (Б) сосны обыкновенной.

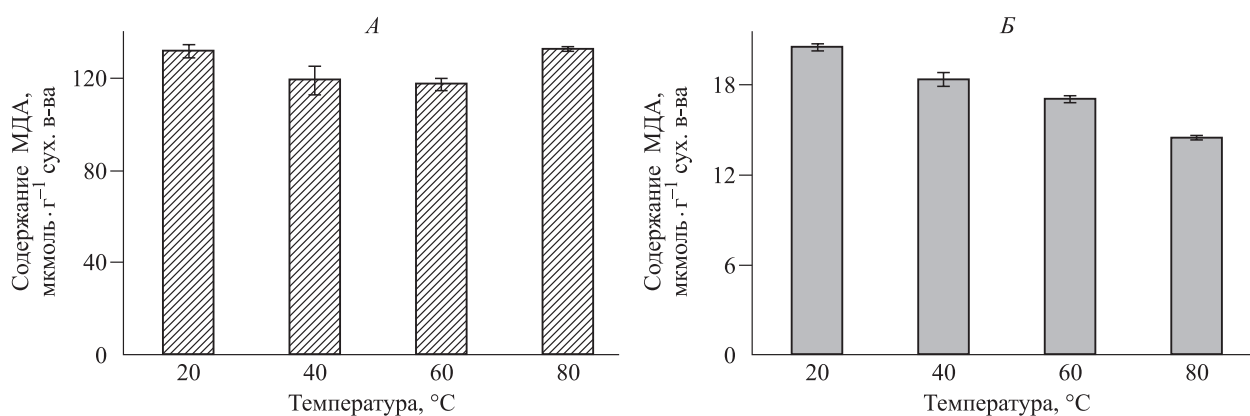


Рис. 9. Влияние температуры на содержание МДА в прикамбиальной зоне (А) и хвое (Б) сосны обыкновенной.

Поскольку отмечено существенное повышение содержания пероксида водорода и МДА в ответ на повышение температуры до 35–42 °C в тканях различных видов растений (Jiang, Huang, 2001; Cheeseman, 2007; Savicka, Škute, 2010; Hossain et al., 2013), проверили реакцию этих соединений на экстремальные для растений значения температуры. В результате обнаружили, что в прикамбиальной зоне содержание пероксида водорода

медленно снижается при повышении температуры и составляет 81 % от исходной концентрации при 80 °C, в хвое наблюдается противоположный температурный градиент: при 80 °C содержание перекиси повышается в 1.5 раза (рис. 8).

На примере МДА показано, что ткани разных органов растения неоднозначно реагируют на тепловой шок (Savicka, Škute, 2010). Например, в листьях тропического дерева *Conocarpus*

lancifolius повышение температуры до 40–50 °С существенно снижало содержание МДА по сравнению с его содержанием при 10 °С (Suleman et al., 2013), в листьях салата, напротив, содержание МДА увеличивалось при повышении температуры с 25 до 42 °С (Han et al., 2013). В прикамбиальной зоне сосны процесс перекисного окисления липидов, оцениваемый по содержанию МДА, очевидно, мало зависит от температуры в пределах исследуемого диапазона (рис. 9).

В хвое содержание МДА при повышении температуры плавно снижается и при 80 °С составляет 71 % от исходного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с тем что максимальные значения температуры естественной среды обитания растений Сибири, как правило, не превышают 40–45 °С, в большинстве работ влияние этого интервала температуры интерпретируется как тепловой шок и последствия дальнейшего повышения температуры не исследуются. Между тем для древесных растений актуально знание последствий влияния более высоких температур, действующих на растения во время пожаров. Поскольку тепловой шок сопровождается окислительным стрессом, важно знать состояние защитных систем растения, противостоящих стрессу, вызванному пироженным воздействием.

Установлено, что положительный эффект от деятельности антиоксидантных ферментов в тканях сосны в основном проявляется до 40 °С. С повышением температуры антиоксидантная защита ослабевает. В целом механизмы возникновения окислительного стресса в прикамбиальной зоне и в хвое различаются в связи с различной термостойкостью антиоксидантных ферментов в этих тканях. Наиболее чувствительна к повышению температуры каталаза как в прикамбиальной зоне, так и в хвое. В прикамбиальной зоне низкую устойчивость обнаруживают пероксидаза и ГР, тогда как СОД отличается более высоким уровнем термоустойчивости, способствующим накоплению пероксида водорода в условиях пироженного теплового шока и усилению окислительного стресса. В отличие от прикамбиальной зоны в хвое пероксидаза и ГР обнаруживают высокую термоустойчивость и способны нейтрализовать негативное действие пероксида водорода и частично активных форм кислорода. Но поскольку СОД в хвое быстро теряет активность при повышении температуры и

не способна переводить супероксидный анион-радикал (O_2^-) в пероксид водорода, окислительный стресс может быть обусловлен накоплением этого свободного радикала.

Пероксид водорода устойчив к действию повышенных температур как в прикамбиальной зоне, так и в хвое, содержание МДА в прикамбиальной зоне также остается стабильным, но снижается в хвое. Очевидно, что концентрация пероксида водорода в тканях в условиях пироженного теплового шока является более надежным маркером окислительного стресса. Амилаза, инвертаза и ФАЛ по термоустойчивости превосходят исследованные антиоксидантные ферменты, что позволяет после пироженного теплового шока быстро восстановить углеводный и фенольный обмен для обеспечения процесса ксилогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амбарцумян А. А., Тозалакян И. Л., Базукян И. Л., Попов Ю. Г. Фенилаланин-аммиак-лиаза *Helianthus tuberosus* L.: выделение и первичная характеристика // Биотехнология. 2000. № 2. С. 24–28.
- Живетьев М. А., Раченко Е. И., Путилина Т. Е., Краснобаев В. А., Граскова И. А., Войников В. К. Активность и изоферментный спектр пероксидаз некоторых видов растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе // Изв. Иркутск. гос. ун-та. Сер. Биол. Экол. 2010. № 3. С. 3–12.
- Запрометов М. Н., Шупилова С. В. Фенилаланин-аммоний-лиаза и образование фенольных соединений в проростках кукурузы // Физиол. раст. 1972. Т. 19. № 3. С. 489–503.
- Карпец Ю. В., Ястреб Т. О., Обозный А. И., Колупаев Ю. Е. Активность и термостабильность антиоксидантных ферментов корней проростков пшеницы после воздействия экзогенного пероксида водорода // Вісник харківськ. нац. аграрн. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 2. № 17. С. 62–70.
- Кузнецова В. А. Термостабильность пероксидаз семян сои // Масличные культуры. Науч.-техн. бюл. Всерос. НИИ масличных культур. 2012. № 2. С. 151–152.
- Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиол. раст. 1989. Т. 6. 167 с.
- Романова И. М., Живетьев М. А., Пензина Т. А., Граскова И. А. Динамика активности пероксидазы хвои сосны обыкновенной в Пред-

- байкалье // Изв. Иркутск. гос. ун-та. Сер. Биол. Экол. 2013. № 3. С. 9–12.
- Судачкова Н. Е. Метаболизм хвойных и формирование древесины. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1977. 228 с.
- Судачкова Н. Е., Милютин И. Л., Романова Л. И., Косов И. В., Собачкин Д. С. Воздействие низовых пожаров на жизнеспособность и антиоксидантную защиту молодняков сосны обыкновенной в Красноярской лесостепи // Лесоведение. 2015. № 2. С. 16–25.
- Aebi H. Catalase // Methods of enzymatic analysis. V. 2. Weinheim, New York, San Francisco, London: Verlag Chemie, 1974. P. 673–684.
- Almeselmani M., Deshmukh P. S., Sairam R. K. High temperature stress tolerance in wheat genotypes: role of antioxidant defense enzymes // Acta Agron. Hung. 2009. V. 57. N. 1. P. 1–14.
- Anderson J. V., Chevone B. I., Hess J. L. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles: evidence for thermal dependence // Plant Physiol. 1992. V. 98. N. 2. P. 501–508.
- Anthony G. E., Barrett D. M. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. N. 14. P. 4119–4125.
- Arabaci G., Usluoglu A. Catalytic properties and immobilization studies of catalase from *Malva sylvestris* L. // J. Chem. 2013. Article ID 686185. 6 p.
- Azad M. A., Bae J. H., Kim J. S., Lim J. K., Song K. S., Shin B. S., Kim H. R. Isolation and characterization of a novel thermostable alpha-amylase from Korean pine seeds // J. Biotechnol. 2009. V. 26. N. 3–4. P. 143–149.
- Bakardjieva N. T., Christov K. N., Christova N. V. Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase // Biol. Plantarum. 2000. V. 43. N. 1. P. 73–78.
- Banowetz G. M., Azevedo M. D., El-Nashaar H. M., Martin R. C., Stout R. G. Temperature-induced increase in cellular chelating potential associated with reduced thermotolerance // J. Therm. Biol. 2007. V. 32. N. 1. P. 12–19.
- Bergmeyer H. U. Enzymes as biochemical reagents // Methods of enzymatic analysis. V. 1. Weinheim, New York, San Francisco, London: Verlag Chemie, 1974. P. 425–522.
- Bhatia Jyoti S., Uppal S. K., Batta S. K. Partial purification and characterization of acid invertase from the fresh and stale sugarcane juice // Sugar Tech. 2012. V. 14. N. 2. P. 148–155.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivative stress: a review // Ann. Bot. 2003. V. 91. N. 2. P. 179–194.
- Chaitanya K. V., Sundar D., Masilamani S., Ramachandra Reddy A. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars // Plant Growth Regul. 2002. V. 36. N. 2. P. 175–180.
- Cheeseman J. M. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship // Plant Stress. 2007. V. 1. N. 1. P. 4–15.
- Civello P. M., Martinez G. A., Chaves A. R., Anon M. C. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): partial purification and determination of some properties // J. Agr. Food Chem. 1995. V. 43. N. 10. P. 2596–2601.
- Dipierro S., Leonardis S. D. The ascorbate system and lipid peroxidation in stored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers // J. Exp. Bot. 1997. V. 48. N. 3. P. 779–783.
- Dixon R. A., Paiva N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1085–1097.
- Edwards E. A., Rawsthorne S., Mullineaux P. M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) // Planta. 1990. V. 180. N. 2. P. 278–284.
- Esterbauer H., Grill D. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies* L. // Plant Physiol. 1978. V. 61. N. 1. P. 119–121.
- Eyster H. C. Effect of temperature on catalase activity // Ohio J. Sci. 1950. V. 50. N. 6. P. 273–277.
- Gill S. S., Anjum N. A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D. K., Ahmad I., Pereira E., Tuteja N. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 70. N. 9. P. 204–212.
- Han Y., Fan S., Zhang Q., Wang Y. Effect of heat stress on the MDA, proline and soluble sugar content in leaf lettuce seedlings // Agr. Sci. 2013. V. 4. N. 5B. P. 112–115.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M. M., Roychowdhury R., Fujita M. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. N. 5. P. 9643–9684.
- Hossain M. A., Mostofa M. G., Fujita M. Heat-shock positively modulates oxidative protection of salt and drought-stressed mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings // J. Plant Sci. Mol. Breed. 2013. V. 2. N. 1. P. 1–14.
- Jiang Y., Huang B. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. N. 355. P. 341–349.

- Kashefi B., Matinizadeh M., Tabaei-Aghdaei S. R. Superoxide dismutase and α -amylase changes of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) tissues seasonally // Afr. J. Agr. Res. 2012. V. 7. N. 42. P. 5671–5679.
- Kocsy G., Szalai G., Galiba G. Induction of glutathione synthesis and glutathione reductase activity by abiotic stresses in maize and wheat // Sci. World J. 2002. V. 2. P. 1726–1732.
- Kumar G. N. M., Knowles N. R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers // Plant Physiol. 1993. V. 102. N. 1. P. 115–174.
- Kumar S., Kaur R., Kaur N., Bhandhari K., Kausshal N., Gupta K., Bains T. S., Nayyar H. Heat-stress induced inhibition in growth and chlorosis in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is partly mitigated by ascorbic acid application and is related to reduction in oxidative stress // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. N. 6. P. 2091–2101.
- Laketa D., Bogdanović J., Kalauzi A., Radotić K. Kinetic parameters for thermal inactivation of soluble peroxidase from needles of Serbian spruce (*Picea omorika* (Pančić) Purkyně) // Gen. Physiol. Biophys. 2009. V. 28. N. 1. P. 78–85.
- Lu P., Sang W. G., Ma K. P. Differential responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive Eupatorium species in China // J. Integr. Plant Biol. 2008. V. 50. N. 4. P. 393–401.
- McEldoon J. P., Dordick J. S. Unusual thermal stability of soybean peroxidase // Biotechnol. Prog. 1996. V. 12. N. 5. P. 555–558.
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. N. 15. P. 4197–4220.
- Mohamed S. A., Al-Malki A. L., Kumosani T. A. Partial purification and characterization of five α -amylases from a wheat local variety (Balady) during germination // Austral. J. Basic Appl. Sci. 2009. V. 3. N. 3. P. 1740–1748.
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // Plant Cell Rep. 2005. V. 24. N. 5. P. 255–265.
- Plieth C., Vollbehr S. Calcium promotes activity and confers heat stability on plant peroxidases // Plant Signal Behav. 2012. V. 7. N. 6. P. 650–660.
- Polle A., Chakrabarti K., Schürmann W., Renneberg H. Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) // Plant Physiol. 1990. V. 94. N. 1. P. 312–319.
- Porntaveewat W., Takayanagi T., Yokotsuka K. Purification and properties of invertase from Muscat Bailey A grapes // J. of Fermentation and Bioengineering. 1994. V. 78. N. 4. P. 288–292.
- Potikha T. S., Collins C. C., Johnson D. I., Delder D. P., Levine A. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers // Plant Physiol. 1999. V. 119. N. 3. P. 849–858.
- Putter J. Peroxidases // Methods of Enzymatic Analysis. V. 2. Weinheim; New York; San Francisco; London: Verlag Chemie, 1974. P. 685–690.
- Sapers G. M., Nickerson J. T. R. Stability of spinach catalase. II. Inactivation by heat // J. Food Sci. 1962. V. 27. N. 3. P. 282–286.
- Savicka M., Škute N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) // Ekologija. 2010. V. 56. N. 1–2. P. 26–33.
- Schwanz P., Picon C., Vivin P., Dreyer E., Cuehl J. M., Polle A. Responses of antioxidative systems to drought stress in pendunculate oak and maritime pine as modulated by elevated CO₂ // Plant Physiol. 1996. V. 110. N. 2. P. 393–402.
- Sudachkova N. E., Milyutina I. L., Romanova L. I., Semenova G. P. The dynamics of reserve compounds and hydrolytic enzymes activity in the tissues of *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb. // Euras. J. For. Res. 2004. V. 7. N. 1. P. 1–10.
- Suha O. A., Babiker E. M., Babiker E. E. Thermostability at different pH levels of peroxidase extracted from four vegetables // Int. Food Res. J. 2013. V. 20. N. 2. P. 715–719.
- Suleman P., Redha A., Afzal M., Al-Hasan R. Temperature-induced changes of malondialdehyde, heat-shock proteins in relation to chlorophyll fluorescence and photosynthesis in *Conocarpus lancifolius* (Engl.) // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. N. 4. P. 1223–1231.
- Thongsook T., Barrett D. M. Heat inactivation and reactivation of broccoli peroxidase // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. N. 8. P. 3215–3222.
- Taulavuori E., Taulavuori K., Laine K. Seasonality of glutathione dynamics in Scots pine and bilberry // Plant Biol. 1999. V. 1. N. 2. P. 187–191.
- Velikova V., Jordanov I., Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant system in acid-rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines // Plant Sci. 2000. V. 151. N. 1. P. 59–66.

Weerasooriya M. K. B., Yatawara H. P. Partial purification and characterization of invertase from flowers of *Madhuca longifolia* (Mi) // Philipp. J. Sci. 2003. V. 132. N. 2. P. 129–136.

Yucekan I., Onal S. Physicochemical properties of invertase partitioned in an aqueous two-phase system of polyethylene glycol / sodium sulfate // Hacettepe J. Biol. Chem. 2012. V. 40. N. 2. P. 139–147.

THERMOSTABILITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN TISSUES OF SCOTS PINE IN HEAT SHOCK CONDITIONS

N. E. Sudachkova, L. I. Romanova, N. V. Astrakhantseva, M. V. Novoselova

Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch Solitary Unit V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

E-mail: nesudach@mail.ru, biochem@ksc.krasn.ru, astr_nat@mail.ru, biochem@ksc.krasn.ru

Samples of needles from the middle part of the crown and cambial zone scrapings, which includes cambium cells and nonlignified xylem cells from five stems of 15 years old Scots pine *Pinus sylvestris* L. trees from green moss-forb groups stands on sod-podzolic soil in Krasnoyarsk forest steppe were investigated. Thermal stability of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalase, glutathione reductase (GR); enzymes of carbohydrate and phenolic metabolism: amylase, invertase and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) which are involved in providing the xylogenesis process; and markers of oxidative stress: peroxide hydrogen and malondialdehyde (MDA) were studied in the temperature interval 20–80 °C. It was found that the positive effect on the antioxidant enzymes activity mainly manifested up to 40 °C. As the temperature increases, antioxidant protection weakens. The mechanisms of oxidative stress in cambium zone and needles in condition of pyrogenic heat shock are distinguished due to different thermal stability of antioxidant enzymes in these tissues. The most sensitive to elevated temperatures was catalase both in cambium zone and needles. In the cambium zone, peroxidase and GR detect low resistance to high temperature, while SOD has a higher level of. In the needles on the contrary, peroxidase and GR exhibit high thermal stability, whereas SOD activity rapidly reduces at higher temperatures. Amylase, invertase and PAL exceed, according to the thermal stability of examined antioxidant enzymes, what allow quick restoration of carbohydrate and phenolic metabolism after pyrogenic heat shock to providing of xylogenesis process.

Keywords: *Scots pine, needles, cambium, heat shock, oxidative stress, antioxidative enzymes, thermal stability.*

How to cite: *Sudachkova N. E., Romanova L. I., Astrakhantseva N. V., Novoselova M. V. Thermostability of antioxidant enzymes in tissues of Scots pine in heat shock conditions // Sibirskij Lesnoj Zhurnal (Siberian Journal of Forest Science). 2017. N. 1: 4–14 (in Russian with English abstract).*