

Антиоксидантные Ферменты, Участвующие В Детоксикации H_2O_2 В Листьях И Корнях Пшеницы В Условиях Продолжительной Почвенной Засухи

И.М. Гусейнова*, Д.Р. Алиева, А.Ч. Маммадов, Д.А. Алиев

Институт ботаники НАНА, Бадамдарское шоссе, 40, Баку AZ1073, Азербайджан;

E-mail: huseynova-i@botany-az.org

Исследована динамика активности каталазы, аскорбатпероксидазы, гваякол-зависимой пероксидазы и бензидин-зависимой пероксидазы, а также уровень перекиси водорода в вегетативных органах твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) в условиях долговременной почвенной засухи. Установлено, что перекись водорода у устойчивого сорта пшеницы Баракатлы-95 накапливается на ранней стадии стресса, тогда как восприимчивый сорт Гарагылчыг-2 накапливает ее в значительных количествах уже на более поздних этапах. Судя по полученным результатам, ведущую роль в нейтрализации перекиси водорода в органах пшеницы играет каталаза. Наибольшая активность фермента отмечена в листьях и в корнях у засухоустойчивого сорта Баракатлы-95. Несмотря на то, что в систему защиты включаются также пероксидазы, однако активность этих ферментов даже после синтеза их новых порций остается значительно низкой по сравнению с каталазой. Методом нативного электрофореза в ПААГ обнаружено присутствие 1 изоформы КАТ, 7 изоформ АПО, 3 изоформ ГПО и 3 изоформ БПО в листьях, а также 3 изоформ КАТ, 4 изоформ АПО, 2 изоформ ГПО и 6 изоформ БПО в корнях пшеницы. В корнях были обнаружены одна изоформа КАТ при нормальном водообеспечении и три изоформы при засухе. Стресс, связанный с продолжительной почвенной засухой, в корнях пшеницы привел к увеличению гетерогенности за счет образования двух новых малоподвижных форм – КАТ2 и КАТ3.

Ключевые слова: *Triticum durum* Desf., перекись водорода, пероксидаза, каталаза, засуха

ВВЕДЕНИЕ

Глобальное изменение климата изменяет ландшафт сельского хозяйства и землепользования, ставя под угрозу наличие воды и вызывая экстремальные погодные явления в одних районах, при этом расширяя вегетационный период в других. Повышение температур создает угрозу возникновения засух, других экстремальных погодных явлений и засушливости почв. Засухи, наводнения, волны тепла, морозы и песчаные бури — все эти природные явления угрожают жизнеспособности сельскохозяйственных культур. Одной из главных причин снижения урожайности высокопродуктивных сельскохозяйственных растений является их недостаточная устойчивость к неблагоприятным факторам среды. Поэтому чрезвычайно важно знать основные показатели, которые могут характеризовать устойчивость растений к тем или иным неблагоприятным факторам среды. В связи с глобальными изменениями климата среди культурных растений, наверное, самое пристальное внимание исследователей привлекает пшеница. Зерновые культуры, в том числе пшеница, в первой половине вегетационного периода часто страдают от недостатка влаги, в результате чего

возникают те или иные отклонения в нормальном ходе физиологических процессов, которые приводят к снижению их продуктивности (Aliyev, 2001, 2012). В связи с этим большой интерес представляет исследование влияния засухи на физиолого-биохимические процессы у пшеницы в период онтогенеза. В результате нарушений нормального функционирования биохимических циклов повышается содержание свободных радикалов в тканях, и в частности активных форм кислорода (АФК), которые повреждают саму клетку и ее структуры (Foreman et al., 2003; Foyer and Noctor, 2005). Перекись водорода (H_2O_2) является самой стабильной из активных форм кислорода. H_2O_2 играет ключевую роль как сигнальная молекула в координации других реакций устойчивости, включая реакцию сверхчувствительности. Одним из главных звеньев защиты от АФК служат ферменты, удаляющие H_2O_2 – каталаза и пероксидазы (Hirt and Shinozaki, 2004; Miller et al., 2010; Devi et al., 2011). Эти ферменты, используя в качестве донора электронов H_2O_2 в случае каталазы или различные органические соединения в случае пероксидазы, катализируют двухэлектронное восстановление H_2O (Jebali, 2007). Индивидуальные пероксидазы различаются по субстрат-

ной специфичности, что связано с изменением заряда и конфигурации фермента и субстрата при разных значениях pH (Klisurska and Dencheva, 1980; Gajhede, 2001).

Очень мало исследований, в которых была бы проведена сравнительная оценка активности сразу нескольких ферментов, обеспечивающих защиту растения от перекиси водорода. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование динамики активности некоторых ферментов антиоксидантной системы твердой пшеницы, участвующих в детоксикации пероксида водорода в условиях долговременной почвенной засухи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В данной работе были использованы два контрастных генотипа твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.), взятые из Генофонда Научно-исследовательского института земледелия: засухоустойчивый генотип Баракатли-95 и неустойчивый к засухе генотип Гарагылчыг-2. Растения были выращены в полевых условиях нормального водообеспечения и в условиях засухи. Обезвоживание достигалось предотвращением полива. Опыты проводились в фазах цветения, молочной и восковой спелости онтогенеза, так как этот период является наиболее чувствительным к недостатку воды, и растения чаще подвергаются действию водного стресса.

Гистохимическое определение перекиси водорода. Определение уровня перекиси водорода в листовых дисках проводилось путем окрашивания их 3,3'-диаминобензидином (ДАВ), pH 5,0. Затем из дисков удалялся хлорофилл с помощью кипячения в концентрированном спирте. После чего диски обрабатывались фиксирующим раствором, выкладывались на прозрачную пленку и сканировались.

Выделение ферментного экстракта. Для получения обшклеточного экстракта пшеницы, листья растирали в среде, содержащей 1 мМ EDTA, 2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF), 1% ПВП, 100 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7,8), 0,1% тритон X-100, затем фильтровали и центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g. Полученный супернатант использовали для анализа антиоксидантных ферментов.

Определение активности антиоксидантных ферментов. Активность исследуемых ферментов в листьях и корнях пшеницы оценивали спектрофотометрически в момент линейного протекания реакции.

Активность каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) определяли по изменению оптической плотности

реакционной смеси при 240 нм за 1 минуту (Kumar and Knowles, 1993). Метод основан на определении скорости разложения перекиси водорода каталазой исследуемого образца с образованием воды и кислорода. Активность рассчитывали в мкмоль/(мг белка мин) на основе коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Активность аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) определяли по методике (Nakano and Asada, 1981) с некоторыми модификациями. Метод основан на определении скорости разложения перекиси водорода аскорбатпероксидазой исследуемого образца с образованием воды и дегидроаскорбата. Оптическую плотность регистрировали на спектрофотометре при 290 нм. Активность рассчитывали в мкмоль/(мг белка мин) на основе коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Активность гваякол-зависимой формы пероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) определяли по изменению оптической плотности при 470 нм реакционной смеси за 3 минуты (Mahalingam et al., 2005). Активность ГПО рассчитывали по количеству окисленного гваякола в мкмоль/мг белка мин с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Активность бензидин-зависимой формы пероксидазы (БПО, КФ 1.11.1.7.) измеряли по увеличению оптической плотности при 590 нм в реакционной смеси за 1 минуту (Gechev et. al., 2002). Активность БПО рассчитывали по количеству израсходованного бензидина в мкмоль/мг белка мин с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon = 39 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Определение изоферментного спектра антиоксидантных ферментов. Качественные изменения активности ферментов определяли с использованием вертикального ПААГ электрофореза (7%-ного для КАТ и гваякол-ПО, 10%-ного для АПО) по методу Девиса (Davis, 1964). Электрофорез был проведен в течение 3 часа при 4°C при стабильном токе 30 мА, используя прибор SE 250 (Amersham Biosciences, США). Окрашивание линий каталазы осуществляли по методу Андерсона и др. (Anderson et al., 1995), аскорбатпероксидазы по методу Миттлер и Зилинскаса (Mittler and Zilinskas, 1993), гваяколпероксидазы по методу Радотика и др. (Radotic et al., 2000), бензидин-пероксидазы по методу Куперс и др. (Cuypers et. al., 2002).

Определение количества белков. Количество белков определяли по методу (Sedmak and Grossberg, 1977). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистический анализ. В работе представлены данные 3 опытов, проведенных в 3-

кратной биологической повторности. Расчеты, построение графиков и их описание осуществляли с помощью приложений Microsoft Office Word 7 и Excel 7 для Windows XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Одной из наиболее ранних реакций, связанных с устойчивостью растений к водному дефициту, является образование активных форм кислорода (АФК), наиболее важной из которых является перекись водорода (Hammond-Kosack, Jones, 1996). Уровень перекиси водорода возрастает при абиотических и биотических стрессах, а накопление уровня H_2O_2 зависит от силы и продолжительности стрессора. Кроме того, концентрация H_2O_2 может отличаться в различных клеточных структурах и зависит от типа стресса.

Наши результаты по определению уровня перекиси водорода путем гистохимического окрашивания показывают повышение уровня H_2O_2 в стрессовых растениях по сравнению с контролем. Реакция с 3,3'-диаминобензидином вызывала окрашивание срезов различной интенсивности. Распределение окраски срезов и её интенсивности зависит от периода вегетации. Детальный анализ образования H_2O_2 при долговременной почвенной засухе у чувствительного генотипа Гарагылчыг-2 и устойчивого Баракатли-95 показал, что значительно больше перекиси водорода накапливал чувствительный генотип, по сравнению с устойчивым, в фазе молочной спелости (Рис. 1В).

Следует отметить, что в фазе цветения по накоплению перекиси водорода у засухоустойчивого генотипа пшеницы Гарагылчыг-2 не было обнаружено отличий между контрольными и стрессовыми растениями, тогда как в листьях устойчивого к засухе генотипа Баракатли-95 наблюдалось накопление H_2O_2 по сравнению с листьями нормально поливаемых растений (Рис. 1А). Однако в фазе молочной спелости перекись водорода накапливается более интенсивно у генотипа Гарагылчыг-2, чем у Баракатли-95 (Рис. 1В). В фазе восковой спелости у обоих исследованных генотипов наблюдается накопление H_2O_2 при стрессе (Рис. 1С). Таким образом, перекись водорода у устойчивого сорта пшеницы накапливается на ранней стадии онтогенеза, тогда как чувствительный сорт накапливает ее в значительных количествах уже на более поздних стадиях вегетации.

В следующей серии экспериментов исследовали активность и изоформенный состав антиоксидантных ферментов, участвующих в де-

токсикации перекиси водорода в растениях. В качестве субстратов при выявлении пероксидазной (антиоксидантной) функции в наших исследованиях были использованы бензидин, гваякол и аскорбат.

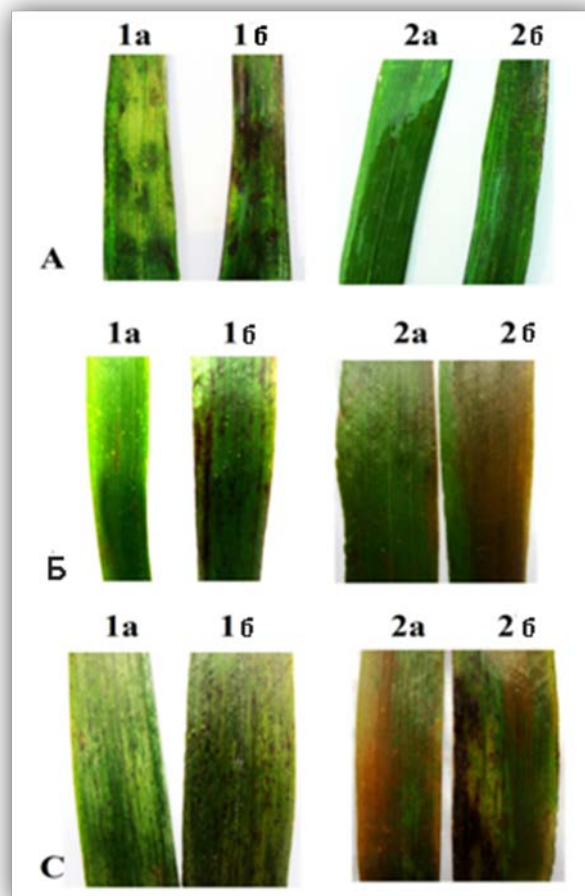


Рис. 1. Распределение H_2O_2 в листьях пшеницы, выращенных в условиях нормального водообеспечения (а) и при засухе (б) в различных фазах вегетации: А – цветение, Б – молочная спелость, С – восковая спелость; 1 – Баракатли-95, 2 – Гарагылчыг-2.

Проведенное исследование показало, что конститутивная величина активности аскорбапероксидазы была высока в листьях пшеницы в начале эксперимента (т.е. в фазе цветения) (Рис. 2 и Рис.3).

Следует отметить, что конститутивный уровень активности АПО был более высоким у устойчивого генотипа Баракатли-95, чем у чувствительного Гарагылчыг-2. В фазах молочной и восковой спелости активность фермента снижалась у обоих генотипов, но при этом оставалась на высоком уровне по сравнению с контролем. В корнях наблюдали гораздо меньшую вариацию исследуемого показателя. Падение активности фермента можно объяснить быстрой инактивацией его пула при катализируемой ре-

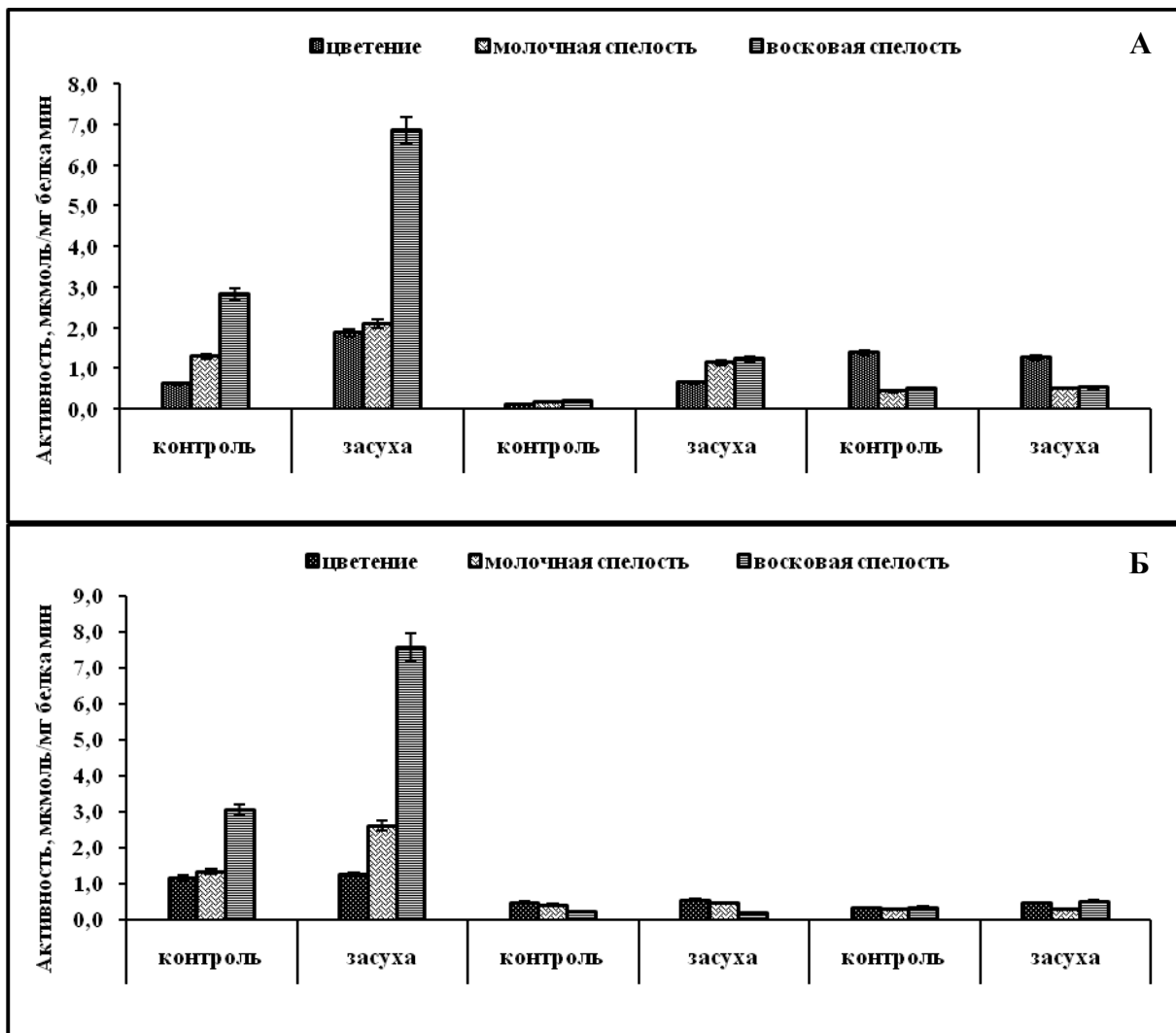


Рис. 2. Активность пероксидазной ферментной системы листьев (А) и корней (Б) у засухоустойчивого сорта пшеницы Баракатли-95 при нарастающей почвенной засухе.

акции в ходе онтогенеза. Ресинтез новых молекул фермента (или изоформ) при стрессе, по-видимому, обеспечил возрастание активности по сравнению с контролем. Отмеченное нами увеличение активности АПО в листьях пшеницы также может быть связано с повышением концентрации H_2O_2 , которое приводит к активации фермента. Недавно было установлено, что активация экспрессии гена аскорбатпероксидазы APO2 в листьях арабидопсиса происходит с участием внеклеточного пула H_2O_2 (Bechtold et al., 2008).

Гваяколовойпероксидазе отводится небольшая роль в нейтрализации пероксида водорода в начале фазы цветения. После чего ее активность повышается в листьях и уменьшается в корнях в стрессовых вариантах по сравнению с началом вегетации. Повышение активности фермента в листьях пшеницы в конце вегетации может быть связано с возрастанием содержания соединений фенольной природы (Maksimović et al., 2008).

В начале фазы цветения активность бензидин-пероксидазы в листьях устойчивого генотипа - Баракатли-95, подвергавшихся водному дефициту, выше, чем в растениях контрольного варианта, а у чувствительного – Гарагылычг-2, напротив, ниже. В конце вегетационного периода активность БПО повышается как в листьях, так и в корнях. Повышение активности БПО в подземных органах растений носило более выраженный характер.

Таким образом, в листьях и корнях пшеницы была обнаружена высокая ферментативная активность пероксидазы, которая изменялась в течение вегетационного периода. Наблюдаемые нами изменения активности пероксидазы на разных фазах развития указывают на ее активное участие в метаболических процессах. Как показали результаты работы, в ходе онтогенеза пшеницы наблюдалось довольно широкое изменение значений пероксидазной активности. Характер динамики активности пероксидазы был

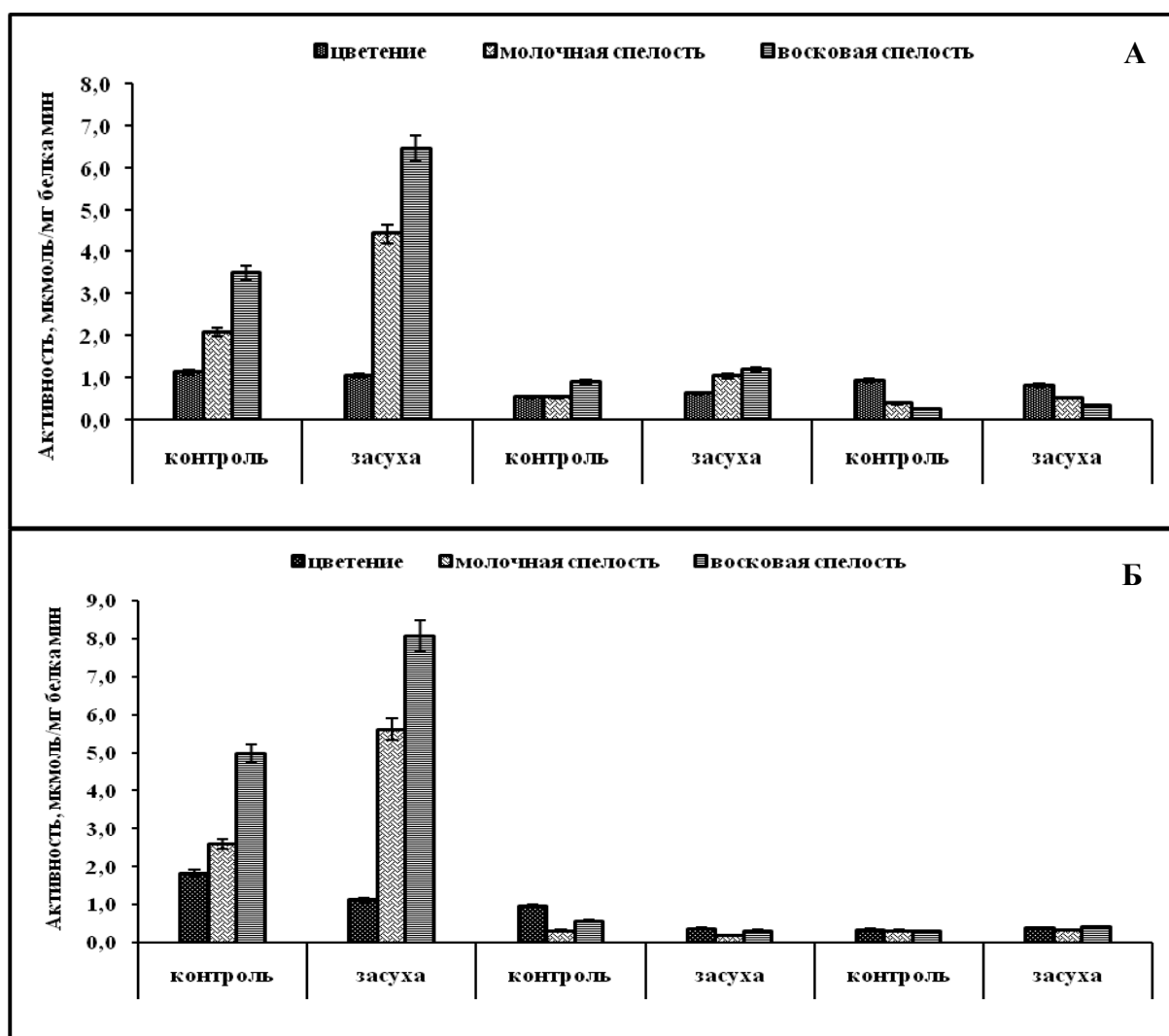


Рис. 3. Активность пероксидазной ферментной системы листьев (А) и корней (Б) у неустойчивого к засухе сорта пшеницы Гарагылчыг-2 при нарастающей почвенной засухе.

направлен в сторону ее повышения во всех фазах развития растений. Таким образом, наиболее высокий уровень пероксидазной активности обнаружен в генеративном возрастном состоянии. Полученные данные согласуются с результатами работ ряда авторов (Андреева, 1988; Zhang and Kirkham, 1994), которые полагают, что максимальная активность пероксидазы совпадает с периодом наиболее интенсивных метаболических процессов, происходящих во время цветения и плодоношения растений. Ранее показано значительное увеличение активности пероксидазы у устойчивых сортов пшеницы (Shetty et al., 2003). Возможно, этот фермент задействован в защитных реакциях, связанных с укреплением клеточных стенок. Однако не исключено также, что пероксидаза является одним из источников перекиси водорода, поскольку формы фермента клеточной стенки растений являются важными продуцентами H_2O_2 (Hammond-Kosack, Jones, 1996).

Полученные нами данные показали, что

долговременная почвенная засуха увеличивает активность каталазы, как в листьях, так и в корнях растений (Рис. 4).

Недостаток влаги в почве весь период вегетации способствовал росту активности каталазы. Исходная активность каталазы в листьях пшеницы была значительно выше, чем в корнях. Такую картину наблюдали на протяжении всего эксперимента. Засуха активировала каталазу в листьях устойчивых генотипов пшеницы и незаметно влияла на активность этого фермента в листьях неустойчивых генотипов. При адаптации растений к условиям засухи наибольшая активность каталазы отмечена в листьях у засухоустойчивого сорта Баракатли-95 (Рис.4). Это вполне согласуется с данными литературы: в условиях водного стресса у засухоустойчивых генотипов мягкой и твердой пшеницы активность каталазы повышается, а у чувствительных - остается неизменной или снижается (Sairam et al., 2001; Zhang et al., 2000; El-Fadly et al., 2007).

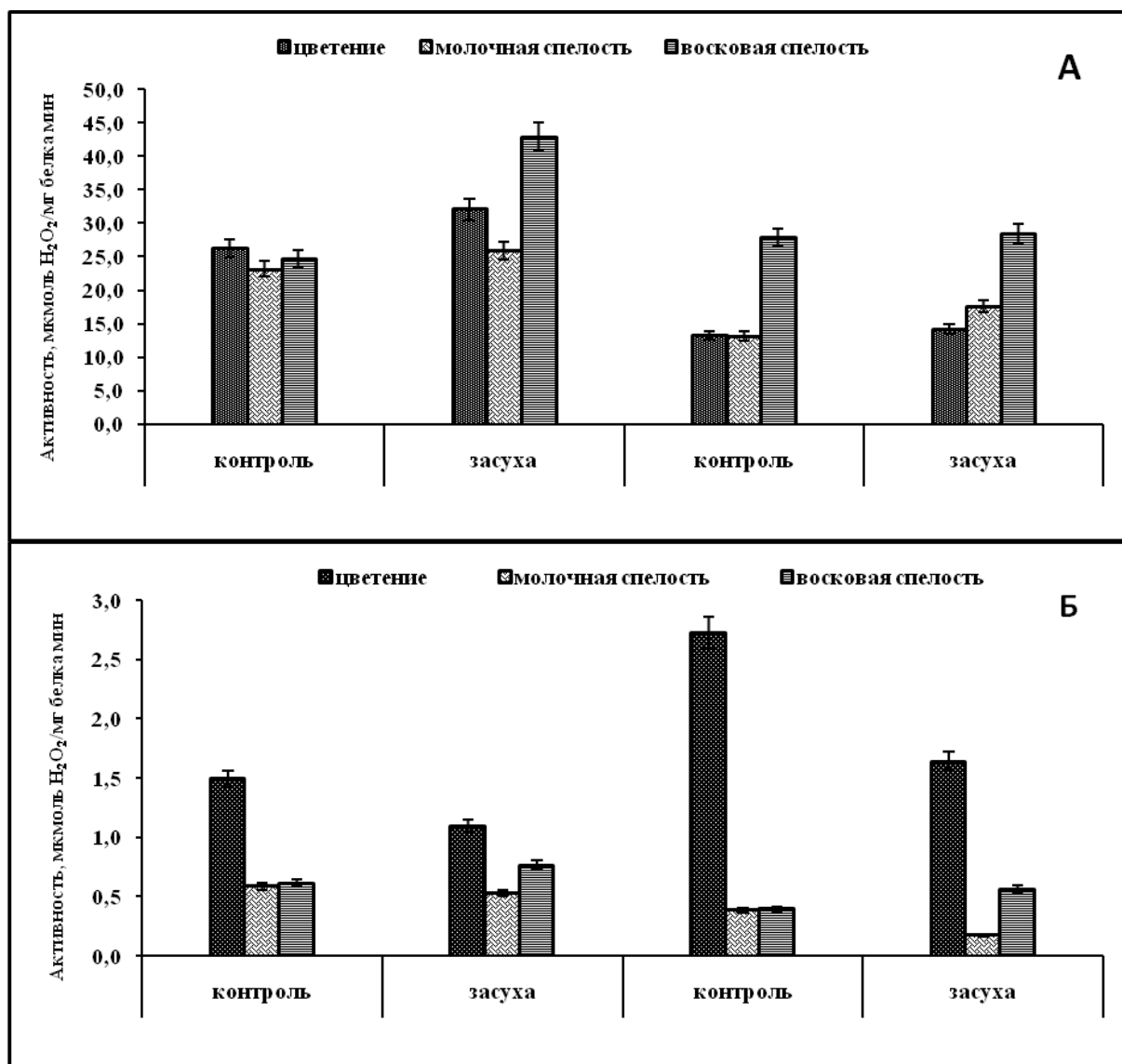


Рис. 4. Активность каталазы в листьях (А) и корнях (Б) у засухоустойчивого (Баракатли-95) и чувствительного к засухе (Гараğылçыг-2) сортов пшеницы при действии долговременной почвенной засухи.

Таким образом, полученные результаты предполагают, что ведущая роль в нейтрализации перекиси водорода в органах пшеницы отведена каталазе. Несмотря на то, что в систему защиты включаются также пероксидазы, однако активность этих ферментов даже после синтеза их новых порций остается значительно низкой по сравнению с каталазой. Предполагается локальное функционирование пероксидаз для нейтрализации пероксида водорода в отдельных органах растения.

У растений имеется широкий набор изоформ пероксидазы. Спектр форм пероксидаз характеризуется весьма высокой лабильностью, что дает основание отнести ее к маркерам физиологического состояния растений. Множественные формы пероксидаз осуществляют разные функции в растении: одни участвуют в

процессах роста, другие выполняют защитную роль, обеспечивая растению возможность в условиях стрессовых факторов получать энергию, необходимую для поддержания жизнедеятельности. Как видно из Рис.5, в листьях пшеницы было выявлено 2 медленно и 1 средне движущихся зон, а в корнях – 1 медленно и 1 быстро движущихся зон гваяколовой пероксидазы. Изменения изоферментного спектра более выражены в клетках листьев растения. Предполагается, что изоформа ГПОЗ задействована в устойчивости растения к засухе. Аналогичные данные были получены у проростков мягкой пшеницы при акклиматизации растений к низким температурам (Scebba et al., 1998). Множественные формы энзима, работающие в растении в различные периоды роста и развития, характеризуются тем, что способны окислять раз-

ные субстраты и действуют при неодинаковых условиях окружающей среды.

При анализе спектра бензидиновой пероксидазы при нарастающей почвенной засухе были обнаружены 3 изоформы фермента в листьях и 6 изоформ в корнях. Анализ изоферментного спектра выявил, что в условиях водного дефицита интенсивность окрашивания некоторых полос изоэнзимов пероксидазы (БПО2, БПО5 и

БПО6) была сильнее (рис. 6), что, по-видимому, свидетельствует о возможности синтеза фермента *de novo*. Данные электрофоретического анализа соответствовали измерениям активности БПО: так как активность БПО в корнях у стрессовых генотипов была намного выше, чем у контрольного варианта и более выраженной у чувствительного генотипа по сравнению с толерантным.

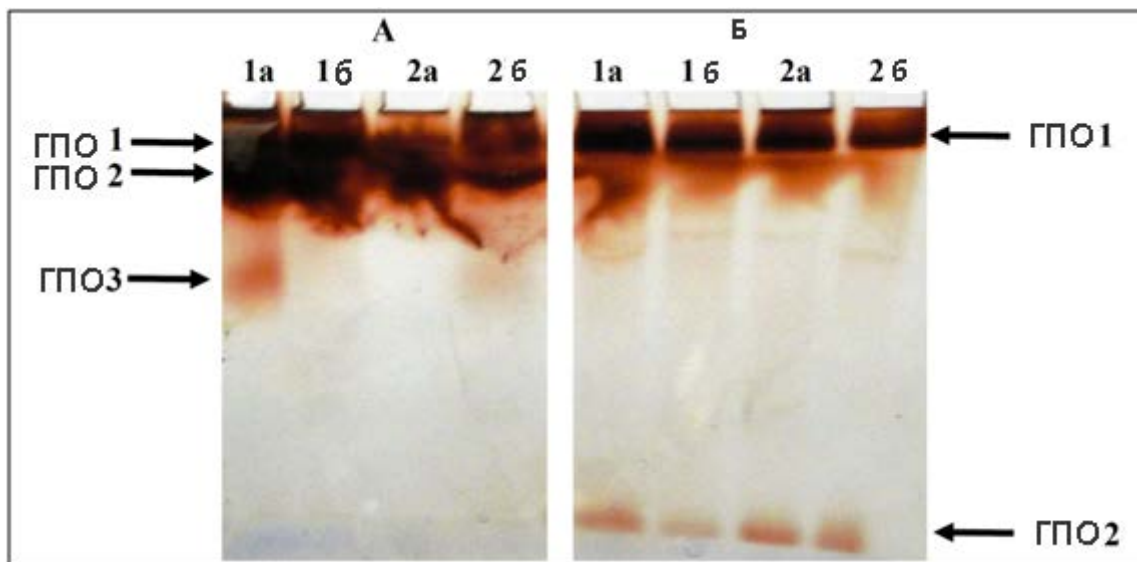


Рис. 5. Электрофоретический спектр гваякопероксидазы листьев (А) и корней (Б) пшеницы в условиях нормального водообеспечения (а) и при засухе (б); 1 – Баракатли-95, 2 – Гарагылчыг-2. Электрофорез был проведен в 7%-ном ПААГ в Трис-глициновом буфере, рН 8,3, при 4°С, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 35 мкг на дорожку геля.

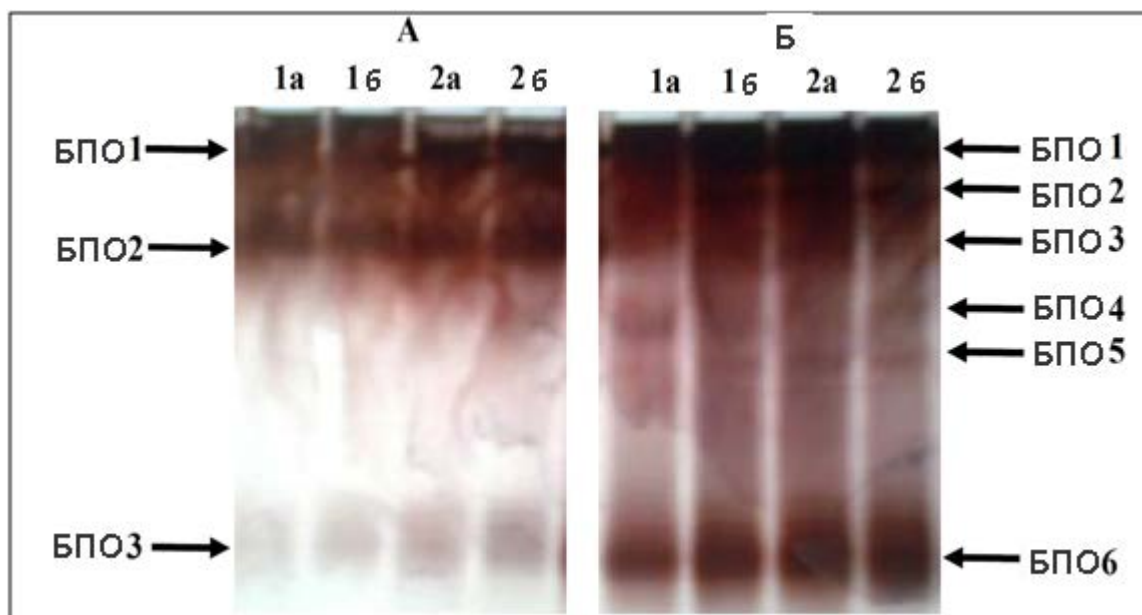


Рис. 6. Электрофоретический спектр бензидинпероксидазы листьев (А) и корней (Б) пшеницы в условиях нормального водообеспечения (а) и при засухе (б); 1 – Баракатли-95, 2 – Гарагылчыг-2. Электрофорез был проведен в 7%-ном ПААГ в Трис-глициновом буфере, рН 8,3, при 4°С, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 45 мкг на дорожку геля.

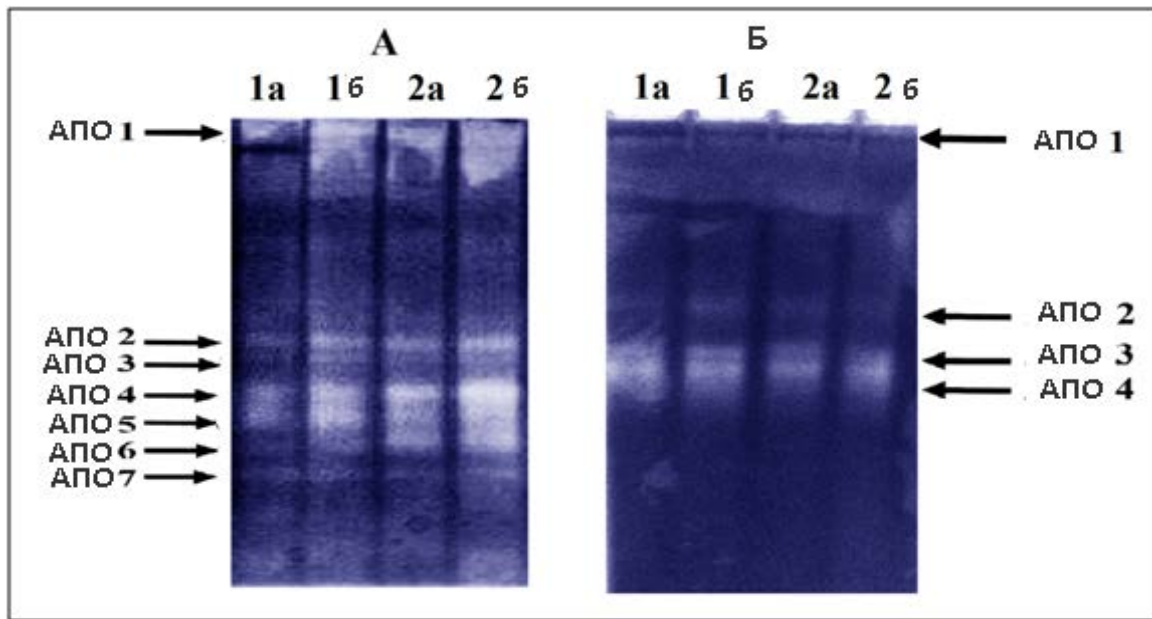


Рис. 7. Электрофоретический спектр аскорбатпероксидазы листьев (А) и корней (Б) пшеницы, выращенной в условиях нормального водообеспечения (а) и при засухе (б); 1 – Баракатли-95, 2 – Гарагылчыг-2. Электрофорез был проведен в 10%-ном ПААГ в Трис-глициновом буфере, рН 8,3 (с добавлением 2 мМ аскорбата натрия), при 4°С, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 40 мкг на дорожку геля.

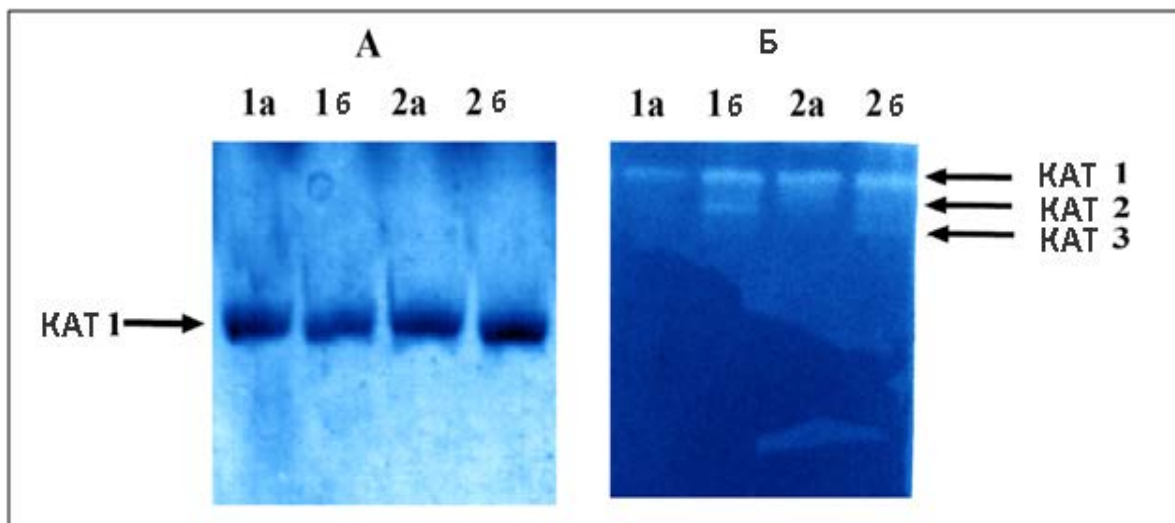


Рис. 8. Электрофоретический спектр каталазы листьев (А) и корней (Б) пшеницы, выращенной в условиях нормального водообеспечения (а) и при засухе (б); 1 – Баракатли-95, 2 – Гарагылчыг-2. Электрофорез был проведен в 7%-ном ПААГ в Трис-глициновом буфере, рН 8,3, при 4°С, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 30 мкг на дорожку геля.

Жанг с соавт. (Jang et. al., 2004) показали связь между изоферментным составом пероксидазы и участием генов ПО в формировании защитного механизма картофеля при инфицировании патогеном. На основании данных авторы пришли к выводу, что стресс, вызванный проникновением патогена, оказывает существенное влияние на экспрессию генов пероксидазы.

Анализ изоферментных профилей аскорбатпероксидазы у генотипов пшеницы, различа-

ющихся по засухоустойчивости, выявил 7 изоформ в листьях и 4 изоформы в корнях, которые обозначены как 1-7 (Рис. 7). Изменения изоферментного спектра, как показал сравнительный анализ, более выражены в клетках листьев. При анализе электрофоретического спектра АПО листьев пшеницы в начале засухи (т. е. в фазе цветения) было обнаружено 4 изоформы (данные не показываются). Почвенная засуха сопровождалась увеличением числа изоформ АПО в

листьях до 7 у обоих вариантов (при поливе и при засухе). В восковой фазе развития растений наблюдали увеличение интенсивности высокомолекулярной изоформы и появление дополнительных 3 изоформ АПО (Рис. 7).

Под воздействием стрессора электрофоретический спектр каталазы изменялся аналогично изменению активности КАТ. При анализе изоферментного состава каталазы в листьях пшеницы выявлена всего лишь одна изоформа фермента с малой электрофоретической подвижностью, как у стрессовых, так и у контрольных вариантов, что соответствует литературным данным (Racchi et al., 2001), тогда как в корнях были обнаружены одна изоформа при нормальном водоснабжении и три изоформы – при засухе. Стресс, связанный с продолжительной почвенной засухой в корнях пшеницы привел к увеличению гетерогенности за счет образования двух новых – КАТ2 и КАТ3 малоподвижных форм каталазы (Рис. 8). Предполагается, что динамика нарастания активности КАТ связана с постепенным увеличением концентрации перекиси водорода вследствие реакции дисмутации. Кроме того, каталаза имеет низкое сродство к субстрату и начинает работать при достаточно высоком содержании перекиси.

Таким образом, полученные данные характеризуют количественные и качественные изменения ферментов в различных органах генотипов пшеницы при действии долговременной почвенной засухи. Обнаруженная разнокачественность отдельных форм ферментов может иметь адаптивное значение и являться показателем устойчивости к водному стрессору.

Анализируя вышесказанное, необходимо отметить, что ферменты антиоксидантной системы защиты растений принимают участие в регуляции метаболизма в ходе онтогенеза и имеют особое значение для растений в обеспечении быстрой приспособленности к почвенному недостатку воды. При действии стрессовых факторов (особенно длительно и интенсивно) происходит изменение активности антиоксидантных ферментов и качественные или количественные перестройки компонентного состава, что связано со степенью устойчивости растений. То есть, в механизмах адаптации растений к экстремальным условиям внешней среды множественные молекулярные формы ферментов играют значительную роль. Полученные в работе результаты позволяют предполагать, что наличие нескольких ферментов, выполняющих одну и ту же каталитическую функцию, – весьма ценное свойство, расширяющее адаптационные возможности организма, что особенно важно для жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреева В.А.** (1988) Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 359 с.
- Aliiev J.A.** (2001) Physiological bases of wheat breeding tolerant to water stress. Proceedings of the 6th International Wheat Conference, Budapest, Hungary, 2000. In: *Wheat in a Global Environment* (Bedo Z., Lang L., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London **9**: 693-698.
- Aliyev J.A.** (2012) Physiological and molecular bases of drought tolerance in wheat (*Triticum* L.) genotypes. In: D.F.Neves, J.D.Sanz (eds.) *Environmental Science, Engineering and Technology. Drought: New Research*. Nova Science Publishers Inc., New York, **2**: 47-95.
- Anderson M., Prasad T., Stewart C.** (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.*, **109**: 1247-1257.
- Cuypers A., Vangronsveld J., Cuijsters H.** (2002) Peroxidases in roots and primary leaves of *Pharus vulgaris* copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *J. Plant Physiol.*, **159**: 869-876.
- Davis B.** (1964) Disc electrophoresis. I. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**: 404-427.
- Devi R., Kaur N., Gupta A.K.** (2011) Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **49**: 257-265.
- El-Fadly G.A.B., Menshawy A.M., Farhat W.Z.E.** (2007) Molecular and biochemical studies on some bread wheat genotypes in relation to water stress tolerance. *African Crop Science Conference Proceedings*, **8**: 605-612.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulates plant cell growth. *Nature*, **27**: 442-446.
- Foyer C.H., Noctor G.** (2005) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1056-1071.
- Gajhede M.** (2001) Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications. *Biochem Soc. Trans*, **29**: 21-29.
- Gechev T., Gadjiev I., van Breusagem Eç. Inze D., Dukiandjiev S., Toneva V., Minkov I.** (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell Mol. Life Sci.*, **59**: 708-714.
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G.** (1996) Re-

- sistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8(10)**: 1773-1791.
- Hirt H., Shinozaki K.** (2004) Plant Responses to Abiotic Stress. Springer, Vienna, Austria. 297 p.
- Jang I., Park S., Kwon S., Kwon S.Y., Kim G.K., Kwak S.S.** (2004) Differential expression of 10 sweet potato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**: 451-455.
- Jebali J.** (2007) Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. *Environ. Monit. Assess*, **124**: 195-200.
- Klisurska B., Dencheva A.** (1980) Substrate specificity of peroxidase isoenzymes for hydrogen donors. *Biologia Plantarum*, **22(6)**: 404-409.
- Kumar C., Knowles N.** (1993) Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers. *Plant Physiol.*, **102**: 115-124.
- Mahalingam R., Shah N., Scrymgeour A., Fedoroff N.** (2005) Temporal evolution of the Arabidopsis oxidative stress response. *Plant Molecular Biology*, **57**: 709-730.
- Maksimović J.D., Maksimović V., Živanović B., Hadži-Tašković Šukalović V., Vuletić M.** (2008) Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast and their association with growth. *Plant Science*, **175(5)**: 656-662.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R.** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, **33**: 453-467.
- Mittler R., Zilinskas B.A.** (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem.*, **212**: 540-546.
- Nakano Y., Asada K.** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **22**: 867-880.
- Racchi M.L., Bagnoli F., Balla I., Daut S.** (2001) Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and *in vitro* micro propagated Oak (*Quercus robur* L.). *Plant Cell Reports*, **20**: 169-174.
- Radotic K., Ducic´ T, Mutavdzic´ D.** (2000) Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Envir. and Exp. Botany*, **44**: 105-113.
- Sairam R.K., Chandrasekar V., Srivastava G.C.** (2001) Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Biologia Plantarum*, **44(1)**: 89-94.
- Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C.** (1998) Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia plantarum*, **104**: 747-752.
- Sedmak J.J., Grossberg S.E.** (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250. *Anal. Biochem.*, **79**: 544-552.
- Shetty N.P, Kristensen B.K, Newman M.A., Møller K., Gregersen P.L., Jørgensen H.J.L.** (2003) Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **62(6)**: 333-346.
- Zhang Q.H., Liu H.S., Meng F.T. Zhang, S.T., Zhang Z.H. & Kang G. Z.** (2000) The effect of drought stress on physiological characters of leaves and seed-filling characteristics of the new wheat cultivar Yamai 36 during the late developmental stage. *Scientia Agricultura Sinica*, **33(4)**: 94-96.
- Zhang J.X., Kirkham M.B.** (1994) Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.*, **35**: 785-791.

Uzunmüddətli Torpaq Quraqlığı Şəraitində Buğda Bitkisinin Kök Və Yarpaqlarında H₂O₂-in Zərərsizləşdirilməsində İştirak Edən Antioksidant Fermentlər

İ.M.Hüseynova, D.R.Əliyeva, Ə.Ç. Məmmədov, C.Ə. Əliyev

AMEA Botanika İnstitutu

Uzunmüddətli torpaq quraqlığı şəraitində buğda bitkisinin vegetativ orqanlarında katalaza, askorbatperoksiyaza, qvayakolperoksiyaza, benzidinperoksiyaza fermentlərinin aktivliklərinin dəyişmə dinamikası və həmçinin hidrogen peroksidin toplanma dərəcəsi tədqiq edilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, hidrogen peroksid quraqlığa davamlı Bərəkətli-95 genotipində stresin ilkin mərhələsində, quraqlığa həssas Qaraqılçiq-2 genotipində isə quraqlığın sonrakı mərhələlərində daha çox toplanır. Əldə olunan nəticələrə əsasən belə qənaətə gəlmək olar ki, buğda bitkisinin vegetativ orqanlarında hidrogen peroksidin neytrallaşmasında əsas rol katalazaya məxsusdur. Fermentin yüksək fəallığı daha çox Bərəkətli-95 genotipinin köklərində müşahidə olunur. Müdafiə sisteminə peroksiyazaların da qoşulmasına baxmayaraq bu fermentlərin fəallığı hətta onların yeni porsiyalarının sintezindən sonra belə katalaza fermentinə nisbətən daha aşağı səviyyədə olmuşdur. Nativ PAAG elektroforez metodunun köməyi ilə buğda bitkisinin yarpaqlarında katalazanın 1, askorbatperoksiyazanın 7, qvayakolperoksiyazanın 3, benzidinperoksiyazanın 3, köklərdə isə katalazanın 3, askorbatperoksiyazanın 4, qvayakolperoksiyazanın 2, benzidinperoksiyazanın isə 6 izoformasını aşkar olunmuşdur. Kökdə normal suvarma şəraitində KAT-ın 1, quraqlıq zamanı isə 3 izoformasını müşahidə edilmişdir. Uzun müddətli torpaq quraqlığı buğda bitkisinin köklərində az mütəhərrikiyə malik 2 yeni izoformanın əmələ gəlməsi hesabına KAT fermentinin heterogenliyinin artmasına səbəb olmuşdur.

Açar sözlər: *Triticum durum* Desf., hidrogen peroksid, peroksiyaza, katalaza, quraqlıq stressi

Enzymes Involved In The Detoxification Of H₂O₂ In The Leaves And Roots Of Wheat Subjected To Long-Term Soil Drought

İ.M.Hüseynova, D.R.Aliyeva, A.Ch.Mammadov, J.A. Aliyev

Institute of Botany, ANAS

The dynamics of the activity of catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and benzidine peroxidase, as well as the level of hydrogen peroxide in the vegetative organs of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars was studied under long-term soil drought conditions. It was established that hydrogen peroxide generation occurred at early stages of stress in the tolerant variety Barakatli-95, whereas in the susceptible variety Garagylchyg-2 its significant amounts were accumulated only at later stages. The highest activity of catalase which plays a leading role in the neutralization of hydrogen peroxide was observed in the leaves and roots of the drought tolerant variety Barakatli-95. Despite the fact that the protection system also includes peroxidases, the activity of these enzymes even after synthesis of their new portions is substantially lower compared with catalase. Native PAGE electrophoresis revealed the presence of one isoform of CAT, seven isoforms of APX, three isoforms of GPO and three isoforms of BPO in the leaves, and also three isoforms of CAT, four isoforms of APX, two isoforms of GPO and six isoforms of BPO in the roots of wheat. One isoform of CAT was found in the roots when water supply is normal and three isoforms were observed under drought conditions. Stress associated with long-term soil drought in the roots of wheat has led to an increase in the heterogeneity due to the formation of two new sedentary forms of catalase: CAT2 and CAT3.

Key words: *Triticum durum* Desf., hydrogen peroxide, peroxidase, catalase, drought stress