



ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ НЯКОИ ЕНЗИМНИ АКТИВНОСТИ ПРИ ФАСУЛ И ВИГНА ПРЕЗ ПЕРИОДА НА ЗАСУШАВАНЕ И ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ

НЕВЕНА СТОЕВА, МАЛГОЖАТА БЕРОВА, ЗЛАТКО ЗЛАТЕВ,
ЛЮБКА КОЛЕВА, МИРОСЛАВА КАЙМАКАНОВА

STUDY ON SOME ENZYME ACTIVITY IN BEAN AND VIGNA DURING DRY PERIOD AND RECOVERY

NEVENA STOEVA, MALGORZATA BEROVA, ZLATKO ZLATEV,
LYUBKA KOLEVA, MIROSLAVA KAYMAKANOVA

Abstract

The purpose of this study was to examine to what extent the activity of enzymes GPOD and APOD may be applied as a physiological test for rapid and reliable diagnosis of plant resistance to water stress and subsequently to assess the tolerance of some bean and vigna genotypes.

Experiments were carried out during the stress period and after recovery from stress. Valuation of the tolerance of plants was carried out by means of a physiological test. It was observed that the water stress has an inhibitory effect on the physiological state of bean and vigna plants. Enzymes GPOD and APOD were identified as particularly suitable indicators for assessing the tolerance of bean and vigna genotypes to water stress.

Key words: water stress, recovery, physiological test, enzymes.

Съкращения: GPOD - гваякол пероксидаза; APOD - аскорбатпероксидаза; МДА – малондиалдехид; АКВ – активни кислородни видове

ВЪВЕДЕНИЕ

Един от най-добре проучените физиологични механизми на толерантност към засушаване е промяната в активността на антиокислителната защитна система на клетката [2, 9]. Тази система включва неензимни и ензимни компоненти. Неензимни компоненти са аскорбиновата киселина, глутатионът, токоферолът, каротеноидните пигменти, полиамините и някои други. Ензимните компоненти включват ензимни системи, свързани с обезвреждането (или разграждането) на активните кислородни видове като супероксидна дисмутаза, каталаза, пероксидази и др. В условия на воден стрес антиокислителната защитна система на клетките се активира, в резултат на което се предизвикват

директни и индиректни негативни ефекти върху отделни звена и субпроцеси на фотосинтезата.

Много от директните ефекти са в резултат от възникването на окислителен стрес в клетките [8, 12]. Той се предизвиква от активни кислородни видове (АКВ) и от свободни радикали, чиято продукция ($O_2^{\bullet-}$; H_2O_2 ; 1O_2), нараства неконтролируемо при промяна на факторите на околната среда (интензивност на светлината, засушаване, засоляване, температурни изменения, метални йони, ксенобиотици и др.). Това води до съществени нарушения във физиологичните функции и нарушаване на хомеостазата на организма [4, 8, 10]. АКВ имат значителен окислителен потенциал и достатъчен полуживот, поради което са способни да окислят важни за клетката макромолекули – липиди, белтъци и ДНК. Един от най-характерните негативни ефекти е липидната пероксидация, която се получава при реакции на АКВ с полиненаситените мастни киселини в състава на липидите. В тези случаи се повишава нивото на МДА, който уврежда клетъчните компоненти, включително липидните мембрани, [3, 7].

Целта на изследването е да се определи промяната в антиокислителната защита на клетките при растения от два генотипа фасул и вигна, подложени на воден дефицит и възстановяване, и до колко тези показатели биха могли да се използват като физиологичен тест за оценка на толерантността на отделни генотипове към засушаването.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изведен беше вегетационен опит в стоманено-стъклена оранжерия на АУ-Пловдив с 2 генотипа фасул (I- В.Търново и II 91-089) и 2 генотипа вигна (I- 95-045 и II А4Е-004). Реакцията на генотиповете беше проследена в условия на воден стрес и след неговото преминаване.

Пластмасовите съдове бяха запълнени до 10 % от обема с дренаж (ситен чакъл). Вертикално в съдовете беше прикрепена полиетиленова тръбичка. Подготвените и тарирани съдове бяха запълнени с абсолютно суха торо-почвена смес и перлит (АСП). Влажността на почвата беше доведена до 75-80 % от ППВ и поддържана тегловно. Във всеки съд бяха отглеждаше по 4 растения. Растенията от всеки сорт бяха разделени на 2 групи: (1) растения с воден режим 75-80%% ППВ и (2) стресирани растения, на които в продължение на 10 дни водният режим беше 35-40 % от ППВ. След 7-дневно засушаването влажността на почвата беше възстановена до ниво 75-80%. Опитите бяха изведени в 5 -кратна повторност (съдове), по стандартна методика.

Активността на ензимите беше определена спектрофотометрично. Гваякол пероксидазата (GPOD, ЕС 1.11.1.7) беше определена при 436 nm по утвърдена методика [1], а ензима включен в аскорбат-глутатионовия цикъл - аскорбат пероксидаза (APOD, ЕС 1.11.1.11) - при 298 nm [5]. Липидната пероксидация беше определена също спектрофотометрично по количеството на МДА [6].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Растителните пероксидази присъстват в клетъчните стени, вакуолите и цитоплазмата. Те катализират окисляването на различни вещества чрез водороден пероксид (H_2O_2) или органични хидропероксиди, като по този начин разграждат последните. Гваяколът ($C_7H_8O_2$) е най-широко използваният електронен донор при определяне на общата пероксидазна активност на клетките, поради което така определената активност се нарича гваяколпероксидазна, а ензимът- гваякол пероксидаза (GPOD).

При изследваните генотипове фасул и вигна в началото на стресовия отговор се наблюдава повишение в активността на антиокислителните ензими. По-висока активност на GPOD е отчетена в корените на растенията от двата вида, а по-ниска активност на ензима се наблюдавана в листата на растенията. Резултатите за GPOD корелират с тези за МДА, представени на Фигура 2.

Забелязват се и значителни сортови различия по отношение на гваяколпероксидазната активност, което може да се използва и при определяне на чувствителните сортове. Получените от нас резултати показват, че засушаването предизвиква окислителен стрес, по-ясно изразен при следните генотипове: фасул – 91 089 и вигна – А4Е-004.

През периода на възстановяване на растенията от водния стрес данните за ензима се доближават до тези на контролните растения, като съществено това е изразено при листата.

Получените резултати за активността на ензима аскорбатпероксидаза следват подобна тенденция. От същата фигура се вижда, че стойности на ензимната активност в листата нарастват, като това е по-ясно изразено при фасула, вероятно под влияние на задълбочаващото се увреждане. В края на периода на възстановяване активността на ензима се променя съществено, като стойностите се доближават до тези, на контролните растенията. Засушаването на растенията води до значителни промени в активността на APOD и в корените на фасула.

Различните генотипове от двете култури също проявяват различия по отношение на APOD, но само по степента на повишена ензимна активност.

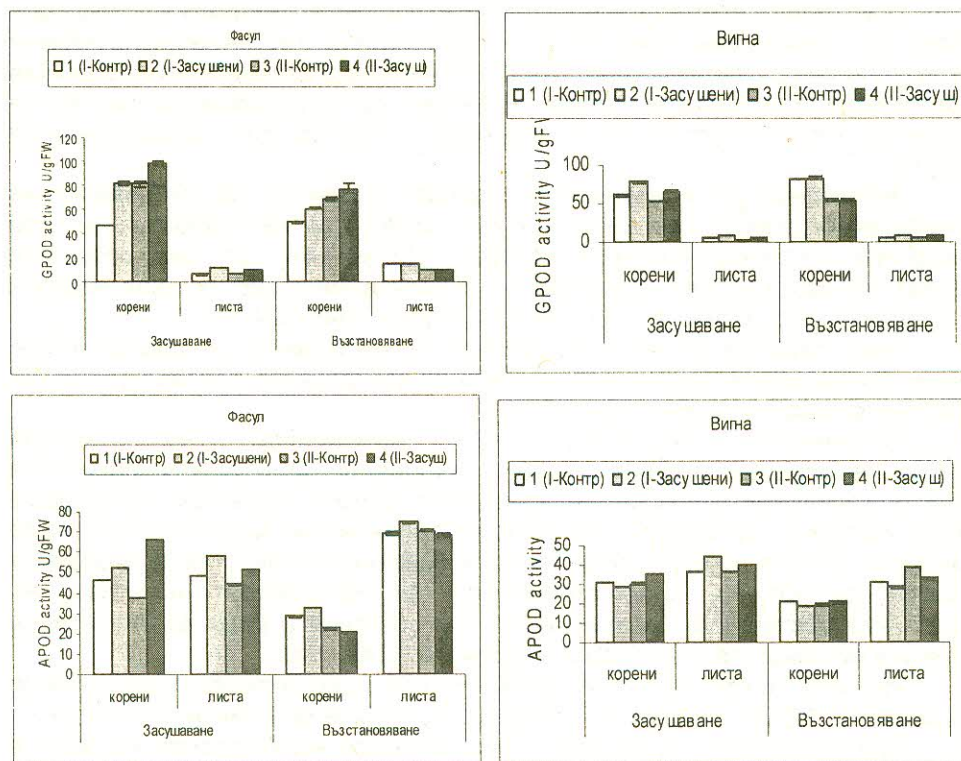
При развитието на водния стрес нараства количеството на МДА в растенията, което се явява като продукт на окислението на липидите и е индикатор за функционалната активност на мембраните. Резултатите от Фигура 2 показват, че нивото на МДА е особено високо на 7-ия ден от засушаването. Тези стойности се характеризират с по-ниска активност на APOD и обратно – по-високата активност на APOD редуцира нивото на МДА. Т според някои автори [11] е доказателство за ясно изразените свойства на ензима като антиоксидазна защита.

Растенията от различни сортове на един и същи вид реагират по различен начин на стресови въздействия и окислителен стрес. Това може да бъде важен критерий за оценка на сортовата толерантност и за разкриване на физиологичната същност на механизмите на толерантност в устойчивите сортове [11].

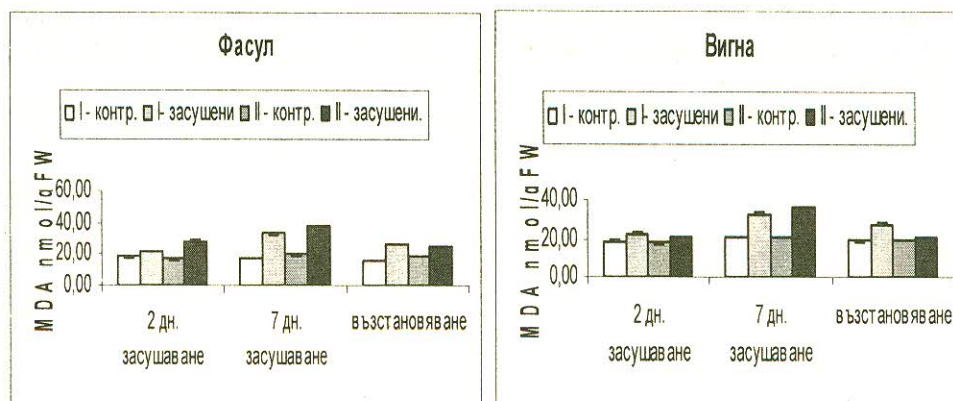
ИЗВОДИ

Пероксидазните ензими са особено подходящи показатели за оценка на толерантността на генотипове фасул и вигна към засушаване.

Въз основа на представените данни можем да заключим, че фасулевите растения генотип – В.Търново и вигна 95-045 са по-толерантни към засушаването отколкото останалите два генотипа, които са по-чувствителни, но по-бързо се възстановяват.



Фигура 1. Активност на ензимите GPOD и APOD (U/g FW) в листа и корени на различни генотипове фасул (I- В.Търново и II 91-089) и вигна (I- 95-045 и II A4E-004) през в периода на засушаване и възстановяване.



Фигура 2. Липидна пероксидация в листата на различни генотипове фасул (I- В.Търново и II 91-089) и вигна (I- 95-045 и II А4Е-004) през в периода на засушаването и възстановяването

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergmeyer H.U., 1974. Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim, Bergstrasse.
2. Bondsocq, M., Ch. Lauriere, 2005. Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* 138, 1185-1194.
3. Casano, L. M., H. R. Lascano, V. S. Trippi, 1994. Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen induced proteolysis in chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 35, 145 – 152.
4. Foyer C.H., Noctor. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plantarum* 119, 355-364.
5. Gerbling, K.P., G.J. Kelly, K. H. Fisher, E. Latzko, 1984. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from pea leaves. *Journal of Plant Pathology* 115, 59-67.
6. Heath R., L. Packer, 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198.
7. Hendry, G. A. F., 1993. Oxygen free radical process and seed longevity. *Seed Sci. Res.*, 3, 141- 153.
8. Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7 (9): 405-410.
9. Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environ.* 25, 239-250.
10. Noctor, G., S. Veljovic-Jovanovic, S. Driscoll, L. Novitskaya, and C.H.Foyer, 2002. Drought and oxidative load in wheat leaves: A predominant role for photorespiration? *Ann. Bot. (Lond.)* 89, 841–850.

11. Sairam, R.K., P.S. Deshmukh, D.C. Saxena, 1998. Role of Antioxidant Systems in Wheat. Genotypes Tolerance to Water Stress. *Biologia Plantarum* 41 (3):387-394.
12. Suzuki, N., R. Mittler, 2005. Reactive oxygen species and temperature stress. A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126, 45-51.