Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 2 (22). С. 150–159

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1
doi: 10.17223/19988591/22/12

Ю.В. Иванов, Ю.В. Савочкин

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва)

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Pinus sylverstris* L.) ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Мероприятие 1.4 (Соглашение № 14.B37.21.2078) и Мероприятие 1.3.2 (Соглашение № 14.132.21.1309)).

Исследовали особенности изменений изоферментного состава супероксиддисмутаз в органах (корневая система, гипокотиль, семядоли, хвоя) сеянцев сосны обыкновенной, выращенных при хроническом воздействии $ZnSO_4$ в повышенных концентрациях (25, 50 и 150 мкМ). Установлена весьма высокая корреляция содержания цинка: в корневой системе, гипокотилях, семядолях и хвое сеянцев с испытанными концентрациями $ZnSO_4$. С помощью гель-электрофореза выявлено наличие трех изоформ супероксиддисмутаз в корневой системе и гипокотилях сеянцев и четырех изоформ – в семядолях и хвое сеянцев. Ингибиторным анализом установлена принадлежность всех выявленных изоформ супероксиддисмутаз к медь/цинксодержащим изоформам (Cu/Zn-СОД). Количественным анализом бэндов изоформ супероксиддисмутаз показано дифференциальное изменение их активностей при стабильном уровне общей ферментативной активности на фоне испытанных концентраций $ZnSO_4$.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris; цинк; супероксиддисмутаза; ингибиторный анализ; Cu/Zn изоформы.*

Введение

Супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) принадлежат семейству металлоферментов, катализирующих диспропорционирование супероксид-аниона до молекулярного кислорода и перекиси водорода [1]. В результате удаления избытка супероксид-аниона супероксиддисмутазами (СОД) предотвращается окисление биомолекул самим радикалом и его производными [2].

В растениях обнаружено три формы СОД в зависимости от типа переходного металла-кофактора активного центра фермента: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД и Fe-СОД [1, 3]. Наиболее распространенными СОД в растениях являются Cu/Zn-содержащие изоформы (Cu/Zn-СОД), локализованные, главным об-

разом, в цитозоле. Fe-содержащие изоформы (Fe-СОД) типичны для хлоропластов, а Mn-содержащие (Mn-СОД) – для митохондрий растительной клетки [1, 3]. Однако точная субклеточная локализация различных типов изоформ СОД в клетках до сих пор изучена недостаточно [1, 2].

Большинство стрессоров способствует усилению образования супероксид-аниона в растительных клетках, которое, как правило, сопровождается увеличением активности СОД, необходимой для его нейтрализации [4, 5]. В последние десятилетия среди негативных факторов среды важную роль приобретает воздействие тяжелых металлов, увеличение доли добычи и выбросов которых создает угрозу стабильности естественных фитоценозов, в особенности лесных сообществ. С учетом того, что в Северном полушарии доминирующей растительностью являются представители отдела Хвойные, характеризующиеся высокой чувствительностью к атмосферному загрязнению [1], исследование механизмов их устойчивости является первостепенной научной задачей.

Ранее нами было показано, что сосна обыкновенная – типичный представитель хвойных бореальных лесов, на раннем этапе онтогенеза весьма чувствительна к воздействию тяжелых металлов, по сравнению с традиционными модельными объектами (*Arabidopsis thaliana* L., *Mesembryanthemum crystallinum* L., *Brassica napus* L. и др.), и отвечает на него дифференциальным изменением активности СОД в органах [6, 7]. С учетом того, что СОД выступают первой линией ферментативной защитной системы [3], а ее суммарная активность обусловливается вкладом различных типов изоформ, изучение индивидуальных изменений их активности в условиях действия тяжелых металлов представляется весьма важным. Принимая во внимание факт принадлежности ряда наиболее распространенных тяжелых металлов (например, меди и цинка) к группе необходимых для растений микроэлементов, в том числе входящих в состав активного центра изоформ СОД, изучение их влияния на изоферментный состав СОД особенно актуально.

Цель данной работы – изучение изменений особенностей изоферментного состава СОД и их активностей в органах сеянцев сосны обыкновенной в условиях постоянного действия повышенных концентраций цинка.

Материалы и методики исследования

Семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) сбора 2010 г., предоставленные Учебно-опытным лесхозом Брянской государственной инженерно-технологической академии, проращивали в растворах 1,26 (контроль), 25, 50 и 150 мкМ $ZnSO_4$ в дистиллированной воде в соответствии с ранее описанной методикой [6]. После сброса семенной кожуры и развертывания семядолей сеянцы выращивали в камере фитотрона со световыми периодом 16 ч [8] на специально разработанной питательной среде [7, 9]. Смену растворов проводили каждые 5 сут. Эксперимент заканчивали по достижении сеянцами возраста 6 недель на этапе органогенеза, характеризующемся высокой

энергией роста хвои и интенсивным потреблением элементов минерального питания [6].

Содержание ионов цинка в органах сеянцев определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Формула ФМ400» («Лабист», Россия) после минерализации образцов в растворах концентрированных азотной и хлорной кислот [6].

Экстракцию супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) из органов сеянцев проводили в соответствии с ранее описанной процедурой [10] с некоторыми модификациями. В частности, для нейтрализации низкой pH клеточного сока в процессе экстракции использовали 0,1М карбонатный буфер (pH 10,3).

Электрофорез белковой фракции в нативном состоянии (ферментные препараты СОД) проводили в полиакриламидном геле по стандартной методике [11]. Для равномерной загрузки слотов при проведении гель-электрофореза СОД образцы выравнивали по содержанию белка методом, основанным на взаимодействии ионов Cu^{2+} с белками в щелочных условиях [12, 13]. Для визуализации изоферментов СОД после завершения электрофореза гель инкубировали в течение 30 мин в темноте в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,8), содержавшем 150 мкМ рибофлавина и 250 мкМ нитросинего тетразолия. После этого гель тщательно промывали дистиллированной водой и переносили под люминесцентные лампы (100 ± 10 мкмоль фотонов/$м^2 \cdot с^{-1}$), пока изоформы СОД не становились видимыми [14].

Для селективного ингибирования изоформ СОД гели перед визуализацией инкубировали в течение 20 мин в растворах 3 мМ KCN (ингибирование Cu/Zn-СОД), 20 мМ H_2O_2 (ингибирование Fe-СОД и Cu/Zn-СОД) [14] и 10 мМ NaN_3 (ингибирование Fe-СОД и Mn-СОД) [15].

По завершении процесса визуализации акриламидные гели сканировали с разрешением 800 dpi для количественной оценки активностей изоформ СОД (по уровню сигнала соответствующего бэнда) в специализированной программе обработки изображений «BioCapt» (Vilber Lourmat, Германия). При определении индивидуальной активности изоформы СОД за 100% принимали ее активность в соответствующем органе сеянца контрольной группы, а при определении суммарной активности – активность всех изоформ в органе сеянца контрольной группы.

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Microsoft Excel 2003. Из каждой выборки исключали значения параметров, выходящие за рамки ±3σ. Итоговые значения, представленные в таблицах и на рисунках, являются средней арифметической величиной ± основная ошибка средней арифметической величины. Оценку существенности различий средних величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили на основании всех имеющихся экспериментальных данных за исключением отклоняющихся. Оценку коэффициентов корреляции проводили в соответствии со шкалой Чеддока.

Результаты исследования и обсуждение

При всех исследованных концентрациях $ZnSO_4$ наблюдалась значительная аккумуляция ионов цинка в корневой системе сеянцев сосны обыкновенной (табл. 1). Ранее максимальный уровень накопления ионов цинка в корневой системе отмечался нами при действии 50 мкМ $ZnSO_4$, в то время как при более высоких концентрациях (до 150 мкМ) он снижался [6]. Основную роль в этом играло сильное ингибирование цинком развития корневой системы, особенно боковых корней, которое в значительной мере устранялось выращиванием сеянцев на питательной среде оптимального состава [9]. Применение иного состава питательной среды для выращивания сеянцев в настоящей работе приводило к линейному увеличению содержания ионов цинка в корневой системе с ростом концентрации металла в питательном растворе ($r = 0,96$; $t_г = 4,60$).

Таблица 1

Содержание ионов цинка в органах сеянцев сосны обыкновенной, мкмоль/г сухой массы

Орган сеянца	$ZnSO_4$, мкМ			
	1,26	25	50	150
Корневая система	1,39 ± 0,14	15,27 ± 0,68	65,99 ± 6,33	112,26 ± 4,61
Гипокотиль	0,80 ± 0,03	2,58 ± 0,14	3,47 ± 0,16	10,17 ± 0,26
Семядоли	1,63 ± 0,05	4,50 ± 0,23	5,78 ± 0,38	11,22 ± 0,12
Хвоя	0,60 ± 0,02	1,17 ± 0,02	3,08 ± 0,24	6,33 ± 0,26

Особенности накопления и межорганной транслокации ионов цинка позволяют отнести сосну обыкновенную к группе типичных индикаторов, накапливающих ионы цинка в надземных органах пропорционально увеличению концентрации ионов металла в субстрате: гипокотили ($r = 0,998$; $t_г = 20,66$), семядоли ($r = 0,99$; $t_г = 8,71$), хвоя ($r = 0,99$; $t_г = 9,21$). При этом на порядок более высокое содержание ионов цинка в корневой системе сеянцев свидетельствует о ее ведущей роли в депонировании данного металла (табл. 1). Тем не менее ионы цинка проникают в надземные органы сеянцев и способны индуцировать развитие окислительного стресса.

С помощью гель-электрофореза в органах сеянцев сосны обыкновенной обнаружено несколько четко различимых изоформ СОД: три изоформы – в корневой системе и гипокотилях и четыре изоформы – в семядолях и хвое сеянцев. Им дана условная нумерация по возрастанию подвижности в акриламидном геле, т.е. наименее подвижная изоформа обозначена № 1, а наиболее подвижная – № 3 (в корневой системе и гипокотилях) и № 4 (в семядолях и хвое). Ингибиторным анализом (рис. 1) установлена их принадлежность к Cu/Zn-содержащим формам (Cu/Zn-СОД).

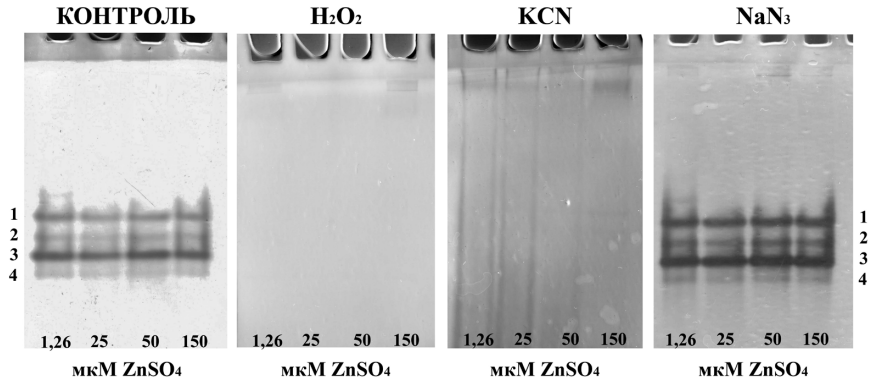

Рис. 1. Ингибиторный анализ изоферментов СОД (белковая фракция из хвои сеянцев)

Известно, что для сухих семян сосны обыкновенной характерно наличие четырех Cu/Zn-СОД, при этом легкомигрирующая в геле изоформа присутствует в очень малых количествах. Через 12 ч после начала насыщения водой прорастающие семена сосны характеризуются активностью СОД с таким же набором изоформ. Однако в течение последующих трех суток появляется новая слабомигрирующая изоформа СОД, которая исчезает к третьей неделе выращивания сеянцев. Так как данная изоформа не ингибируется цианидом калия и перекисью водорода, было сделано предположение о ее принадлежности к Mn-содержащим изоформам [1].

В наших экспериментах не обнаружено присутствия иных изоформ, кроме Cu/Zn-СОД (рис. 1, 2). В работе Wingsle с соавт. на хвое сосны обыкновенной 15-летнего возраста также было показано преобладание изоформ Cu/Zn-СОД, а активность Mn-содержащей изоформы оценивалась не более чем в 1–4% от общей активности СОД, что значительно затрудняло ее визуальную идентификацию [16]. На основании этого можно утверждать, что активность СОД в органах сеянцев сосны обыкновенной на раннем этапе онтогенеза обусловлена активностями Cu/Zn-СОД различной клеточной локализации. Подтверждением различий их клеточной локализации служит появление четвертой изоформы в ассимилирующих органах сеянцев (рис. 2), предположительно, хлоропластной локализации.

Ранее нами было показано, что наибольшей активностью СОД характеризуются ассимилирующие органы сеянцев [17]. Это также подтверждается результатами гель-электрофореза (рис. 2). Однако обнаруживаются значительные различия во вкладе активностей изоформ Cu/Zn-СОД в общую активность СОД в органах сеянцев. В частности, общая активность СОД в корневой системе в большей степени обусловлена изоформами № 1 и 3, в гипокотилях – № 1, в семядолях – № 3, а в хвое – № 3 и 1 (рис. 2).

Анализ активностей изоформ СОД в органах сеянцев, проведенный путем количественной оценки уровней сигнала соответствующих бэндов (табл. 2),

свидетельствует о дифференциальном характере их изменений при действии цинка в испытанных концентрациях. В то же время суммарная активность изоформ СОД во всех органах сеянцев оставалась практически неизменной.

Хроническое действие цинка в повышенных концентрациях приводило к более значительному изменению активности изоформы Cu/Zn-СОД № 2 в корневой системе сеянцев, по сравнению с изоформами № 1 и 3. Увеличиваясь в среднем на 28%, активность Cu/Zn-СОД № 2 достигала максимума при 50 мкМ $ZnSO_4$, по сравнению с контролем ($p = 0,05$; $t = 2,38$). Отметим, что активности изоформ № 1 и 3 в корневой системе сеянцев, вносящие основной вклад в общую активность СОД в данном органе (рис. 2), изменялись разнонаправленно. Активность изоформы № 1 в целом снижалась на 11%, а изоформы № 3 – увеличивалась на 17%. Максимальное увеличение активности изоформы № 3, по сравнению с контролем, регистрировалось при воздействии 150 мкМ $ZnSO_4$ ($p = 0,05$; $t = 2,55$) (табл. 2).

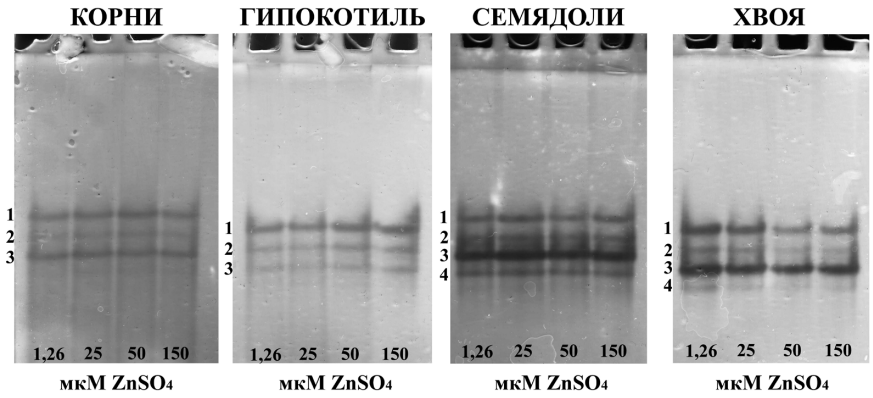

Рис. 2. Состав изоформ Cu/Zn-СОД в органах сеянцев сосны обыкновенной в условиях хронического действия цинка

В гипокотилях сеянцев наиболее выраженное изменение активности было характерно для изоформы № 3, которая увеличивалась, в среднем, на 42%. Для изоформы № 1, вносящей наибольший вклад в суммарную активность, было характерно снижение уровней сигнала бэндов на 20% при максимальной концентрации $ZnSO_4$ (табл. 2). Однако в связи с высокой вариабельностью активностей изоформ провести статистическую оценку их достоверности не представляется возможным ($p > 0,05$).

В ассимилирующих органах сеянцев, характеризующихся довольно стабильной общей активностью СОД при действии цинка [17], выявляется сложная регуляция активностей различных изоформ. В частности, в семядолях сеянцев активность изоформы № 4, предположительно хлоропластной локализации, возрастала при всех испытанных концентрациях $ZnSO_4$, в среднем, на 41% (табл. 2). Сопоставимое (на 26%) увеличение активности

было характерно и для изоформы № 3, вносящей основной вклад в общую активность СОД (рис. 2). При этом пик активности Cu/Zn-СОД № 3 регистрировался при воздействии максимальной концентрации $ZnSO_4$ ($p < 0,001$; $t = 35,22$). Для изоформ № 1 и 2 в семядолях сеянцев, напротив, была характерна тенденция к снижению активности в условиях воздействия ионов цинка. Активность изоформы № 1 снижалась, в среднем, на 11% ($p > 0,05$), а изоформы № 2 – на 21%. Наиболее достоверное снижение активности Cu/Zn-СОД № 2 происходило при 50 мкМ $ZnSO_4$ ($p = 0,05$; $t = 2,34$) (табл. 2).

Таблица 2

Активности изоформ Cu/Zn-супероксиддисмутаз в органах сеянцев сосны обыкновенной в условиях хронического действия ионов цинка, %

Орган сеянца	№ изоформы	$ZnSO_4$, мкМ			
		1,26	25	50	150
Корневая система	1	100	99,8 ± 9,8	85,0 ± 9,2	103,8 ± 10,7
	2	100	132,3 ± 20,4	135,0 ± 14,7	116,7 ± 16,2
	3	100	99,8 ± 12,9	113,8 ± 18,1	137,2 ± 14,6
	Σ 1–3	**100**	**104,5 ± 4,1**	**103,2 ± 6,4**	**113,0 ± 6,3**
Гипокотиль	1	100	121,5 ± 20,5	105,8 ± 18,6	80,7 ± 24,3
	2	100	111,8 ± 10,3	123,5 ± 7,6	116,8 ± 14,2
	3	100	93,3 ± 9,8	120,5 ± 33,5	156,0 ± 37,0
	Σ 1–3	**100**	**103,8 ± 9,5**	**100,7 ± 4,8**	**114,0 ± 8,8**
Семядоли	1	100	101,8 ± 3,1	78,8 ± 12,2	87,5 ± 13,1
	2	100	84,5 ± 13,8	77,5 ± 9,6	74,3 ± 29,2
	3	100	123,8 ± 14,0	122,0 ± 25,1	131,7 ± 0,9
	4	100	146,0 ± 30,0	146,5 ± 32,7	131,5 ± 23,6
	Σ 1–4	**100**	**101,5 ± 8,8**	**96,3 ± 11,5**	**110,0 ± 16,5**
Хвоя	1	100	98,4 ± 5,0	77,0 ± 8,9	85,0 ± 3,9
	2	100	83,7 ± 5,5	68,3 ± 6,0	83,6 ± 9,0
	3	100	110,6 ± 4,9	121,4 ± 4,1	127,0 ± 4,2
	4	100	66,1 ± 22,2	51,8 ± 12,5	83,9 ± 22,8
	Σ 1–4	**100**	**98,6 ± 4,1**	**93,3 ± 3,7**	**95,1 ± 5,1**

В отличие от других органов сеянцев, активности всех выявленных изоформ СОД характеризовались минимальной вариабельностью между сериями опыта, что позволило более четко оценить вклад индивидуальных изоформ в суммарную ферментативную активность. Отметим, что именно в хвое суммарная активность СОД практически не зависела от воздействия цинка в диапазоне концентраций до 150 мкМ [17]. Активность изоформы № 3, определяющей суммарную активность СОД в хвое, увеличивалась при всех испытанных концентрациях $ZnSO_4$: 25 ($p = 0,05$; $t = 2,18$), 50 ($p < 0,001$; $t = 5,22$) и 150 мкМ ($p < 0,001$; $t = 6,43$) (табл. 2), тогда как активности других изоформ СОД снижались. Значительное снижение активности было харак-

терно для изоформы № 4, в среднем на 33%, хотя минимальная ее активность отмечалась при 50 мкМ ($p = 0,01$; $t = 3,86$) (см. табл. 2). При воздействии 50 мкМ $ZnSO_4$ также регистрировались минимальные активности изоформ № 1 ($p = 0,05$; $t = 2,58$) и № 2 ($p < 0,001$; $t = 5,28$) (см. табл. 2).

Примечательно, что тенденции изменений активности изоформ № 4, локализованных, предположительно, в хлоропластах клеток, столь существенно различаются между семядолями и хвоей (см. табл. 2). Однако наблюдаемые изменения отчасти могут быть объяснены более высоким содержанием хлорофиллов *a* и *b* в семядолях сеянцев, по сравнению с хвоей [6].

В ряде исследований установлено, что хвоя сосен, произрастающих в зонах промышленного загрязнения, которая содержит повышенные концентрации ионов Cu, Pb, Zn, Ni и Cd, характеризуется более высокой активностью СОД, по сравнению с контрольной группой [18]. В то же время в исследованиях сеянцев и взрослых деревьев сосны обыкновенной, произрастающих при хроническом воздействии выбросов SO_2, не выявлено корреляции активности СОД со степенью воздействия промышленных выбросов [19]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что даже при относительно стабильной активности СОД в органах растений при действии повреждающих факторов среды активности различных изоформ СОД могут существенно различаться.

Заключение

Особенности накопления и транслокации ионов цинка в надземных органах сеянцев сосны обыкновенной позволяют отнести ее к типичным индикаторам данного металла, содержание которого увеличивается пропорционально его концентрации в среде выращивания. Однако на этом фоне не происходит существенных изменений общей активности супероксиддисмутаз в органах сеянцев, которая обусловливается активностью Cu/Zn-содержащих изоформ. Корневая система и гипокотили сеянцев характеризуются наличием трех, а семядоли и хвоя – четырех изоформ Cu/Zn-СОД различной клеточной локализации. Воздействие цинка в широком диапазоне концентраций не приводило к изменениям их изоферментного состава ни в одном из исследованных органов. В то же время поддержание общей активности СОД на стабильном уровне обеспечивалось регуляцией активностей индивидуальных изоформ Cu/Zn-СОД.

Литература

1. *Streller S., Kromer S., Wingsle G.* Isolation and purification of mitochondrial Mn-superoxide dismutase from the gymnosperm *Pinus sylvestris* L. // Plant Cell Physiol. 1994. Vol. 35. P. 859–867.
2. *Karpinska B., Karlsson M., Schinkel H. et al.* A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization // Plant Physiology. 2001. Vol. 126. P. 1668–1677.

3. *Karpinski S., Wingsle G., Olsson O., Hallgren J-E.* Characterization of cDNAs encoding CuZn-superoxide dismutases in Scots pine // Plant Molecular Biology. 1992. Vol. 18. P. 545–555.
4. *Бараненко В.В.* Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48, № 6. С. 465–475.
5. *Карташов А.В., Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В. и др.* Роль систем антиоксидантной защиты при адаптации дикорастущих видов растений к солевому стрессу // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 4. С. 516–522.
6. *Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов Вл.В.* Сосна обыкновенная как модельный объект для изучения механизмов адаптации хвойных к действию тяжелых металлов. 1. Изменение морфометрических и физиологических параметров при развитии сеянцев сосны в условиях хронического действия цинка // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 5. С. 728–736.
7. *Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов Вл.В.* Развитие сеянцев сосны обыкновенной и функционирование антиоксидантных систем в условиях хронического действия ионов свинца // Известия РАН. Сер. биол. 2013. № 1. С. 32–42.
8. *Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В.* Влияние длины светового дня на устойчивость сеянцев сосны обыкновенной к токсическому действию цинка // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. 2012. № 1(84). С. 99–104.
9. *Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов Вл.В.* Влияние минерального состава и pH питательной среды на устойчивость сосны обыкновенной к токсическому действию ионов цинка // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 2. С. 257–267.
10. *Радюкина Н.Л., Иванов Ю.В., Карташов А.В. и др.* Изучение индуцибельных и конститутивных механизмов устойчивости к солевому стрессу у гравилата городского // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 5. С. 692–698.
11. *Davis B.J.* Disc electrophoresis – II Method and application to human serum proteins // Annals of the New York Academy of Sciences. 1964. Vol. 121. P. 404–427.
12. *Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T. et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid // Anal. Biochem. 1985. Vol. 150. P. 76–85.
13. *Степанченко Н.С., Новикова Г.В., Мошков И.Е.* Количественное определение содержания белка // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 4. С. 624–630.
14. *Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E. et al.* Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C_3-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // Plant, Cell and Environment. 1998. Vol. 21. P. 169–179.
15. *Yamano S., Maruyama T.* An azide-insensitive superoxide dismutase from a hyperthermophilic Archaeon, *Sulfolobus solfataricus* // J. Biochem. 1999. Vol. 125. P. 186–193.
16. *Wingsle G., Gardestrom P., Hallgren J-E., Karpinski S.* Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles // Plant Physiology. 1991. Vol. 95. P. 21–28.
17. *Иванов Ю.В., Савочкин Ю.В., Кузнецов Вл.В.* Сосна обыкновенная как модельный объект для изучения механизмов адаптации хвойных к действию тяжелых металлов. 2. Функционирование антиоксидантных ферментов в сеянцах сосны в условиях хронического действия цинка // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 1. С. 57–66.
18. *Pukacka S., Pukacki P.M.* Seasonal changes in antioxidant level of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles exposed to industrial pollution. II. Enzymatic scavengers activities // Acta Physiologiae Plantarum. 2000. Vol. 22. P. 457–464.
19. *Polle A., Eiblmeier M., Rennenberg H.* Sulphate and antioxidants in needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from three SO_2-polluted field sites in eastern Germany // New Phytol. 1994. Vol. 127. P. 571–577.

Поступила в редакцию 12.12.2012 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 1 (22). P. 150–159
doi: 10.17223/19988591/22/12

Yury V. Ivanov, Yury V. Savochkin

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

ISOZYMES COMPOSITION OF SCOTS PINE SEEDLING'S (*Pinus sylverstris* L.) SUPEROXIDE DISMUTASE UNDER CHRONIC EFFECT OF ZINC

The particularities of the superoxide dismutase isozyme's composition in organs (root system, hypocotyl, cotyledons, needles) of six-week-old Scots pine seedlings, grown under chronic effect of zinc (25, 50 and 150 uM) were investigated. The strong correlation between the zinc content in the root system, hypocotyls, cotyledons and needles of seedlings with $ZnSO_4$ concentrations, makes it possible to include Scots pine into the typical zinc indicators, whose content increases in proportion to its concentration in the growth medium. The leading role in the deposition of zinc ions belongs to the seedling's root system, the metal content in which a next-higher order than in the aerial parts of the seedlings. However, despite the increase in the zinc content in the seedling organs, no significant changes in total superoxide dismutase activity was observed. A comparative analysis of superoxide dismutase's activities in the seedling's organs shows most of their activity in assimilating organs, as evidenced by the results of gel electrophoresis. The presence of three isoforms of superoxide dismutases in the root system and the hypocotyls of seedlings and four isoforms – In cotyledons and needles of the seedlings were revealed. The inhibition assays (KCN, H_2O_2, NaN_3) shows the affiliation of all identified superoxide dismutase's forms to the copper/zinc-containing forms (Cu/Zn-SOD) of different cellular localization. The significant differences in the contribution of Cu/Zn-SODs activities in total superoxide dismutase activity in the seedlings organs were found. In particular, the total superoxide dismutase activity in the root system, to a greater degree, caused by isoforms № 1 and 3, in the hypocotyls – № 1, in the cotyledons – № 3, and in the needles – № 3 and 1. The analysis of the superoxide dismutase's activities in the seedlings organs, quantified by signal level of the corresponded bands, shows differential nature of their changes under the zinc ions action. At the same time, the total activity of superoxide dismutase's isoforms in all seedlings organs remained virtually unchanged, and the effect of zinc in a wide range of concentrations did not lead to changes in their isozyme composition in any organs of Scots pine seedlings.

Key words: *Pinus sylvestris; zinc; superoxide dismutase; inhibition assay; Cu/Zn-SODs.*

Received Desember 12, 2012