

ВМІСТ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ Й АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ЇЇ МЕТАБОЛІЗМУ ЗА ДІЇ ІОНІВ НІКЕЛЮ У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ

В. Більчук, Г. Россихіна-Галича

*Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара, НДІ біології
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Досліджено вплив іонів нікелю на вміст аскорбінової кислоти, активність аскорбатоксидази і аскорбатпероксидази у клітинах фотосинтезуючих органів проростків кукурудзи гібрида Оржиця 237МВ. За короткочасної експозиції (24 год) рослин на розчинах металу спостерігали підвищення вмісту аскорбату й активності ферментів у листках проростків. Більш тривала експозиція (96 год) викликала подальше збільшення активності ферментів. У період післядії в усіх варіантах реєстрували зміни, що свідчили про здатність проростків відновити нормальне функціонування.

Ключові слова: кукурудза, аскорбатоксидаза, аскорбатпероксидаза, іони нікелю, післядія.

У теперішній час особливу увагу приділяють проблемі забруднення середовища важкими металами (ВМ), які, проникаючи крізь плазматичну мембрану живих клітин, викликають активізацію процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у рослинних організмах з утворенням активних форм кисню (АФК) [1, 2]. Для переривання каскадів неконтрольованого окиснення в усіх компартментах рослин функціонують антиоксиданти й антиоксидантні системи. Важливу роль в адаптації рослин до токсичної дії сполук важких металів відіграє аскорбінова кислота і ферменти її перетворення для підтримання про-/антиоксидантної рівноваги [5, 8]. Аскорбінова кислота (АК) є важливим низькомолекулярним антиоксидантом, однією з головних функцій якої є відновлення вільних радикалів і мінімізація порушення окисного стресу. Накопичення та перетворення АК відбувається за участі ферментів циклу аскорбату: аскорбатоксидази (КФ 1.10.3.3) і аскорбатпероксидази (КФ 1.11.1.11). Аскорбатоксидаза каталізує процес перетворення та відновлення аскорбінової кислоти, за участі аскорбатпероксидази відбувається нейтралізація пероксиду водню та інших активних форм кисню [6]. Відомості щодо впливу сполук ВМ на активність цих ферментів і накопичення аскорбінової кислоти неоднозначні. Так, дані Т. А. Демури показали, що сполуки кадмію викликали підвищення активності аскорбатпероксидази в коренях при короткочасній дії стресу й інгібування за його довготривалого впливу [1, 11]. В умовах аноксії, дефіциту азоту, холодного стресу, комплексної дії кадмію та нікелю в листках гороху, пшениці, кукурудзи активність ферменту значно підвищувалась [1, 4, 9]. У роботах показано варіювання вмісту кількості АК за умов окиснювального стресу різного походження [6].

Наскільки порушується функціонування всієї аскорбатзалежної системи за умов дії сполук нікелю, відомо недостатньо. Разом із цим, також не досліджені залежності змін у накопиченні АК й активності ферментів її циклу від концентрації металу і тривалості дії стрес-фактора на початковому (ювенільному) етапі розвитку. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження функціонування елементів аскорбатзалежної системи за умов дії нітрату нікелю різної концентрації у вегетативних органах проростків кукурудзи.

Матеріали та методи

Тест-об'єктом були проростки кукурудзи середньораннього простого модифікованого гібрида Оржиця 237МВ, який внесено в Державний реєстр сортів рослин України з 2010 р. Насіння кукурудзи вирощували протягом 3 діб у рулонах фільтрувального паперу на дистильованій воді. На четверту добу проростки висаджували на розчини нітрату нікелю в концентраціях 0,05; 0,5; 1,0 та 5,0 мМ і витримували на них упродовж 96 год. Контролем слугували проростки, які вирощувались на дистильованій воді. Усі виміри та спостереження проводили у листках рослин через 7, 12, 24 та 96 год після початку дії іонів металу і через 120 год після перенесення проростків на дистильовану воду.

Вміст аскорбінової кислоти оцінювали за [3]. Активність аскорбатоксидази оцінювали за швидкістю окиснення аскорбінової кислоти при дії ферментативного препарату методом йодометричного титрування згідно з [3]. Активність аскорбатпероксидази визначали за реакцією відновлення пероксиду водню аскорбатом Na згідно з [7, 10]. Статистичну обробку одержаних цифрових даних здійснювали за допомогою пакета Statistica 6,0; розбіжності між вибірками вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Аскорбінова кислота, володіючи окислювально-відновними властивостями, відіграє важливу роль у процесі росту й розвитку рослин. Дослідження вмісту аскорбінової кислоти в листках проростків кукурудзи при вирощуванні за дії нітрату нікелю показали достовірні зміни цього показника тільки через 24 год стресового впливу. Так, за дії низьких концентрацій металу (0,05–0,5 ммоль) накопичення АК у тканинах листків перевищувала контрольні значення в середньому на 16% (рис. 1). Використання в середовищі концентрацій нікелю 1 мг/л, що становить 15 ГДК, зумовлює збільшення накопичення антиоксиданта в 1,25 разу порівняно з контрольними зразками.

Одержані експериментальні дані дали підстави констатувати, що в умовах збільшення тривалості стресового впливу до 96 год спостерігали варіювання в накопиченні аскорбінової кислоти в листках проростків. Так, за хронічної дії нікелю в низьких концентраціях (0,05–0,5 ммоль) вміст АК перевищував контрольні значення в 1,2–1,5 разу, тоді як за концентрації 1 мг/л – в 1,6 разу. Разом із цим, при максимальній концентрації іонів нікелю 5 мг/л, що становила 73 ГДК, виявлено інгібування накопичення даного антиоксиданта з подовженням тривалості інтоксикації.

Припинення стресового впливу токсиканта і перенесення рослин на дистильовану воду показало, що після 5-ти діб у вегетативних органах спостерігали зниження рівня АК на 30–40% за попередньої дії нікелю в концентрації 0,5 і 1,0 ммоль, тоді як за низьких концентрацій – на 15%. У той же час в листках проростків, що зазнали дії токсиканта в концентрації 5,0 ммоль, вміст аскорбінової кислоти практично не змінювався і залишався на тому ж рівні, що і після 96-годинного стресу. Наведені вище факти дають змогу стверджувати, що нікель у концентрації 0,5–1,0 ммоль викликає незначні зміни в активізації ПОЛ, а це призводить до збільшення накопичення аскорбінової кислоти для забезпечення про-/антиоксидантної рівноваги, а процес відновлення метаболізму проходить за короткий термін. На відміну від цього, високі концентрації сполук нікелю призводять до значних змін в антиоксидантній системі, тому процес відновлення гальмується.

Відомо, що активація ПОЛ, викликана стресовими факторами різної природи, призводить до запуску механізмів захисту клітин, передусім до змін активності ферментів антиоксидантної системи, зокрема аскорбатоксидази й аскорбатпероксидази. Проведені дослідження активності аскорбатоксидази в листках проростків кукурудзи дали змогу встановити, що іони нікелю, починаючи з концентрації 0,05 ммоль, призводять до

зростання активності цього ферменту. Так, 24-годинна експозиція проростків на розчинах нітрату нікелю в концентрації від 0,5 до 1,0 ммоль зумовлювала підвищення активності аскорбатоксидази в 1,6–2,7 разу. За максимальної концентрації нікелю активність ферменту підвищувала контроль в 3,4 разу. За довготривалого (до 96 год) впливу ксенобіотика спостерігали підвищення активності ензиму в 1,7–2,3 разу щодо контролю (рис. 2).

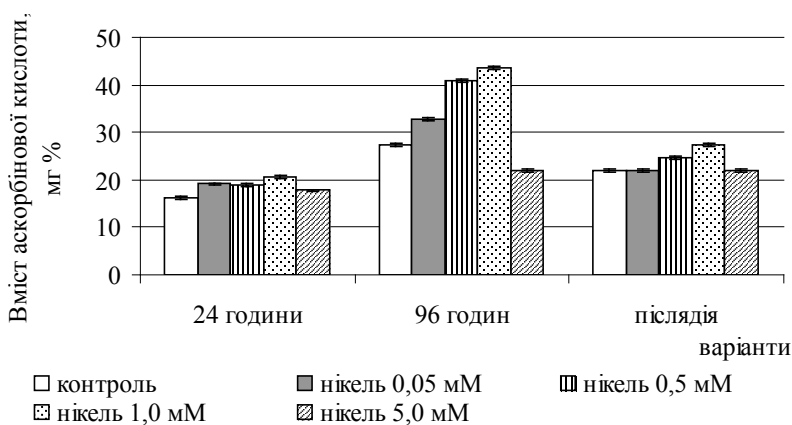


Рис. 1. Вміст аскорбінової кислоти в листках проростків кукурудзи за дії різних концентрацій іонів нікелю.

Аналіз даних модельних експериментів при переміщенні проростків кукурудзи в дистильовану воду, за 96-годинної дії сполук нікелю різної концентрації, показав загальну тенденцію зниження активності аскорбатоксидази у фотосинтезуючих органах контрольних і дослідних зразків. Слід зазначити, що у варіанті післядії високої концентрації токсиканта, зниження активності ферменту становило 30–38% щодо рівня на 96 год експозиції. Це узгоджується зі змінами вмісту аскорбінової кислоти у вегетативних органах при відновленні після зняття стрес-фактора.

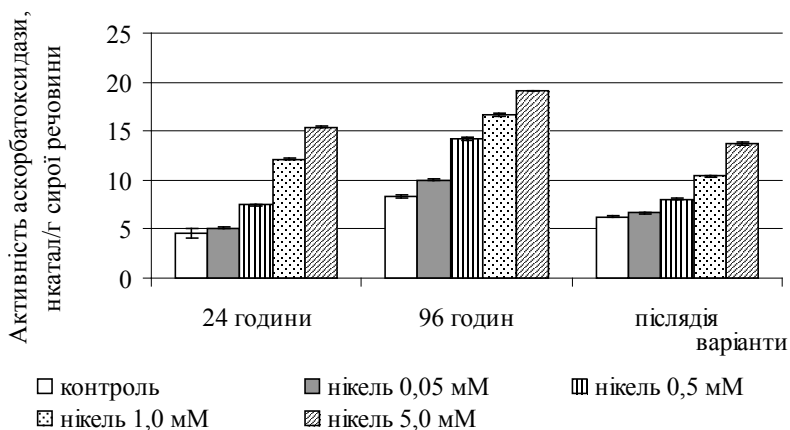


Рис. 2. Активність аскорбатоксидази в листках проростків кукурудзи за дії різних концентрацій іонів нікелю.

Оскільки в результаті реакції, яку каталізує аскорбатоксидаза, утворюється пероксид водню, то нейтралізація токсичної сполуки відбувається в реакціях за участю ензиму аскорбатпероксидази. Аскорбатпероксидазна реакція – це центральний процес

цілого циклу реакцій, спрямованого на видалення основної активної форми кисню (H_2O_2) у хлоропластах.

Аналіз даних модельних дослідів показав, що в листках кукурудзи через 24 год після початку дії сполук нікелю активність аскорбатпероксидази перевищувала контрольні значення в 1,2–1,4 рази залежно від концентрації іонів металу (рис. 3). Дані, представлені на рис. 3, дають підстави стверджувати, що після 96-годинної інтоксикації сполуками нікелю у варіантах за низької концентрації (0,05 мМ) в листках кукурудзи активність аскорбатпероксидази перевищувала контрольні показники на 23%. Поряд із цим, при підвищенні концентрації іонів нікелю в середовищі вирощування спостерігали інтенсифікацію активності зазначеного ферменту – майже в 1,3–1,5 рази щодо аналогічних варіантів на 24 год експозиції.

У листках проростків кукурудзи в період вивчення післядії нікелю активність аскорбатпероксидази наближалася до рівня значень при 24-годинній експозиції, що, можливо, обумовлене зниженням інтенсивності процесів пероксидного окислення.

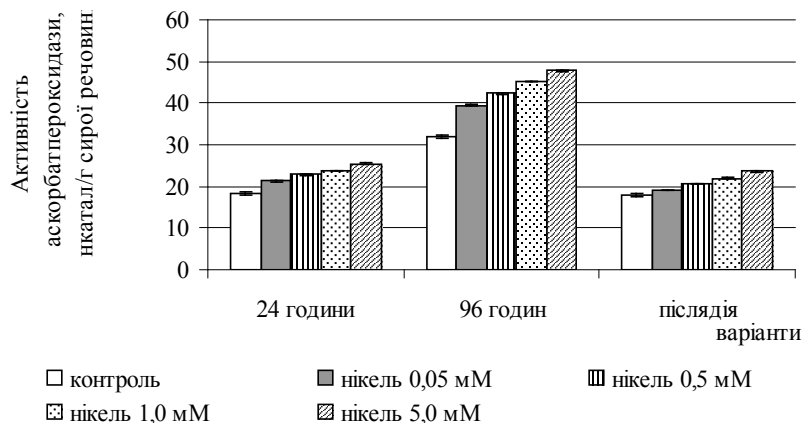


Рис. 3. Активність аскорбатпероксидази в листках проростків кукурудзи за дії різних концентрацій іонів нікелю.

Таким чином, сполуки нікелю на ранніх етапах онтогенезу призводять до порушення про-/антиоксидантної рівноваги у фотосинтезуючих органах, що проявляється в підвищенні вмісту аскорбінової кислоти й активності аскорбатоксидази і аскорбатпероксидази. У період післядії стресора в усіх варіантах реєстрували зниження накопичення АК й активності досліджуваних ферментів, що, ймовірно, пов'язано зі зменшенням вмісту активних форм кисню.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Демура Т. А., Гришко В. М. Зміни про-/антиоксидантної рівноваги у проростків кукурудзи за різного рівня накопичення кадмію та нікелю // Вісн. Харків. аграр. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 1 (13). С. 22–29.
2. Колупаєв Ю. С. Стресові реакції рослин. Харків: Харк. держ. аграрн. ун-т, 2001. 173 с.
3. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
4. Полесская О. Г., Каширская Е. И., Алехина Н. Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 5. С. 686–691.

5. Сауди-Сар С., Хавари-Неджад Р. А., Фахми Х. и др. Совместное влияние гибберелловой и аскорбиновой кислот на перекисное окисление липидов и активность антиокислительных ферментов в проростках сои при обработке никелем // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 1. С. 85–91.
6. Чупахина Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений: монография. Калининград: Калинингр. гос. ун-т, 1997. 120 с.
7. Aono M., Saji H., Fujiyama K. Decrease in Activity of Glutathione Reductase Enhances Paraquat Sensitivity in Transgenic *Nicotiana tabacum* // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 645–648.
8. Horemans N., Foyer C. H., Potters G. et al. Ascorbate function and associated transport systems in plants // Plant Physiol. Biochem. 2000. Vol. 38. P. 531–540.
9. Mittova V. O., Igamberdiev A. U. Operation of ascorbate-glutathione cycle in higher plants under the conditions of anoxia: Abstr. 11th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Varna, 7–11 Sept., 1998 // Bulg. J. Plant Physiol. 1998. Spec. Issue. P. 288.
10. Nakano Y., Asada K. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1981. Vol. 22. P. 867–880.
11. Schutzenhubel A., Schwanz P., Teichman T. et al. Cadmium-induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scotch pine roots // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 887–898.

Стаття: надійшла до редакції 31.08.12

доопрацьована 31.10.12

прийнята до друку 05.11.12

THE CONTENT OF ASCORBIC ACID AND ACTIVITY OF ENZYMES OF ITS METABOLISM AT ACTION OF NICKEL IONS IN MAIZE SEEDLINGS

V. Bilchuk, A. Rossihina-Galicha

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Research Institute of Biology
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

The influence of nickel ions on the content of ascorbic acid, ascorbatperoxidase and ascorbatoxidase activity in cells of photosynthesizing organs of maize seedlings of hybrid Orjitz 237 MV is studied. The increase of ascorbic acid and enzymes activity in leaves of seedlings was observed at short-term exposition (24 hour) of plants in solutions of metal. Longer exposition (96 hours) caused the further increase in activity of enzymes. During the period after action of xenobiotic in all variants registered the changes which testified to ability of seedlings to reduction normal functioning.

Keywords: maize, ascorbatperoxidase, ascorbatoxidase, nickel ions, after action.

**СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЕЕ МЕТАБОЛИЗМА
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ НИКЕЛЯ В ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ**

В. Більчук, Г. Россихина-Галича

*Днепропетровский национальный университет
имени Олеся Гончара, НИИ биологии
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

Исследовано влияние ионов никеля на содержание аскорбиновой кислоты, активность аскорбатоксидазы и аскорбатпероксидазы в клетках фотосинтезирующих органов проростков кукурузы гибрида Оржиця 237МВ. При кратковременной экспозиции (24 часа) растений на растворах металла наблюдали повышение содержания аскорбата и активности ферментов в листках проростков. Более длительная экспозиция (96 часов) вызывала последующее увеличение активности ферментов. В период последействия во всех вариантах регистрировали изменения, которые свидетельствовали о способности проростков возобновить нормальное функционирование.

Ключевые слова: кукуруза, аскорбатоксидаза, аскорбатпероксидаза, ионы никеля, последействие.