

УДК 581.1

**УЧАСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ТА ПЕРОКСИДАЗИ КЛІТИН
АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ І ЗОНИ РОЗТЯГНЕННЯ КОРЕНЯ КУКУРУДЗИ У
ПРОЦЕСІ АДАПТАЦІЇ ДО ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І ГІПЕРТЕРМІЇ**

В. Більчук, Г. Россихіна-Галича, Г. Коновалова

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

Досліджено особливості комплексного впливу іонів свинцю, нікелю та гіпертермії на активність супероксиддисмутази і пероксидази у клітинах апікальної меристеми та зони розтягнення коренів проростків кукурудзи різних за посухостійкістю ліній. За різних стресових умов спостерігали підвищення активності оксидоредуктаз у меристемах більшою мірою, ніж у зоні розтягнення. Встановлена різниця реакції рослин кукурудзи різних ліній на дію температури і ксенобіотиків. Показано, що передобробка проростків сполуками важких металів зумовлює підвищення термостійкості твірних тканин коренів.

Ключові слова: кукурудза, супероксиддисмутаза, пероксидаза, іони свинцю, іони нікелю, гіпертермія.

На теперішній час існування рослинних організмів ускладнюється у зв'язку з постійною дією на них різних несприятливих факторів. Особливу загрозу для рослин становить накопичення сполук важких металів та підвищення екстремальних температур навколишнього середовища. Захист рослинних організмів від пошкоджуючих зовнішніх факторів, які порушують клітинний гомеостаз, забезпечується низкою спеціальних клітинних систем. В основі пристосувальних реакцій лежать неспецифічні зміни стану мембранних систем рослини.

Системне дослідження механізмів адаптації рослин до стресової дії посухи та підвищених температур повітря набуває особливої актуальності у зв'язку з глобальними змінами клімату [6]. Зростає інтерес до вивчення різних наслідків дії високих концентрацій сполук важких металів у навколишньому середовищі на рослинні організми. Відомо, що за несприятливих умов, зокрема під впливом іонів нікелю [7], свинцю та кадмію [3–5], а також підвищеної температури [1, 6] відбувається посилене утворення активних форм кисню, активізація пероксидного окислення ліпідів, порушення балансу про- й антиоксидантів [18, 19], що призводить до перебудови метаболізму в клітинах і всього організму. Для перекивання каскадів неконтрольованого окислення у всіх компартиментах функціонують антиоксидантні системи.

Ключову роль у регулюванні окиснювально-відновного метаболізму в клітинах вищих рослин відіграють супероксиддисмутаза [К.Ф.1.15.1.1] (СОД) та пероксидаза [К.Ф.1.11.1.7] [1–5, 7, 10–12, 14, 17, 18]. Антиоксиданти захищають клітину від продуктів вільнорадикальних реакцій, підтримуючи тим самим прооксидантно-антиоксидантну рівновагу клітин. Стійкість організму до несприятливих умов обумовлена здатністю його до біохімічної й екологічної адаптації внаслідок активації систем репарації [8, 9].

Різні стресові фактори неоднозначно впливають на активність рослинних антиоксидантних ферментів [1, 4, 11, 12, 14, 21]. Наскільки порушується функціонування антиоксидантної системи у рослин, які мають різну стійкість до посухи, за умов дії стресових чинників, зокрема, комплексного впливу важких металів і гіпертермії, відомо недостатньо. Разом із цим, також не досліджені особливості дії несприятливих стресових факторів на твірні тканини коренів проростків. У зв'язку з викладеним метою нашої роботи було дослідити функціонування супероксиддисмутази та пероксидази за умов комплексної дії кадмію і нікелю та підвищеної температури на різні частини кореня проростків кукурудзи.

Матеріали та методи

Як тест-об'єкти були обрані репродуктивні органи рослин кукурудзи різних за посухостійкістю: стійкі – ДК517; нестійкі – АS3070. Насіння досліджуваних ліній три доби пророщували на розчинах свинцю та нікелю в концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М, а контрольні – на дистильованій воді. На четверту добу частину проростків піддавали дії високої температури 42°C упродовж 4 год, а іншу частину витримували при кімнатній температурі 25°C . Після цього проводили відбір досліджуваних зон коренів – апікальних меристем і зони розтягнення.

Активність супероксиддисмутази оцінювали за рівнем гальмування ферментом процесу відновлення нітросинього тетразолію у присутності NADH і феназинметасульфату згідно з [15]. Активність пероксидази визначали за швидкістю реакції окислення бензидину до утворення продукту окислення синього кольору згідно з [13]. Статистичну обробку одержаних цифрових даних здійснювали на 5%-ному рівні значущості за допомогою електронних таблиць "Microsoft Excel". На рисунках наведено середні значення показників, їхні стандартні похибки [16].

Результати і їхнє обговорення

Аналіз даних модельних експериментів показав, що апікальні меристеми коренів кукурудзи лінії ДК517 виявились більш чутливими до дії сполук Ni^{2+} , про що свідчить підвищення активності СОД в 1,5 разу на відміну від рівня ферменту в присутності іонів Pb^{2+} (рис. 1). За дії гіпертермії активність СОД підвищувалась в 1,4 разу щодо контрольних рослин. У результаті комбінованої дії термостресу й іонів свинцю реакція рекомбінації супероксид-радикалів активується зі збільшенням активності ензиму в 1,6 разу. Сполуки нікелю сумісно з підвищеною температурою сприяли зростанню активності СОД в 1,7 разу.

Виявлено, що рівень активності СОД клітин зони розтягнення кореневої системи нижчий, ніж у меристемах. При інкубації рослин у розчині, що містив сполуки Pb^{2+} в коренях проростків змінюється зона поглинання, і виведення іонів металу, по його довжині. Тому активність ферменту в зоні розтягнення відрізняється від даного показника в меристемах і перевищує контроль в 1,2 разу. Аналогічну залежність активності СОД у зоні розтягнення коренів спостерігали і в разі дії сполук нікелю, при цьому її значення в 1,4 разу більше порівняно з контрольними зразками. За дії високотемпературного стресу рівень активності ферменту перевищував контрольні зразки в 1,3 разу. Слід зазначити, що комплексний вплив гіпертермії та сполук свинцю сприяв підвищенню активності СОД в 1,5 разу. Дія підвищеної температури на фоні впливу солей нікелю викликала стимуляцію реакції дисмутації супероксид-іонів у зоні розтягнення в меншій мірі, ніж у меристемах, зі збільшенням активності ферменту в 1,5 разу щодо контролю. Така зміна активності СОД визначається ступенем поглинання іонів важких металів у різних частинах коренів і рівнем активних форм кисню в них (рис. 1).

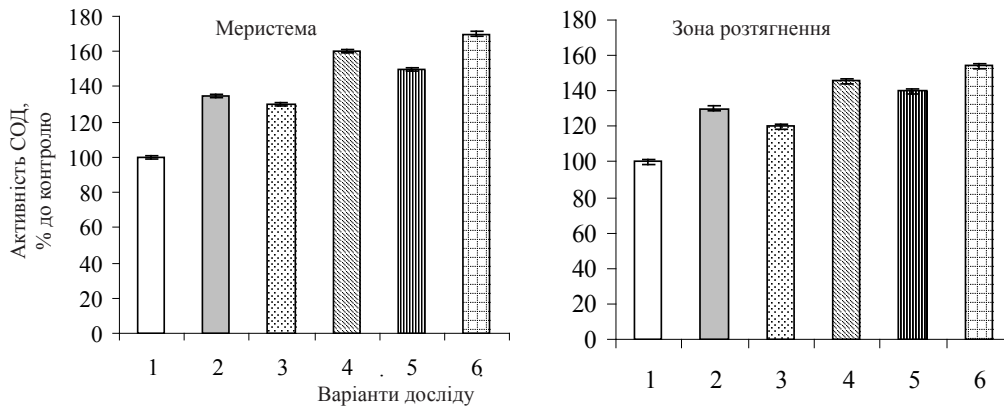


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази клітин різних зон кореневої системи проростків кукурудзи посухостійкої лінії ДК517 за дії окислювального стресу. Тут і на рис. 2–4: 1 – контроль; 2 – гіпертермія; 3 – Pb^{2+} ; 4 – Pb^{2+} + гіпертермія; 5 – Ni^{2+} ; 6 – Ni^{2+} + гіпертермія.

Активність супероксиддисмутази клітин меристеми контрольних рослин непосухостійкої лінії AS3070 становила 19,26 відн. од./г наважки і була в 1,3 разу нижчою порівняно з посухостійкою лінією ДК517. За дії іонів свинцю рівень ферментативної активності підвищувався в 1,5 разу (28,12 відн. од./г наважки), а нікелю – в 1,8 разу. Гіпертермія впродовж 4 год викликала достовірне зростання активності СОД в 1,8 разу щодо контролю, що свідчило про надмірну чутливість цієї лінії до високої температури. Накладання термостресу на попередню дію металевого ураження, спричиненого іонами свинцю, сприяло підвищенню активності супероксиддисмутази в 1,8 разу, тобто на рівні дії гіпертермії. У випадку попереднього впливу сполук нікелю з подальшою дією гіпертермії спостерігали зростання ферментативної активності у 2,2 разу, стосовно контролю, що перевищувало рівень активності за дії кожного стресора, але не відбувалася їх адитивна зміна (рис. 2).

Як свідчать експериментальні дані, зафіксовано подібні зміни ензиматичної активності у зоні розтягнення кореня непосухостійкої лінії кукурудзи за деякими відмінностями. Так, за впливу іонів Pb^{2+} спостерігали стимулювання супероксиддисмутази активності щодо контрольних зразків в 1,2 разу, а дія сполук Ni^{2+} викликала підвищення цього рівня до 1,5 разу. У варіанті з дією гіпертермії цей параметр становив 23,79 відн. од./г наважки і був вищим за контроль в 1,6 разу. Суттєвіше підвищення активності СОД (майже на 40%), реєстрували у разі комбінованого впливу температури та дії кожного з металів (рис. 2).

Отримані результати дають підстави стверджувати, що сумісна дія стресорів суттєво зміщує про-/антиоксидантну рівновагу як у меристемах, так і у зонах розтягнення коренів, викликаючи активізацію накопичення активних форм кисню.

Пероксидаза кореневої системи проростків кукурудзи також виявилася чутливою до дії стресорів. Інкубація рослин у середовищі іонів свинцю протягом 4 діб сприяла достовірному зростанню рівня пероксидазної активності клітин апікальної меристеми кореня посухостійкої лінії ДК517 в 1,3 разу щодо контролю. За дії іонів нікелю рівень активності ферменту перевищував контроль в 1,5 разу (53,50 відн. од./г наважки • хв). Інкубація проростків в умовах жорсткого теплового стресу впродовж 4 годин призводила до зростання активності ферменту в 1,5 разу (55,91 відн. од./г наважки • хв) порівняно з контрольними рослинами, які інкубували за кімнатної температури (рис. 3). Комбінування

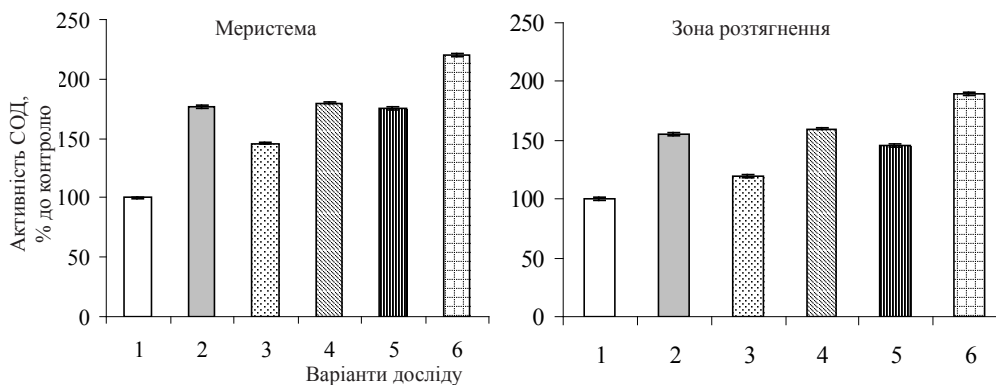


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази клітин різних зон кореневої системи проростків кукурудзи непосухоустійкої лінії AS3070 за дії окислювального стресу.

послідовного впливу іонів металів і високої температури викликало підвищення пероксидазного рівня в 1,6 разу за дії свинцю та в 1,7 разу в умовах передобробки нікелем.

Аналогічні зміни пероксидазної активності зафіксовано в клітинах зони розтягнення кореня. Достовірне збільшення активності ферменту в 1,2 та 1,35 разу зареєстровано за індивідуальної дії свинцю та нікелю. Гіпертермія стимулювала ферментативну активність в 1,4 разу (35,95 відн. од./г наважки • хв.). За впливу комбінації стресових чинників цей показник перевищував контрольні зразки в середньому на 20%.

Для рослин непосухоустійкої лінії AS3070 зареєстровано більш високі абсолютні значення пероксидазної активності порівняно зі стійкою лінією ДК517 (рис. 4). У контрольному варіанті активність пероксидази клітин меристеми становила 24,7 відн. од./г наважки • хв. Іони металів Pb^{2+} та Ni^{2+} сприяли статистично достовірному зростанню активності ферменту відповідно в 1,4 (35,1 відн. од./г наважки • хв) та 1,6 (38,5 відн. од./г наважки • хв) разу щодо контрольних рослин. Максимальну активність ензиму фіксували у варіанті комбінування температури та свинцю, яка становила 44,5 відн. од./г наважки • хв, що перевищувало контроль в 1,8 разу. За дії нікелю в умовах комбінованого впливу факторів активність становила 56,9 відн. од./г наважки • хв, що перевищувало контроль у 2,3 разу.

Аналогічні тенденції відзначено у зміні ферментативного рівня клітин зони розтягнення коренів. Для варіанта впливу іонів Pb^{2+} досліджуваний показник виявився збільшеним в 1,3 разу (23 відн. од./г наважки • хв), варіанта впливу Ni^{2+} – в 1,5 разу (25,3 відн. од./г наважки • хв). Витримування рослин за 42°C стимулювало ріст активності ферменту в 1,5 разу (26,7 відн. од./г наважки • хв) щодо контролю (17,4 відн. од./г наважки • хв). Найбільш суттєве достовірне зростання пероксидазної активності відзначено за сумісної дії важких металів і гіпертермії в 1,6 разу – свинець (27,4 відн. од./г наважки • хв), в 1,7 разу – у разі передобробки нікелем (28,7 відн. од./г наважки • хв).

Таким чином, у наших експериментах іони важких металів і гіпертермія викликали одночасне підвищення активності СОД і пероксидази, які можуть працювати як спряжена ферментативна система. Вірогідно, що окисний стрес, викликаний дією токсикантів, слугував сигналом для активації експресії генів антиоксидантних ферментів. Передобробка проростків сполуками металів приводила до підвищення термостійкості коренів, що пов'язано з індукуванням ними адаптивних реакцій, що узгоджується з даними інших авторів [11].

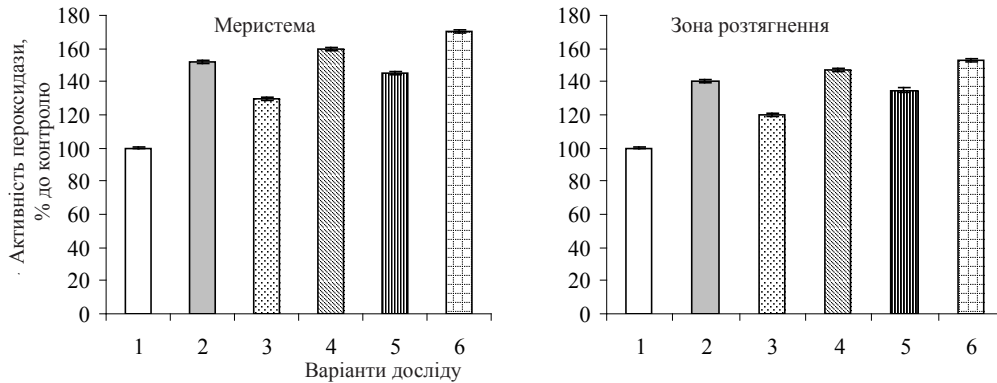


Рис. 3. Активність пероксидази клітин різних зон кореневої системи проростків кукурудзи посухостійкої лінії ДК517 за дії окислювального стресу.

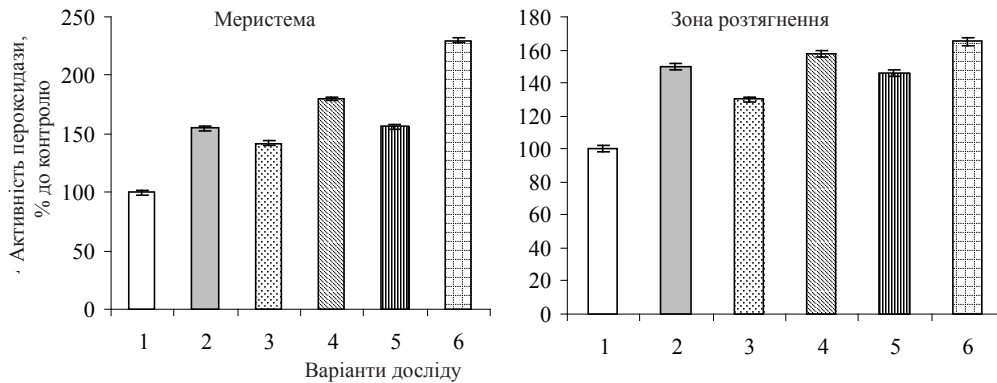


Рис. 4. Активність пероксидази клітин різних зон кореневої системи проростків кукурудзи посухостійкої лінії AS3070 за дії окислювального стресу.

Виявлено, що характер реакції антиоксидантної системи апікальних меристем і зони розтягнення коренів проростків кукурудзи на рівні її ключової ланки – ферменту СОД залежала від виду стресу, його напруженості й визначалась генотипом. Моно- та комбінований стреси суттєво активували супероксиддисмутазу у лінії ДК 517 та AS 3070. При цьому комплексна дія гіпертермії та важких металів (свинцю і нікелю) спричинювала більший окислювальний стрес, ніж кожен чинник окремо. У нестійкої лінії AS3070 гіпертермія викликала більше підвищення активності СОД, ніж ксенобіотики. Це підтверджує її нестійкість.

Зафіксовані нами особливості динаміки пероксидазної активності у клітинах апікальних меристем і зоні розтягнення коренів ліній свідчать про наявність у їхніх клітинах надмірної концентрації субстрату ферменту – пероксиду водню, який є результатом індукції СОД у стресових умовах.

Зареєстровані особливості активації СОД і пероксидази у різних за стійкістю ліній за впливу окислювального стресу різної природи свідчать про різний рівень антиоксидантного захисту в них і спроможність рослинних організмів ефективно знешкоджувати активні форми кисню.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Артюхов В. Г., Башарина О. В., Искусных А. Ю.* Структура и функциональные свойства пероксидазы хрена при температурном воздействии // Укр. біохім. журн. 2003. Т. 75. № 3. С. 45–49.
2. *Бараненко В. В.* Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
3. *Більчук В. С., Паталах І. І., Ткачева В. А., Вінниченко О. М.* Вплив кадмію та свинцю та активність пероксидази проростків кукурудзи // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. біол., екол. 1999. Вип. 6. С. 80–86.
4. *Богуславская Л. В.* Влияние ионов свинца и кадмия на изоферментный спектр пероксидазы из апикальной меристемы корня кукурузы // Біологічні дослідження молодих вчених в Україні: матеріали II Всеукр. конф. студентів та аспірантів (23–25 квітня, 2002 р.). К., 2002. С. 7–8.
5. *Воробець Н. М.* Пероксидазна активність коренів соняшника за дії іонів свинцю та селену // Наук. записки Тернопіль. пед. ун-ту. Сер. біол. 2002. № 3 (18). С. 148–153.
6. *Григорюк І. П., Михальський М. Ф., Серга О. І.* Біоенергетичні аспекти стійкості рослин до посухи // Физиология и биохимия культ. растений. 2003. Т. 35. № 6. С. 494–502.
7. *Гришко В. М., Демура Т. А.* Інтенсивність акумуляції кадмію і нікелю та рівень їх фітотоксичності за сумісної дії на проростки кукурудзи // Доп. НАН України. 2008. № 5. С. 161–167.
8. *Гродзинский Д. М.* Надежность растительных систем. К.: Наук. думка, 1983. 368 с.
9. *Духовский П., Юкнис З., Бразайтите А.* Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессоров // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 165–173.
10. *Ишеева О. Д.* Ферменты первичной защиты от окислительного стресса у вакуолей клеток растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2010. 20 с.
11. *Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В.* Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010. 352 с.
12. *Куриленко І. М., Паладіна Т. О.* Вплив сольового стресу і синтетичних регуляторів росту на активність каталази та пероксидази у проростках кукурудзи // Укр. біохім. журн. 2005. Т. 77. № 6. С. 86–93.
13. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова, 3-е изд. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
14. *Нижник Т. П., Григорюк І. П.* Вплив івіну і потейтину на пероксидне окислення ліпідів, проникність мембран, активність антиоксидантних ферментів та продуктивність сортів картоплі в умовах посухи // Физиология и биохимия культ. растений. 2006. Т. 38. № 3. С. 248–254.
15. *Перслегина И. А.* Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лабораторное дело. 1989. № 11. С. 20–23.
16. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1973. 320 с.
17. *Россихіна Г. С.* Стан антиоксидантної ферментативної системи рослин кукурудзи за дії ґрунтових гербіцидів і посухи // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2010. Вип. 53. С. 181–187.
18. *Стороженко В. О.* Ключові антиоксидантні ферменти фотосинтетичного апарату вищих рослин за дії стресових чинників // Физиология та біохімія культ. рослин. 2004. Т. 36. № 1. С. 36–42.
19. *Трач В. В., Стороженко В. А.* Супероксиддисмутаза как компонент антиоксидантной системы растений при абиотических стрессовых воздействиях // Физиология и биохимия культ. растений. 2007. Т. 39. № 4. С. 291–302.

20. Шматько І. Г., Каблучко О. І. Вплив обезводнення на стеблові меристематичні тканини пшениці // Укр. ботан. журн. 1980. Т. 37. № 6. С. 55–62.
21. Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації сільськогосподарських рослин до комплексної дії абіотичних факторів середовища: монографія / О.М. Вінниченко, В.С. Більчук, І.О. Філонік та ін. Дніпропетровськ: Нова ідеологія, 2011. 224 с.

Стаття: надійшла до редакції 30.03.12

прийнята до друку 18.05.12

**SUPEROXIDDISMUTASE AND PEROXIDASE PARTICIPATION IN CELLS
OF APICAL MERISTEM AND ZONE OF A STRETCHING OF A ROOT OF MAIZE
IN THE PROCESS OF ADAPTATION TO ACTION OF HEAVY METALS
AND HYPERTERMIA**

V. Bilchuk, G. Rossikhina-Galycha, G. Konovalova

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

It is investigated features of complex influence of lead, nickel ions and hyperthermia on activity of superoxiddismutase and peroxidase in cells of apical meristem and zone of a stretching of sprout roots of maize lines different in drought resistance. Under various stressful conditions observed activity increase of oxidoreductases in meristems in greater degrees, than a stretching zone. Distinctions in responses of different lines of maize to action of temperature and xenobiotics are established. It is shown, that preprocessing of sprouts by compounds of heavy metals causes increase of heat stability of meristem tissues of roots.

Keywords: maize, superoxiddismutase, peroxidase, ions of lead, ions of nickel, hyperthermia.

**УЧАСТИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ
КЛЕТОК АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ И ЗОНЫ РАСТЯЖЕНИЯ КОРНЯ
КУКУРУЗЫ В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К ДЕЙСТВИЮ
ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ГИПЕРТЕРМИИ**

В. Бильчук, А. Россихина-Галычая, А. Коновалова

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

Исследованы особенности комплексного влияния ионов свинца, никеля и гипертермии на активность супероксиддисмутазы и пероксидазы в клетках апикальной меристемы и зоны растяжения корней проростков кукурузы разных по засухоустойчивости линий. При различных стрессовых условиях наблюдали повышение активности оксидоредуктаз в меристемах в большей степени, чем в зоне растяжения. Установлено отличие реакции растений кукурузы разных линий на действие температуры и ксенобиотиков. Показано, что передобработка проростков соединениями тяжелых металлов обуславливает повышение термостойкости образовательных тканей корня.

Ключевые слова: кукуруза, супероксиддисмутата, пероксидаза, ионы свинца, ионы никеля, гипертермия.