

ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЛУТАТІОНОВОГО ЦИКЛУ В АПІКАЛЬНІЙ МЕРИСТЕМІ ТА ЗОНІ РОСТУ КОРЕНІВ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ І ВИСОКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

Н. Хромих

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна
e-mail: Khromykh58@rambler.ru*

У модельному експерименті за дії іонів кадмію та гіпертермії було виявлено специфічність активації глутатіон-залежних ферментів і накопичення пулу відновленого глутатіону в апікальній меристемі та зоні росту коренів проростків кукурудзи (*Zea mays* L.). Зроблено припущення про функціонування незалежних механізмів регуляції метаболічного циклу глутатіону в клітинах різних зон коренів проростків кукурудзи за дії абіотичних чинників.

Ключові слова: *Zea mays* L., апікальна меристема, зона росту, відновлений глутатіон, глутатіон-залежні ферменти, кадмій, гіпертермія.

Онтогенетичний розвиток рослинних організмів за умов впливу чинників середовища, які спричинюють окислювальний стрес, обумовлений здатністю рослин до відновлення клітинного гомеостазу, у тому числі за рахунок тіолових сполук [7, 11]. Забезпеченість клітин відновленим глутатіоном набуває особливого значення за дії важких металів, що ушкоджує клітинні мембрани та порушує їхній редокс-статус [17]. Показано, що саме комплексоутворення з цитозольним глутатіоном та ізоляція кадмію у вакуолях є суттєвим механізмом акумуляції важкого металу в клітинах [16]. Виявлено, що постембріональний ріст коренів рослин визначається проліферативною активністю кореневої апікальної меристеми, стан якої опосередковано регулюється антиоксидантними ферментами, у тому числі глутатіон-залежними [4, 6]. Відомо, що процеси росту коренів надто чутливі до впливу іонів кадмію [3], які мають високу спорідненість до тіолових груп відновленого глутатіону [5], однак реакція циклу глутатіону на дію кадмію у клітинах апікальної меристеми залишається малодослідженою.

Ми мали на меті встановити закономірності функціонування метаболічного циклу глутатіону за дії іонів кадмію та гіпертермії у різних зонах коренів проростків кукурудзи.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були апекси та зона росту коренів проростків кукурудзи гібриду Белозерський 295 СВ, які піддавали дії чинників за такою схемою: I варіант – 0,1 мМ розчин $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, 26°C протягом доби; II варіант – дистильована вода, 42°C протягом 3 год; III варіант – 0,1 мМ розчин $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, 42°C протягом 3 год. Контрольні проростки перебували на дистильованій воді при 26°C. Екстракти з обох видів тканин отримували в 0,1 М К-На-фосфатному буфері та центрифугували 20 хв при 16 000 об./хв. У супернатанті визначали активність глутатіон-S-трансферази (GST, EC 2.5.1.18), глутатіон-пероксидази (GPX, EC 1.11.1.9), глутатіон-редуктази (GR, EC 1.6.4.2) за [1] і виражали у нкатал/г сирій ваги рослинної тканини. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали спектрофотометричним методом за реакцією з реактивом Елмана згідно з [2] та виражали у нМоль/г сирій ваги. Статистичну обробку проведено за програмою Microsoft Statistica 6.0.

Результати і їхнє обговорення

Установлено, що у клітинах зони росту вміст GSH знижувався в усіх варіантах експерименту (на 29-46 % відносно контролю), тоді як в апікальній меристемі його вміст зростає, найбільше (на 31,4 % до контролю) – за дії іонів кадмію (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст відновленого глутатіону (нМоль/г сирої ваги) у зонах коренів проростків кукурудзи за дії іонів кадмію та гіпертермії

Варіант досліджу	Апікальна меристема коренів		Зона росту коренів	
	Вміст GSH	p	Вміст GSH	p
H ₂ O, 26°C (контроль)	80,629±1,803	–	268,813±1,563	–
Cd ²⁺ , 26°C	105,939±1,872	0,008	186,078±2,555	0,020
H ₂ O, 42°C	95,104±1,824	0,057	190,906±3,376	0,010
Cd ²⁺ , 42°C	82,443±1,399	0,617	144,027±3,740	0,030

Примітка. Розбіжності між вибірками достовірні при $p < 0,05$.

Зростання пулу GSH у меристемі могло бути обумовлене процесом відновлення окисленого глутатіону, також посиленням біосинтезу відновленого глутатіону, як це було показано за дії кадмію на рослини *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera [7] та *Ceratophyllum demersum* L. [10]. Динаміка вмісту GSH у клітинах апікальної меристеми та зони росту коренів проростків вказує на різноспрямовані зміни його редокс-потенціалу, який, як відомо, визначає відновлювальну здатність тілової сполуки [9].

За дії іонів кадмію активність GST збільшувалась у меристемі на 24% до контролю, тоді як у зоні росту знижувалась на 12% (табл. 2). Суттєве зростання активності GR у меристемі (на 68% до контролю) відзначено на фоні незначного росту показника в зоні росту коренів (табл. 3). Активність GPX у клітинах меристеми дещо перевищувала контрольне значення, а в клітинах зони росту знижувалась на 29% порівняно з контролем (табл. 4).

Можна припустити, що в меристемі коренів під впливом іонів кадмію активувались такі процеси: каталізована GST детоксикація важкого металу шляхом кон'югації з GSH, властива рослинним клітинам [8], а також забезпечене функціонуванням GR відновлення окисленого глутатіону. Активація меристемної GPX за дії кадмію була менш значною, ніж відмічено в апексах коренів гороху за концентрації кадмію 5 мМ [12] та коренів ячменю [6], що вказує на видову та концентраційну залежність рівня активації ферменту.

У зоні росту коренів вплив іонів кадмію спричинив зменшення активності GST і GPX щодо контролю (на 16,7 і 28,9% відповідно), при цьому активність GR недостовірно (на 4,7%) перевищувала контрольне значення. Імовірно, зменшення активності глутатіон-залежних ферментів і зниження вмісту GSH могло бути наслідком переключення шляхів метаболізму на синтез фітохелатинів. Саме з витратами на синтез фітохелатинів за дії кадмію пов'язують різке зниження рівня GSH у цільних коренях кукурудзи [14], *Sedum alfredii* Hance [13], деяких культурних дводольних рослин [15].

Таблиця 2

Активність глутатіон-S-трансферази (нкатал/г сирої ваги) у зонах коренів проростків кукурудзи за дії іонів кадмію та гіпертермії

Варіант досліджу	Апікальна меристема коренів		Зона росту коренів	
	Активність GST	p	Активність GST	p
H ₂ O, 26°C (контроль)	4,643±0,046	–	4,210±0,021	–
Cd ²⁺ , 26°C	5,700±0,072	0,006	3,679±0,128	0,036
H ₂ O, 42°C	4,610±0,070	0,686	6,950±0,233	0,008
Cd ²⁺ , 42°C	3,500±0,139	0,013	9,260±0,575	0,014

Примітка. Розбіжності між вибірками достовірні при $p < 0,05$.

Таблиця 3

Активність глутатіон-редуктази (нкатал/г сирої ваги) у зонах коренів проростків кукурудзи за дії іонів кадмію та гіпертермії

Варіант досліджу	Апікальна меристема коренів		Зона росту коренів	
	Активність GR	p	Активність GR	p
H ₂ O, 26°C (контроль)	15,820±0,319	–	17,127±1,029	–
Cd ²⁺ , 26°C	25,740±0,103	0,034	17,920±0,119	0,376
H ₂ O, 42°C	35,193±0,441	0,001	9,398±0,802	0,011
Cd ²⁺ , 42°C	20,160±0,718	0,014	11,155±0,760	0,040

Примітка. Розбіжності між вибірками достовірні при $p < 0,05$.

Таблиця 4

Активність глутатіон-пероксидази (нкатал/г сирої ваги) у зонах коренів проростків кукурудзи за дії іонів кадмію та гіпертермії

Варіант досліджу	Апікальна меристема коренів		Зона росту коренів	
	Активність GPX	p	Активність GPX	p
H ₂ O, 26°C (контроль)	9,197±0,210	–	11,437±0,489	–
Cd ²⁺ , 26°C	9,663±0,032	0,184	8,100±0,115	0,012
H ₂ O, 42°C	15,387±0,115	0,002	16,250±0,437	0,034
Cd ²⁺ , 42°C	14,633±0,479	0,003	10,097±0,261	0,031

Примітка. Розбіжності між вибірками достовірні при $p < 0,05$.

За дії високої температури активність GST не змінювалась у меристемі, проте збільшувалась у зоні росту на 64% до контролю (табл. 2). Активність GR у меристемі зростала на 123%, тоді як у зоні росту – знижувалась на 45% щодо контролю (табл. 3). Активність GPX зростала в обох типах клітин: на 67% у меристемі та на 39% у зоні росту (табл. 4). Тобто, на фоні гіпертермії у меристемі більш значним чином були активовані процеси за участю GPX, яка каталізувала відновлення органічних пероксидів. У зоні росту ліквідація наслідків окислювального стресу відбувалася за участю GPX і GST, оскільки останній фермент, як відомо, має також і глутатіон-пероксидазну активність [8].

За умов сумісної дії іонів кадмію та високої температури активність GST у меристемі зменшувалась на 24%, тоді як у зоні росту зростала на 119% (табл. 2). Відновлювальна активність GR посилювалась у меристемі (на 27% від контролю) на фоні її зниження на 35% у зоні росту (табл. 3). Активність GPX зростала у клітинах меристеми на 59%, а в зоні росту знижувалась на 11% щодо контролю (табл. 4). Тобто за сумісної дії чинників у клітинах меристеми активність GST пригнічувалась, натомість активувувались процеси за участю GPX, що вказує на перебудову у процесах синтезу молекулярних форм ензимів та узгоджується з результатами активації вказаних ферментів у коренях ячменю за дії абіотичних чинників [6].

Таким чином, особливість реакції глутатіонового циклу клітин меристеми на вплив чинників полягала у підтриманні високого вмісту відновленого глутатіону, активному відновленні окисленого глутатіону, послабленні процесу знешкодження іонів кадмію за умов гіпертермії, на відміну від посилення процесів детоксикації органічних пероксидів за дії гіпертермії та за сумісного впливу чинників. У клітинах зони росту було встановлено зниження вмісту відновленого глутатіону за всіх варіантів впливу чинників при низькій активності відновлення глутатіону, посилення процесів знешкодження іонів кадмію за умов гіпертермії та детоксикації органічних пероксидів за її окремої дії. До загальних реакцій метаболічного циклу глутатіону слід віднести стимуляцію процесів знешкодження органічних пероксидів високою температурою у клітинах обох типів. Можна припустити,

що встановлені закономірності обумовлені функціонуванням у клітинах апікальної меристеми та зони росту коренів незалежних механізмів регуляції циклу глутатіону.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гришко В. Н., Сыщиков Д.В. Peroxidное окисление липидов и функционирование некоторых антиокислительных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении фтористым водородом // Укр. биохим. журн. 1999. Т. 71. № 3. С. 51–57.
2. Некрасова Г. Ф., Киселева И. С. Руководство к лабораторным и практическим занятиям: Экологическая физиология растений. Екатеринбург: Уральский гос. ун-т им. А. М. Горького, 2008. 157 с.
3. Серегин И. В., Иванов И.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 4. С. 606–630.
4. De Tullio, M.C., Jiang K., Felbman L. Redox regulation of root apical meristem organization: Connecting root development // Plant Phys. and Biochem. 2010. Vol. 48. Is. 5. P. 328–336.
5. Gratao P. L., Polle A., Lea P. J. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier // Funct. Plant Biol. 2005. Vol. 32. P. 481–494.
6. Haluskova L., Valentovicova K., Huttova J. et al. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips // Plant Physiol. and Biochem. 2009. Vol. 47. Is. 11–12. P. 1069–1074.
7. Marquez-Garsia B., Horemans N., Cuypers A. et al. Antioxidants in *Erica andevalensis*: A comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions // Plant Physiol. and Biochem. 2011. Vol. 49. Is. 1. P. 110–115.
8. Marrs K. A. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants // Annual Rev. Plant Physiol. and Plant Molecular Biol. 1996. Vol. 47. P. 127–158.
9. Meyer A. J. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling // J. Plant Phys. 2008. Vol. 165. Is.13. P. 1390–1403.
10. Mishra S., Tripathi R. D., Srivastava S. et al. Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. // Bioresource technology. 2009. Vol. 100. Is. 7. P. 2155–2161.
11. Potters G., Horemans N., Jansen M. A. K. The cellular redox state in plant stress biology – A charging concept // Plant Phys. and Biochem. 2010. Vol. 48. Is. 5. P. 292–300.
12. Smiri M., Chaoui A., Rouhier N. et al. Redox regulation of the glutathione reductase/isoglutaredoxin system in germinating pea seed exposed to cadmium // Plant Sci. 2010. Vol. 179. Is. 5. P. 423–436.
13. Sun Q., Ye Z.H., Wang X.R. et al. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* // J. Plant Phys. 2007. Vol. 164. Is. 11. P. 1489–1498.
14. Tukendorf A., Rauser W. E. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium // Plant Sci. 1990. Vol. 70. Is. 2. P. 155–166.
15. Vazquez S., Goldsbruogh P., Carpena R. O. Comparative analysis of the contribution of phytochelatins to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin // Plant. Phys. and Biochem. 2009. Vol. 47. Is. 1. P. 63–67.
16. Vogeli-Langel R., George W. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedling // Plant Sci. 1996. Vol. 114. Is. 1. P. 11–18.

17. *Yadava S. K.* Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants // *South African J. Bot.* 2010. Vol. 76. Is. 2. P. 167–179.

Стаття: надійшла до редакції 30.03.12

доопрацьована 23.04.12

прийнята до друку 27.04.12

FUNCTIONING OF GLUTATHIONE CYCLE IN APICAL MERISTEM AND GROWTH ZONE IN ROOTS OF MAIZE SEEDLINGS UNDER CADMIUM AND HIGHER TEMPERATURE ACTION

N. Khromykh

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine
e-mail: Khromykh58@rambler.ru*

In modeling experiment the specificity of glutathione-dependent enzymes activation and reduced glutathione pool enhancing in apical meristem and growth zone of roots of maize (*Zea mays* L.) seedlings under cadmium and higher temperature action was found. The functioning of independent modes for regulation of metabolic glutathione cycle in cells from different zones of seedlings roots under abiotic stressors action was discussed.

Keywords: *Zea mays* L., apical meristem, growth zone, reduced glutathione, glutathione-dependent enzymes, cadmium, higher temperature.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЕ И ЗОНЕ РОСТА КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ КАДМИЯ И ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР

Н. Хромых

*Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина
e-mail: Khromykh58@rambler.ru*

В модельном эксперименте при действии ионов кадмия и гипертермии была выявлена специфичность активации глутатион-зависимых ферментов и накопления пула восстановленного глутатиона в апикальной меристеме и зоне роста корней проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Сделано предположение о функционировании независимых механизмов регуляции метаболического цикла глутатиона в клетках разных зон корней проростков кукурузы при действии абиотических факторов.

Ключевые слова: *Zea mays* L., апикальная меристема, зона роста, восстановленный глутатион, глутатион-зависимые ферменты, кадмий, гипертермия.