

УДК 577.12+581.57

СТАН ГЛУТАТІОН-ЗАЛЕЖНОЇ СИСТЕМИ НАСІННЯ *AESCULUS HIPPOCASTANUM* ЗА УМОВ АНТРОПОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Н. Хромих

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

У насінні гіркогоштану звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) з міських фітоценозів визначено вміст відновленого глутатіону (GSH) та рівні активності глутатіон-S-трансферази (GST, EC 2.5.1.18) і глутатіон-редуктази (GR, EC 1.6.4.2). Установлено зростання пулу GSH у 2–3 рази, активності GST у 4–5 рази й GR майже у 2 рази в насінні з забруднених фітоценозів порівняно з умовним контролем, а також залежність ступеня зростання показників від складу поллютантів. Зроблено висновок про активацію метаболічного циклу глутатіону в насінні гіркогоштану як пристосувальну реакцію рослинного організму до екологічних умов антропогенно забруднених екотопів.

Ключові слова: Aesculus hippocastanum L., поллютанти, насіння, глутатіон, глутатіон-редуктаза, глутатіон-S-трансфераза.

Екологічний стан фітоценозів Дніпропетровська визначається як природними, так і антропогенними чинниками внаслідок функціонування численних промислових підприємств і транспортного потоку, які постачають у навколишнє середовище велику кількість забруднювальних речовин, у тому числі важких металів, пилу, сполук азоту, сірки, похідних фенолу тощо [9]. Накопичувачем аерополлютантів, поряд із ґрунтом, є рослини, онтогенез яких проходить за умов забрудненого середовища і може слугувати інтегральним показником його стану [1]. Використання рослин як біоіндикаторів антропогенного забруднення дає змогу оцінити їхню реакцію на вплив поллютантів за фізіологічними та біохімічними показниками, зокрема, за активністю ферментів у рослинних клітинах. Вивчення функціонального стану рослин як цілісних систем передбачає виявлення ефектів дії токсикантів протягом онтогенезу, а також впливу на генеративну функцію та властивості насіння. З'ясовано, що за умов хронічної дії промислових викидів у деревних рослин значною мірою знижуються вага і розміри насіння [19], вміст запасних поживних речовин у насінні та його життєздатність [2]. У вегетаційних досліджах установлено, що високі концентрації важких металів викликають порушення процесу проростання насіння та пошкодження проростків деяких деревних рослин [1]. Виявлено зниження життєздатності та збільшення інтенсивності дихання у насінні *Tagetes erecta* з антропогенно забруднених зон [5]. Показано суттєві зміни у функціонуванні системи протеолізу, накопиченні пулу вільних амінокислот у насінні клену гостролистого та гіркогоштану звичайного за дії викидів промислових підприємств і автотранспорту [7]. Установлено варіювання вмісту, гетерогенності та поліморфізму запасних білків насіння гіркогоштану звичайного, акації білої, представників родів *Quercus*, *Acer*, які зростали у забруднених фітоценозах [8]. У насінні гороху за дії сполук кадмію виявлено порушення клітинного окисно-відновного гомеостазу та суттєві зміни активності ферментів глутатіонового циклу [18]. Однак на сьогодні бракує даних щодо реакції захисних ферментних систем насіння на дію токсикантів.

Ми мали на меті дослідити функціонування метаболічного циклу глутатіону в насінні гіркокаштану звичайного за впливу хронічного антропогенного забруднення та з'ясувати роль глутатіон-залежної системи в адаптації рослин до умов урбанізованого середовища.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження було стигле насіння гіркокаштану звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.), яке збирали на ділянках, де рослини зазнавали дії комплексу забруднювачів різного складу: ділянка 1 (умовний контроль) – територія Ботанічного саду Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара; ділянка 2 – у місцях дії викидів ВАТ “Дніпрошина”; ділянка 3 – у місцях дії викидів ВАТ “Дніпропрес”; ділянка 4 – узбіччя вулиці Героїв Сталінграда з потужним транспортним потоком. Усереднена проба для ділянки формувалась із насіння від 3-5 дерев одного вікового стану, яке висушували за кімнатної температури до постійної ваги. Вміст GSH у насінні визначали спектрофотометричним методом за [6], вимірюючи оптичну густину реакційної суміші (2 мл 0,4 М трис-буферу, рН 8,9, 1 мл небілкової фракції екстракту, 0,05 мл реактиву Елмана) при довжині хвилі 400 нм до та після інкубування при 37°C і враховуючи показники калібрувального графіку. Для визначення активності GST за Jakoby [15] реакційну суміш, яка містила 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0), 0,1 мл 0,02 М розчину GSH і 0,2 мл проби, інкубували 10 хвилин при 30°C, додавали 0,1 мл розчину 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ). Каталітичну активність виражали в наномоль ДНХБ, переробленого за 1 сек (нкатал). Активність GR визначали згідно з рекомендаціями Гришко та ін. [3], для чого реакційну суміш, яка містила 1 мл фосфатного буфера, 0,1 мл розчину ЕДТА, 0,3 мл розчину окисленого глутатіону (GSSG) та 0,2 мл розчину NADPH, витримували у термостаті, додавали 0,2 мл проби і реєстрували дані при довжині хвилі 340 нм. Каталітичну активність ферменту виражали у наномоль NADPH, переробленого за 1 сек (нкатал). Статистичну обробку даних, отриманих у трьох аналітичних повтореннях, проведено за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0, розбіжності між вибірками вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Установлено, що під впливом комплексу забруднювальних речовин вміст відновленого глутатіону в насінні *A. hippocastanum* значно перевищував контрольний рівень GSH (рис. 1), особливо у зразках з другої ділянки (у 3,5 разу).

Відомо, що відновлений глутатіон відіграє важливу роль у підтриманні редокс-статусу рослинних клітин [11, 17] і бере участь у забезпеченні резистентності до важких

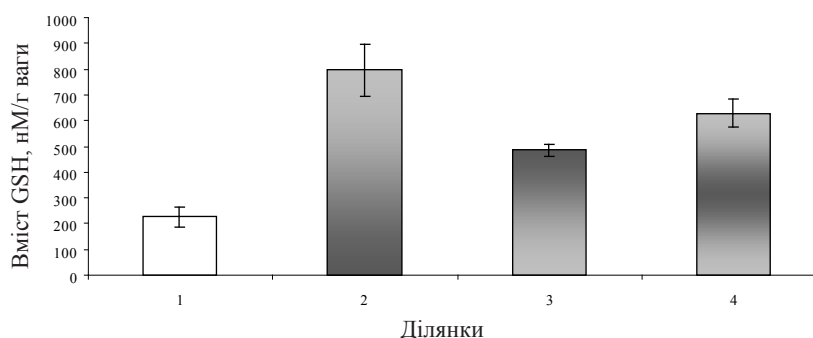


Рис. 1. Вміст GSH (нМоль/г ваги) у насінні *A. hippocastanum*: 1 – ботсад (умовний контроль); 2 – ВАТ “Дніпрошина”; 3 – ВАТ “Дніпропрес”; 4 – вул. Героїв Сталінграда.

металів та інших абіотичних чинників [12, 21]. Можна припустити, що суттєве зростання вмісту GSH у насінні гіркокаштану із забруднених ділянок свідчило на користь посилення стійкості клітин насіння до впливу поллютантів. Слід відзначити, що виявлений нами вміст GSH за порядком збігся з показниками, установленими для металоакумулювальної рослини *Erica andevalensis* (500–800 нМоль/г сирої ваги), яка здатна адаптуватися до хронічного надлишку сполук металів у ґрунті [10]. Ймовірно, високий рівень накопичення пулу GSH у насінні гіркокаштану з забруднених екоотопів сприятиме забезпеченню процесів адаптації насінневого потомства рослин до умов середовища.

У насінні гіркокаштану звичайного із забруднених ділянок установлено різке (в 4,4–5,4 рази щодо контролю) зростання каталітичної активності глутатіон-S-трансферази (рис. 2). Ступінь зростання активності GST був найбільшим у насінні з четвертої ділянки, де рослини *A. hippocastanum* потерпали як від вихлопів транспорту, так і від викидів численних підприємств міста. Відомо, що глутатіон-S-трансферази представлені у рослинах багатьма молекулярними формами й активуються за дії важких металів [16], гербіцидів [14], комплексу чинників [4, 13], до знешкодження яких рослини спроможні завдяки функціонуванню GST. Зростання активності ферменту в клітинах насіння гіркокаштану відбило підвищення здатності до детоксикації різноманітних поллютантів, що, без сумніву, посилювало адаптивні можливості насінневого потомства рослин.

Каталітична активність глутатіон-редуктази у насінні із забруднених ділянок була в 1,3–1,7 рази вищою за показники для контрольного насіння гіркокаштану звичайного (рис. 3).

Відомо, що функціонування глутатіон-редуктази у рослинних клітинах забезпечує відновлення окислених молекул глутатіону й у такий спосіб коригує клітинний окисно-відновний статут за дії стресорів [18]. Виявлене нами зростання активності GR у насінні гіркокаштану з забруднених екоотопів, сумісне зі збільшенням умісту GSH (рис. 1), вказувало на посилення перебігу процесів відновлення молекул окисленого глутатіону в насінні рослин, які потерпали від впливу комплексу поллютантів.

Таким чином, отримані результати свідчили про активацію кожної із досліджених ланок метаболічного циклу глутатіону в насінні *A. hippocastanum* із антропогенно забруднених екоотопів. Забрудненість міського середовища Дніпропетровська має комплексний характер і визначається як викидами автотранспорту, так і промисловими емісіями, які розсіюються на 2–3 км [9]. Унаслідок цього ступені активації глутатіон-залежних ферментів

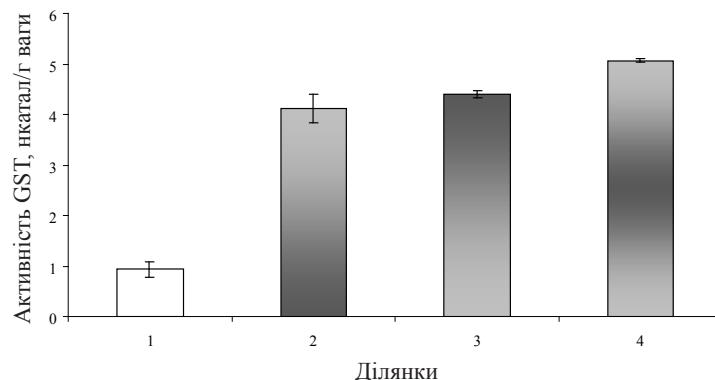


Рис. 2. Активність GST (нкатал/г ваги) у насінні *A. hippocastanum*: 1 – ботсад (умовний контроль); 2 – БАТ “Дніпрошина”; 3 – БАТ “Дніпропрес”; 4 – вул. Героїв Сталінграда.

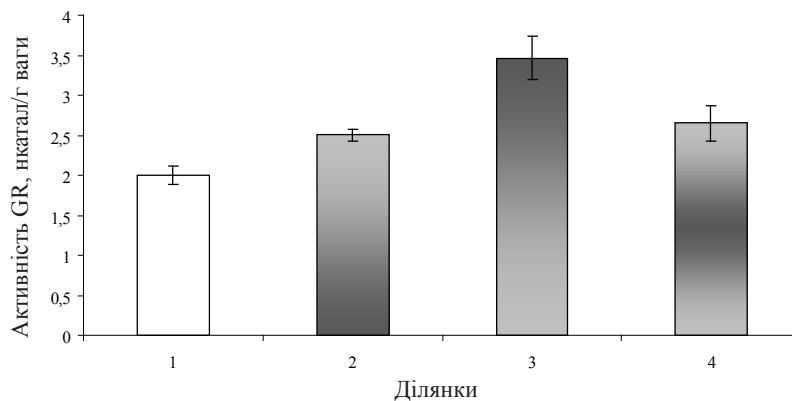


Рис. 3. Активність GR (нкатал/г ваги) у насінні *A. hippocastanum*: 1 – ботсад (умовний контроль); 2 – ВАТ “Дніпрошина”; 3 – ВАТ “Дніпропрес”; 4 – вул. Героїв Сталінграду.

і зростання пулу відновленого глутатіону в насінні з різних фітоценозів були обумовлені певним складом поллютантів. У дослідженнях останніх років виявлені координованість і адаптивне значення метаболічних перебудов глутатіонової системи рослин за стресових умов. Так, показано, що зміни метаболізму глутатіону та редокс-статусу клітин є важливими компонентами стійкості водних рослин до посухи та засолення [20]. Установлено залежність ступеня полімеризації білків і якості зерна пшениці від окисно-відновного балансу глутатіону та рівня активності глутатіон-редуктази під час розвитку насіння [11]. Виявлено визначальну роль метаболічного циклу глутатіону у пристосуванні проростків гороху до токсичної дії кадмію [18]. За результатами наших досліджень можна дійти висновку про адаптивну спрямованість інтенсифікації метаболічного циклу глутатіону в насінні *A. hippocastanum*, яке сформувалося за умов антропогенно забрудненого середовища.

Подальшу роботу доцільно спрямувати на вивчення видових особливостей реакції захисної глутатіонової системи насіння на вплив поллютантів і розробку тест-методів для визначення стійкості деревних рослин до антропогенного забруднення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бессонова В. П. Методи фітоіндикації в оцінці екологічного стану довкілля: навч. посібник. Запоріжжя: ЗДУ, 2001. 196 с.
2. Бессонова В. П., Юсупова Т. И. Семенное возобновление древесных растений и промышленные поллютанты (SO₂ и NO₂). Запорожье: ЗГУ, 2001. 193 с.
3. Гришко В. Н., Сыщиков Д. В. Пероксидное 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.
4. Красіна Ю. О., Хромих Н. О. Вплив забруднювачів водою на глутатіон-трансферазну активність у тканинах вищих водних рослин // Strategiczne pytania swiatowej nauki – 2011: Mat. VII Miedzynar. nauk.-prakt. konf. (Przemysl, 07–15 lutego 2011 r.). Przemysl. Nauka I studia. S. 47–49.
5. Пересипкіна Т. М. Вплив антропогенного забруднення на життєздатність зародків та інтенсивність дихання насіння *Tagetes erecta* L. // Рослини та урбанізація: Мат. I Міжн. наук.-практ. конф. (Дніпропетровськ, 21–23 листопада 2007 р.). ТОВ ТВГ “Куніца”. Дніпропетровськ, 2007. С. 135–136.

6. Руководство к лабораторным и практическим занятиям: Экологическая физиология растений / Г.Ф. Некрасова, И.С. Киселева. Уральский гос. ун-т им. А. М. Горького. Екатеринбург, 2008. 157 с.
7. Філонік І. О. Вплив техногенного забруднення Дніпропетровська на показники білково-амінокислотного обміну і системи протеолізу у насінні гіркокаштану звичайного та клену гостролистого // Рослини та урбанізація: Мат. I міжнар. наук.-практ. конф. (Дніпропетровськ, 21–23 листопада 2007 р.). ТОВ ТВГ “Куніца”. Дніпропетровськ, 2007. С. 159–160.
8. Шупранова Л. В. Оценка состояния семенного потомства древесных растений в условиях города // Рослини та урбанізація: Мат. I міжнар. наук.-практ. конф. (Дніпропетровськ, 21–23 листопада 2007 р.). ТОВ ТВГ “Куніца”. Дніпропетровськ, 2007. С. 163–164.
9. Экологический паспорт города Днепропетровска / Павлов В. П., Переметник Н. Н., Шевченко Б. Е.. Днепропетровск, 1999. 109 с.
10. Antioxidants in *Erica andevalensis*: A comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions / B. Marquez-Garsia, N. Horemans, A. Cuypers et al. // Plant Phys. and Biochem. 2011. Vol. 49. Is. 1. P. 110–115.
11. Changes in glutathione thiol-disulfide status during wheat grain development / Rhazi L., Cazalis R., Lemelin E. et al. // Plant Phys. and Biochem. 2003. Vol. 41. Is. 10. P. 895–902.
12. Cuypers A., Vangronsveld J., Clijsters H. The redox status of plant cells (As and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* // Plant Phys. and Biochem. 2001. Vol. 39. Is. 7–8. P. 657–664.
13. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips / L. Haluskova, K. Valentovicova, J. Huttova et al. // Plant Phys. and Biochem. 2009. Vol. 47. Is. 11–12. P. 1069–1074.
14. Forced Evolution of a Herbicide Detoxifying Glutathione Transferase / Dixon D.P., McEwen A.G., Laphorn A.J. et al. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. Is. 26. P. 23930–23935.
15. Jakoby William B. Glutathion Transferases. In: Methods in Enzymology. Acad. Press. INC. 1985. P. 495–510.
16. Marrs K. A. The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants // Annual review of plant physiology and Plant molecular biology. 1996. N 47. P. 127–158.
17. 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.
18. Redox regulation of the glutathione/isogluta redoxin system in germinating pea seed exposed to cadmium / Smiri M., Chaoui A., Rouhier N. et al. // Plant Science. 2010. Vol. 179. Is. 5. P. 423–436.
19. Tripakti R. S., Khan M. L. Effects of seed weight and microsite characteristics on germination and seedling fitness in two species of *Quercus* in a subtropical wet hill forest // Oikos. 1990. Vol. 57. N 3. P. 289–296.
20. Up-regulation of glutathione metabolism and changes in redox status involved in adaptation of reed (*Phragmites communis*) ecotypes to drought-prone and saline habitats / Chen K.-M., Gong H.-J., Chen G.-C. et al // J. Plant Physiol. 2003. Vol. 160. Is. 3. P. 302–309.
21. 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. Botany. 2010. Vol. 76. Is. 2. P. 167–179.

Стаття: надійшла до редакції 21.09.11

прийнята до друку 07.11.11

**THE STATE OF *AESCULUS HIPPOCASTANUM* SEEDS
GLUTATHIONE-DEPENDENT SYSTEM
UNDER ANTHROPOGENIC CONTAMINATION**

N. Khromykh

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

The reduced glutathione (GSH) content, level of glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) activity in *Aesculus hippocastanum* seeds from urbophytocenoses were determined. The 2–3-fold enhancing of GSH pool, 4–5-fold of GST and 2-fold GR activity increasing in the seeds from contaminated phytocenoses in comparison with control phytocenoses, and dependent of enhancing from content of pollutants were estimated. In was concluded that the activation of glutathione metabolic cycle in the seeds is the adaptive reaction of plant organism to ecological conditions of anthropogenic contamination of the ecotops.

Keywords: Aesculus hippocastanum L., pollutants, seeds, glutathione, glutathione reductase, glutathione-S-transferase.

**СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ СЕМЯН
AESCULUS HIPPOCASTANUM В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО
ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

Н. Хромых

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

В семенах каштана конского (*Aesculus hippocastanum L.*) из городских фитоценозов определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH) и уровни активности глутатион-S-трансферазы (GST, EC 2.5.1.18) и глутатион-редуктазы (GR, EC 1.6.4.2). Установлено возрастание пула GSH в 2–3 раза, активности GST в 4–5 раз и GR почти в 2 раза в семенах из загрязненных фитоценозов в сравнении с условным контролем, а также зависимость степени увеличения показателей от состава поллютантов. Сделан вывод, что активация метаболического цикла глутатиона в семенах каштана является приспособительной реакцией растительного организма к экологическим условиям антропогенно загрязненных экотопов.

Ключевые слова: Aesculus hippocastanum L., поллютанты, семена, глутатион, глутатион-редуктаза, глутатион-S-трансфераза.