

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АСКОРБАТ-ГЛУТАТІОНОВОГО ЦИКЛУ В ЛИСТКАХ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ В УМОВАХ ЗАСОЛЕННЯ ТА ОБРОБКИ АДАПТОГЕННИМИ ПРЕПАРАТАМИ

О. О. КОНТУРСЬКА, Т. О. ПАЛЛАДІНА

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: konturska@ukr.net

Досліджували вплив засоленого середовища та адаптогенних препаратів Метіур та Івін на активність ензимів аскорбат-глутатіонового циклу в проростках кукурудзи, експонованих на різних концентраціях NaCl. Знайдено, що розчин NaCl 0,05 М значно посилює активність аскорбатпероксидази (АПО) при 1-добовій експозиції, а при її подовженні до 10 діб не спричинює значних змін. У концентрації 0,1 М NaCl є критичною для даного злаку, що зумовлює інгібування АПО, яке збільшується з терміном експозиції. У той же час, глутатіонредуктаза (ГР) реагує на обидві концентрації NaCl посиленням активності. Замочування насіння у препаратах Метіур та Івін (10^{-7} М) однаковою мірою посилює активність АПО у присутності 0,1 М NaCl за обох термінів експозиції, проте практично не впливає на активність ГР. Одержані результати засвідчили відміни у відповіді ензимів аскорбат-глутатіонового циклу на сольову експозицію проростків, а також продемонстрували, що вплив адаптогенних препаратів на його функціонування здійснюється через активацію АПО.

Ключові слова: *Zea mays L.*, сольовий стрес, аскорбатпероксидаза, глутатіонредуктаза, Метіур, Івін.

Засолення середовища є для рослин одним із найсильніших негативних факторів, що обмежує їх різноманіття та перешкоджає агровиробництву в багатьох регіонах світу. Сольовий стрес виникає в рослинному організмі внаслідок порушення осмотичного та іонного гомеостазу, причому в останньому особлива роль належить токсичному для рослин натрію. Подібно до стресів, спричинених іншими факторами, сольовий стрес супроводжується вторинним окислювальним стресом [1].

Окислювальний стрес є результатом посиленого утворення активних форм кисню, зокрема H_2O_2 . Деструкція H_2O_2 у клітині здійснюється системою антиоксидантного захисту, в якій задіяний цілий ряд ензимів та субстратів. У рослинних клітинах важливим субстратом відновлення H_2O_2 є аскорбат, через що в системі антиоксидантного захисту значну роль відіграє функціонування аскорбат-глутатіонового циклу (рис. 1) [2].

Розпочинає цикл аскорбатпероксидази (АПО) 1.11.1.11, якій необхідні дві молекули аскорбату для відновлення H_2O_2 до води, що супроводжується утворенням двох молекул монодегідроаскорбату з подальшим швидким утворенням аскорбату та дегідроаскорбату (рис. 1).

Відновлення дегідроаскорбату до аскорбату здійснює дегідроаскорбатредуктаза (1.8.5.1),

яка використовує глутатіон як відновник і утворює глутатіон дисульфід. Завершує цикл глутатіонредуктаза (ГР) 1.6.4.2, яка відновлює глутатіон дисульфід до глутатіону за допомогою NADPH [2].

Накопичено велику кількість даних щодо функціонування ензимів аскорбат-глутатіонового циклу, зокрема, за дії різних стресорних чинників. Досліджувався вплив багатьох абіотичних факторів, таких як низькі температури, засолення, посухи, ультрафіолетове випромінювання тощо [2, 3].

Радикальним способом посилення стійкості рослин є створення трансгенних форм, які містять гени, що зумовлюють потрібну властивість [1, 3]. Але існує також можливість значно посилювати стійкість рослин за допомогою біоактивних препаратів адаптогенної дії. Нами було показано наявність солепротекторної дії синтетичних препаратів Метіур та Івін, яка була сильнішою у першого з них. Це дозволило рекомендувати використання Метіуру як безпечний та дешевий агрозахід для вирощування на засолених ґрунтах кукурудзи, що є солечутливим злаком [4]. Дослідження впливу цих препаратів на фізіологічні та біохімічні процеси рослин кукурудзи довели, що обробка ними насіння сприяє росту рослин на засоленому середовищі, активує ензими антиокси-

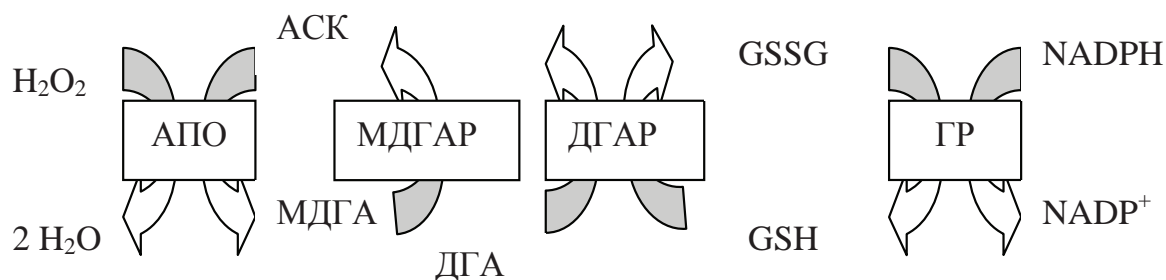


Рис. 1. Схема аскорбат-глутатіонового циклу. АПО – аскорбатпероксидаза; АСК – аскорбат; МДГА – монодегідроаскорбат; МДГАР – монодегідроаскорбатредуктаза; ДГА – дегідроаскорбат; ДГАР – дегідроаскорбатредуктаза; GSSG – глутатіон дисульфід; GSH – відновлений глутатіон, ГР – глутатіонредуктаза [2]

дантного захисту, зокрема неспецифічну пероксидазу та каталазу [5], нормалізує ліпідний склад плазматичної мембрани клітин коренів проростків [6] та посилює функціонування вакуолярної H^+ -АТФ-ази [7].

Метою роботи було з'ясування впливу різних концентрацій NaCl та адаптогенних препаратів на активність ензимів аскорбат-глутатіонового циклу АПО та ГР в листках проростків кукурудзи.

Матеріали і методи

Проростки кукурудзи (*Zea mays* L., гібрид Десна СВ) вирощували у водній культурі на поживному середовищі Хогленда при 24 °С за умов 16-годинного світлового дня (освітлення здійснювали люмінесцентними лампами 50 Вт/м²). Препарати Метіур (діюча речовина: 6-метил-2-меркапто-4-гідроксопіримідин) та Івін (діюча речовина: N-оксид-2,6-диметилпіридин), які синтезували в ІБОХ НАН України, застосовувалися шляхом замочування насіння в їхніх 10⁻⁷ М водних розчинах протягом доби. Сольовий стрес створювали експонуванням 7-добових проростків кукурудзи на поживному середовищі з 0,05 М NaCl, що є помірною стресорною концентрацією для цих рослин та 0,1 М NaCl, яка є для них критичною.

Для екстракції ензимів листки, попередньо заморожені в рідкому азоті, гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,2), який містив 0,1 мМ ЕДТА, 0,1% фенілметилсульфонілфториду і 2% полівінілпіролідону. Гомогенат центрифугували при 15 000 g протягом 15 хв.

Активність АПО визначали методом Asada [8]. Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,2), 0,1 мМ ЕДТА, 1 мМ аскорбат та супернатант. Реакцію ініціювали

додаванням 0,1 мМ H₂O₂. Зменшення вмісту аскорбату реєстрували на спектрофотометрі СФ-2000 (Росія) при 290 нм ($\epsilon = 2,88$ мМсм⁻¹).

Активність ГР визначали як описано в роботі [9]. Реакційна суміш містила 0,1 М калій-фосфатний буфер (рН 7,2), 2 мМ NADPH, 0,05 мМ окислений глутатіон. Реакцію ініціювали додаванням супернатанта. Зменшення вмісту NADPH у середовищі інкубації реєстрували на спектрофотометрі при 340 нм ($\epsilon = 6,22$ мМсм⁻¹). Вміст протеїну визначали за методом Бредфорд [10].

У роботі застосували такі реактиви: ЕДТА, кумасі яскраво-блакитний G-250 (Reanal, Угорщина), фенілметилсульфонілфторид, полівінілпіролідон (Merck, Німеччина), NADPH та окислений глутатіон (Sigma, США) та інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації хч.

Досліди здійснювали в чотирьох біологічних та аналітичних повторностях, результати вважали статистично вірогідними при $P \leq 0,05$ за критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Одержані результати продемонстрували, що добова експозиція проростків з 0,05 М розчином NaCl підвищує активність АПО в листках на 63% порівняно з безсольовим контролем (рис. 2, А). Подовження сольової експозиції до 10 діб не впливає на активність цього ензиму, яка залишається на рівні безсольового контролю. У той же час обидва терміни сольової експозиції проростків у присутності 0,1 М NaCl знижують активність АПО в листках проростків на 31 та 48% відповідно відносно безсольового контролю (рис. 2, А).

Під впливом сольової експозиції зміна активності ГР має протилежний характер (рис. 2, Б). Так, експозиція проростків у 0,05

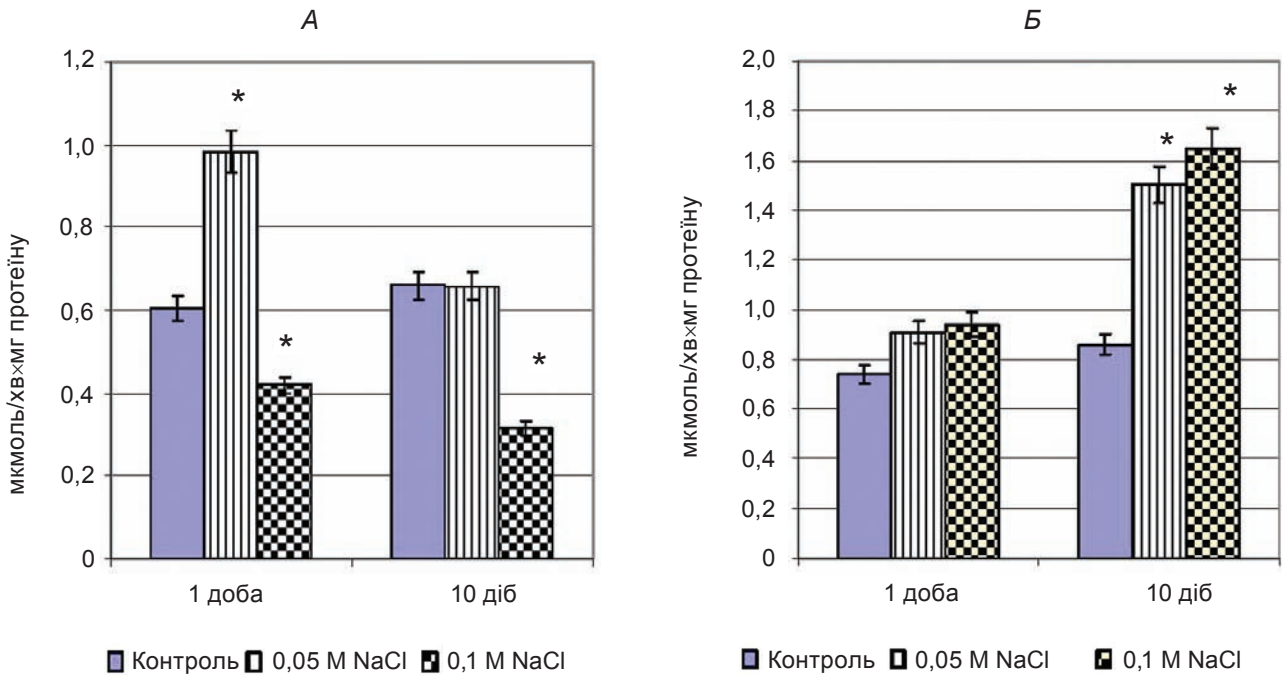


Рис. 2. Активність аскорбатпероксидази (А) та глутатіонредуктази (Б) в листках проростків кукурудзи в умовах різного ступеня засолення ($M \pm m$, $n = 4$, $P \leq 0,05$; * вірогідність відносно контролю)

та 0,1 М розчинах NaCl протягом однієї доби істотно не змінює активність ГР у листках порівняно з безсольовим контролем. Проте подовження сольової експозиції проростків до 10 діб підвищує активність цього ензиму на 74 та 91% відповідно.

Зміну активності АПО та ГР в умовах засолення виявлено в різних рослин. Так, посилення активності цих ензимів спостерігалось в листках календули *Calendula officinalis* L. при концентрації 0,05 та 0,1 М NaCl [11], а також в листках сочевиці *Lens culinaris* М. за дії 0,1 та 0,2 М NaCl [12]. У листках батату *Ipomoea batatas* (L.) Lam відмічено кореляцію між збільшенням концентрації NaCl у поживному середовищі в межах 0,15–0,45 М та посиленням активності АПО в листках [13], тоді як активність ГР значно не змінювалася, посилюючись лише при 0,45 М NaCl [13]. У листках дикого типу *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh посилення активності обох ензимів було показано під час експозиції рослин у присутності 0,05 М NaCl, тоді як 0,1 та 0,2 М розчини NaCl зменшували активність цих ензимів [14]. Дані цієї роботи щодо активності АПО збігаються з одержаними нами результатами.

Активність АПО пов'язана із зростанням вмісту H_2O_2 у клітині, що спричинюється функціонуванням супероксиддисмутази (1.15.1.1) [2]. У попередніх наших дослідженнях

знайдено, що активність супероксиддисмутази в листках зростала у присутності NaCl в поживному середовищі [15]. Поряд із цим, було виявлено активацію каталази та пероксидази, які беруть участь у відновленні H_2O_2 [5]. Однак відмічені гальмування росту проростків кукурудзи та посилення процесів пероксидного окислення через критичне засолення [15] свідчать, що посиленого функціонування каталази та пероксидази недостатньо для протидії H_2O_2 . Це дозволяє припустити, що за критичних умов головну відновну функцію виконують ензими аскорбат-глутатіонового циклу. Зниження активності АПО в листках внаслідок критичного засолення поживного середовища може бути пов'язано зі зменшенням експресії генів, які кодують цей ензим [14], а також зі зсувом внутрішньоклітинного рН у бік низьких значень, що, в свою чергу, призводить до конформаційних змін протеїнових молекул [16].

Високу активність ГР у листках проростків в умовах 10-добової сольової експозиції (рис. 2, Б) на фоні низької активності АПО, можна пояснити збільшенням вмісту окисленого глутатіону в клітині. Відомо, що глутатіон є субстратом для відновлення H_2O_2 , який використовує глутатіонпероксидаза, хоча в рослинних клітинах цей ензим виявляє більшу специфічність до ліпідних пероксидів [17].

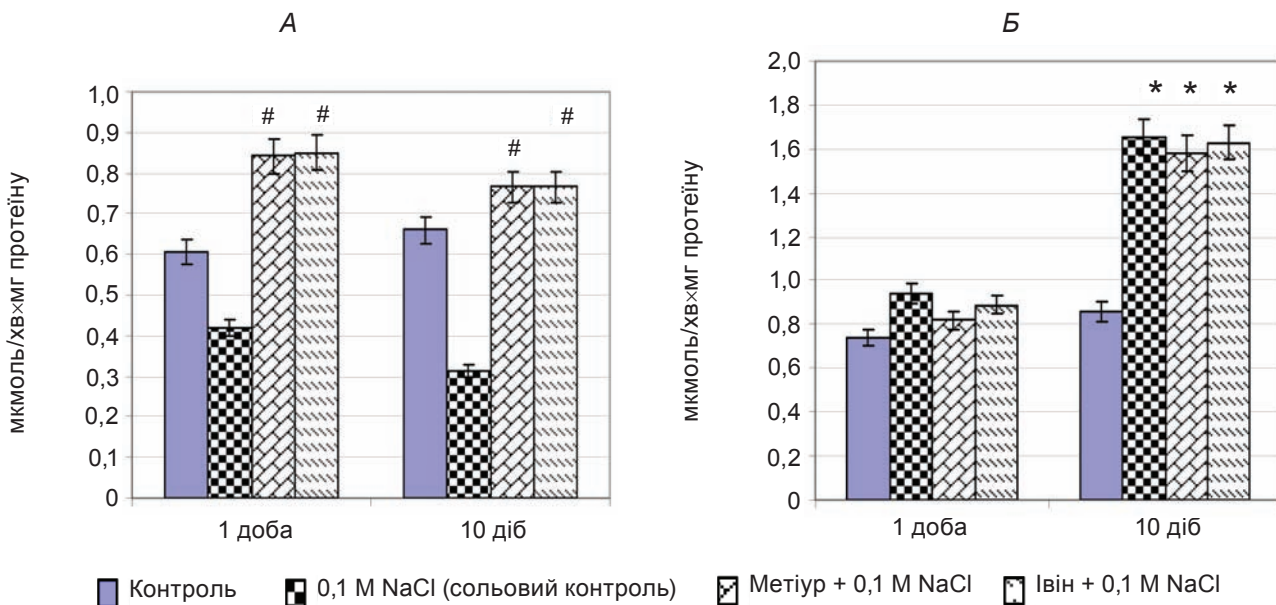


Рис. 3. Активність аскорбатпероксидази (А) та глутатіонредуктази (Б) в листках проростків кукурудзи в умовах засолення та обробки синтетичними препаратами (M ± m, n = 4, P ≤ 0,05; * вірогідність відносно контролю; # вірогідність відносно 0,1 М NaCl)

Порівняння обробки насіння Метіуром та Івіном під час сольової експозиції не засвідчило відмінності щодо їх впливу на активність АПО в листках проростків кукурудзи. Експонування проростків з обробленого цими препаратами насіння у присутності 0,1 М NaCl збільшує активність цього ензиму в 2 рази при добовій та в 2,5 рази при 10-добовій сольовій експозиції щодо сольового контролю (рис. 3, А). Слід зауважити, що активність АПО в листках оброблених препаратами рослин в умовах 10-добової сольової експозиції є на рівні безсольового контролю (рис. 3, А).

Обробка препаратами насіння у разі добової сольової експозиції не спричинює суттєвої зміни активності ГР у листках проростків порівняно з сольовим контролем. Подовження сольової експозиції до 10 діб також не змінює активність цього ензиму щодо сольового контролю (рис. 3, Б), хоча порівняно з безсольовим контролем вона збільшується у 2 рази.

Посилення росту проростків з обробленого препаратами насіння в умовах засолення, а також послаблення в них процесів перекисного окислення, дозволяють припустити, що це пов'язано з активацією антиоксидантних ензимів, зокрема аскорбат-глутатіонового циклу, які беруть участь у процесах утилізації активних форм кисню. Активація АПО та ГР може відбуватися, як шляхом змін конформації

їх молекул, так і за рахунок збільшення вмісту цих ензимів у клітинах. Застосування препаратів може мати прямий або опосередкований вплив на ці процеси. Так, було показано, що ці препарати здатні посилювати експресію генів [18].

Активацію антиоксидантних ензимів розглядають як показник стійкості рослини до різних стресорних умов [3]. Знайдено, що за дії 0,07 М NaCl на рослини гороху *Pisum sativum* L. зростання активності ензимів аскорбат-глутатіонового циклу відбувалося у стійких до засолення сортів, тоді як у чутливих сортів вона не змінювалася [19]. Також продемонстровано, що внаслідок засолення поживного середовища активність цих ензимів у коренях солетолерантного сорту кукурудзи посилюється, а у солечутливих, навпаки, знижується [20]. Можна вважати, що виявлена нами активація АПО та ГР у листках проростків кукурудзи в умовах помірного засолення та дії синтетичних препаратів є проявом їх адаптації до стресів.

Одержані результати дозволяють дійти висновку, що активність АПО та ГР у листках проростків кукурудзи залежить від концентрації NaCl у поживному середовищі та терміну сольової експозиції. Обробка насіння препаратами Метіур та Івін посилює активність АПО в листках, що має сприяти адаптації рослин кукурудзи до умов засолення.

**АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ
АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО
ЦИКЛА В ЛИСТЯХ ПРОРОСТКОВ
КУКУРУЗЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ
И ОБРАБОТКЕ АДАПТОГЕННЫМИ
ПРЕПАРАТАМИ**

О. А. Контурская, Т. А. Палладина

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев;
e-mail: konturska@ukr.net

Исследовали влияние засоления и адаптогенных препаратов Метиур и Ивин на активность энзимов аскорбат-глутатионного цикла в проростках кукурузы, экспонированных на разных концентрациях NaCl. Установлено, что концентрация 0,05 М NaCl значительно активизирует аскорбатпероксидазу (АПО) при суточной экспозиции, а при увеличении ее до 10 суток не вызывает значительных изменений. Концентрация 0,1 М NaCl является критичной для данного злака, что приводит к ингибированию АПО, которое усиливается с увеличением экспозиции. В то же время глутатионредуктаза (ГР) реагирует на обе концентрации NaCl усилением активности. Замачивание семян в препаратах Метиур и Ивин (10^{-7} М) активизирует АПО при 0,1 М NaCl и двух сроках экспозиции, однако практически не влияет на активность ГР. Полученные результаты показали различия в ответах энзимов аскорбат-глутатионного цикла на солевую экспозицию проростков, а также продемонстрировали, что влияние адаптогенных препаратов на его функционирование осуществляется вследствие активации АПО.

Ключевые слова: *Zea mays* L., солевой стресс, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза, Метиур, Ивин.

**ASCORBATE-GLUTATHIONE CYCLE
ENZYMES ACTIVITY IN ZEA MAYS
LEAVES UNDER SALINITY AND
TREATMENT BY ADAPTOGENIC
COMPOUNDS**

O. O. Konturska, T. O. Palladina

M. G. Kholodny Institute of Botany, National
Academy of Science of Ukraine, Kyiv;
e-mail: konturska@ukr.net

S u m m a r y

The effect of different salinity levels and synthetic compounds treatments on ascorbate-

glutathione cycle enzymes activity in maize leaves has been investigated. One-day seedlings exposition with 0.05 М NaCl increased ascorbate peroxidase activity, whereas 10-day exposition did not affect it. However the exposition with 0.1 М NaCl, which is extreme for maize, decreased ascorbate peroxidase activity in leaves during 10 days. On the other hand glutathione reductase activity in leaves increased under both salt concentrations. Seeds treatments with Methyure and Ivine increased ascorbate peroxidase activity in the leaves of seedlings under 0.1 М NaCl, but did not affect glutathione reductase activity as compared to the salt control. The results obtained have shown differences of ascorbate-glutathione cycle enzymes responses to salt exposition of seedlings and the effects of adaptogenic compounds on the ascorbate-glutathione cycle via ascorbate peroxidase activation.

Key words: *Zea mays* L., salt stress, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, Methyure, Ivine.

1. *Zhu J-K.* // Trends Plant Sci. – 2001. – 6, N 2. – P. 66–71.
2. *Foyer C., Noctor G.* // Plant Physiol. – 2011. – 155. – P. 2–18.
3. *Ashraf M.* // Biotechnol. Adv. – 2009. – 27. – P. 84–93.
4. *Пат. 26531 Україна, МПК А 01 С 1/00.* Спосіб посилення солестійкості кукурудзи для її вирощування на засолених ґрунтах/ Палладина Т. О. – опубл. 25.09.2007, Бюл. № 15.
5. *Куриленко І. М., Палладина Т. О.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 6. – С. 86–93.
6. *Контурська О. О., Палладина Т. О.* // Вісник ХНАУ. – 2007. – 2(11). – С. 64–68.
7. *Рибченко Ж. І., Палладина Т. О.* // Доп. НАНУ. – 2011. – № 5. – С. 176–179.
8. *Asada K.* // Methods Enzymol. – 1984. – 105. – P. 422–429.
9. *Rao M. V., Paliyath G., Ormrod D. P.* // Plant Physiol. – 1996. – 110. – P. 125–136.
10. *Breadford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – 72 (2). – P. 248–254.
11. *Chaparzadeh N., D'Amico M. L., Khavari-Nejad R. A. et al.* // Plant Physiol. Biochem. – 2004. – 42. – P. 695–701.
12. *Bandeoglu E., Eyidoğan F., Yücel M., Öktem H.* // Plant Grow Regul. – 2004. – 42. – P. 69–77.
13. *Lin K., Pu S.* // Biol. Plant. – 2010. – 54 (4). – P. 664–670.
14. *Lu Z., Liu D., Liu S.* // Plant Cell Rep. – 2007. – N 26. – P. 1909–1917.

15. *Куриленко І. М.* Процеси пероксидного окислення в проростках кукурудзи за умов сольового стресу: автореф. дис...канд. біол. наук – К., 2007. – 19 с.
16. *Тарчевский И. А.* Катаболизм и стресс у растений. – М.: Наука, 2002. – 80 с.
17. *Milla M. A. R., Mauer A., Huete A. R., Gustafson J. P.* // *Plant J.* – 2003. – **36**. – P. 602–615.
18. *Tsygankova V. A., Zayetz V. N., Galkina L. A.* // *Биополимеры и клетка.* – 1999. – **15**, № 5. – С. 432–441.
19. *Hernandez J. A., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F.* // *Plant Cell Environ.* – 2000. – **23**. – P. 853–862.
20. *Neto A., Prisco J. T., Enéas-Filho J. et al.* // *Env. Exp. Bot.* – 2006. – **56**, N 1. – P. 87–94.

Отримано 05.03.2012