

УДК 631.474+631.452

Н. Ф. Павлюкова, Н. О. Хромих, Л. В. Богуславська

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ ОДНОДОЛЬНИХ РОСЛИН НА ВПЛИВ МЕТАЛІВ ТА ГІПЕРТЕРМІЇ

Вивчено комплексний вплив іонів нікелю та гіпертермії на вміст відновленої форми глутатіону у коренях проростків кукурудзи. Встановлено, що ефект взаємодії двох абіотичних чинників при їх довготривалій дії сприяє збільшенню вмісту відновлених форм глутатіону у клітинах проростків кукурудзи, що має адаптивний характер.

Ключові слова: кукурудза, відновлені форми глутатіону, нікель, гіпертерія.

Н. Ф. Павлюкова, Н. А. Хромых, Л. В. Богуславская

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ ОДНОДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ НА ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛОВ И ГИПЕРТЕРМИИ

Изучено комплексное влияние ионов никеля и гипертермии на содержание восстановленной формы глутатиона в корнях проростков кукурузы. Установлено, что эффект взаимодействия двух абiotических факторов при их продолжительном действии способствует увеличению содержания восстановленной формы глутатиона в клетках проростков кукурузы, что имеет адаптивный характер.

Ключевые слова: кукуруза, восстановленные формы глутатиона, никель, гипертермия.

N. F. Pavlukova, N. A. Chromych, L. V. Boguslavs'ka

O. Hochar Dnipropetrovsk National University

THE PECULIARITIES OF GLUTATHIONE SYSTEM REACTION OF MONOCOTYLEDONOUS PLANTS ON THE IMPACT OF METALS AND HYPERTHERMIA

It was conducted a planned factorial experiment to determine the joint action of nickel ions and hyperthermia on the functioning of the metabolic cycle of glutathione, which is one of the most important plant protective systems.

The compounds of heavy metals, whose action causing oxidative stress, are causing significant damage to plant organisms. In the chain of corresponding reactions of plants on the toxic effects of heavy metals an important place occupies a glutathione system. Changes in the content of glutathione and glutathione-dependent enzymes determine the state of plants antioxidant system. In tolerant species the increase of glutathione concentration is an adaptive response to the increase of heavy metals in the tissues. The impact of hyperthermia leads to changes of fatty acid composition in membrane, where leads to increasing of passive transport of ions and metabolites, including ions of heavy metals compounds. To protect against their negative effects in the cell works a system of antioxidant enzymes, among which there are enzymes of glutathione cycle.

It was established that the interaction effect of two abiotic factors contributes to the increase of content of reduced form of glutathione in the cells of maize seedlings that has an adaptive character.

Key words: corn, reduced forms of glutathione, nickel, hyperthermia.

Останнім часом умови рослин погіршуються у зв'язку з глобальними процесами як природного, так і антропогенного походження. Тому зростає потреба в точній оцінці адаптивного потенціалу рослин, яка неможлива без вивчення

їх стійкості до пошкоджувального впливу. Оскільки в природному середовищі в основному має місце комбінований вплив стресових факторів на рослини, тому дослідження стійкості до несприятливих чинників потребує врахування спільного впливу зростаючого техногенного навантаження та мінливих кліматичних умов [3; 6]. В умовах міського середовища захисні адаптаційні механізми рослин не просто забезпечують виживання організму, а спрямовані на реалізацію онтогенетичної програми за довготривалого впливу забруднювального фактора [8].

Серед найагресивніших забруднювачів довкілля, які згубно впливають на біосферу, є іони важких металів.

Підвищення концентрації важких металів можуть призводити до загальних, малоспецифічних фізіологічних і біохімічних змін. У якості найбільш загальних проявів стресу, обумовленого надлишком важких металів, виділяють пошкодження мембран, зміну активності ферментів, інгібування росту коренів. Зазначені порушення ведуть до цілого ряду вторинних ефектів, таких як гормональний дисбаланс, дефіцит необхідних елементів, інгібування фотосинтезу, порушення пересування фотоасимілянтів, зміна водного режиму [1].

Метаболічні порушення в рослинах викликаються не тільки нестачею мікроелементів живлення, але і їх надлишком. У цілому рослини більш стійкі до підвищених, ніж знижених концентрацій елементів [5].

Нікель належить до ультрамікроелементів і у високих концентраціях виявляє цитостатичні та мутагенні властивості, пригнічує ріст і розвиток рослин, процеси фотосинтезу та дихання, знижує активність ферментів [2].

У сучасних умовах рослини пристосовуються до дії різних забруднювачів за рахунок різноманітних детоксаційних механізмів, що сформувались у рослин у процесі філогенезу. Важливою захисною системою рослин є система глутатіону, яка захищає організм від згубної дії продуктів ПОЛ, регулює окисно-відновні процеси, знешкоджує ксенобіотики.

Встановлено, що індукція синтезу відновленої форми глутатіону у вегетативних органах проростків спостерігається переважно за максимального вмісту Ni у середовищі вирощування. Зміни вмісту глутатіону та активності глутатіонзалежних ферментів визначають стан антиоксидантної системи рослин. Показано, що за наявності мінімальної концентрації Ni у листках активність ГР і ГП підвищується, тоді як максимальна пригнічує їхню активність. У коренях сої та кукурудзи активність ферментів зменшується, що може бути пов'язано з переважним використанням глутатіону для утворення фітохелатинів, які здатні зв'язувати значну кількість важких металів. Оскільки глутатіонзалежна антиоксидантна система обумовляє резистентність рослин до дії важких металів, у тому числі нікеля, актуальним є дослідження особливостей її функціонування [4; 9].

У процесі еволюції сформувалися генетичні механізми, які підвищують стійкість рослин до високих температур. Як і за інших впливів, при високих температурах працюють захисні механізми двох типів: уникнути перегріву і пристосування до існування в умовах високих температур. Пристосування до високих температур корелює зі зростанням ступеня насиченості жирних кислот мембранних ліпідів [10].

Спільний вплив нестабільних температур середовища та важких металів на реакції глутатіонової системи рослин наразі мало досліджено. Тому метою даної роботи було дослідити особливості реакції глутатіонової системи проростків кукурудзи за умов спільної дії гіпертермії та іонів нікелю.

Об'єкти і методи дослідження. Для дослідження брали кукурудзу як представника однодольних рослин.

Кукурудза – середньоранній гібрид Орлиця 237 МВ. Характеризується високою врожайністю (11–12 т/га) та високою технологічністю. Рослина високоросла 250–260 см, не кущиться, стебла стійкі до полягання та ламкості. Стійкість до

засухи, уражень основними хворобами та пошкодження шкідниками дуже висока, 8 балів із 9. Напряв використання даного гібриду – отримання великого врожаю зерна.

У модельному експерименті досліджували вплив іонів нікелю та високої температури на вміст відновленого глутатіону у коренях проростків кукурудзи.

Перші 4 доби досліду проростки знаходились у термостаті при температурі 26 °С на дистильованій воді. Потім проростки переносили у чашки Петрі та витримували на розчинах $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ у концентраціях 0,05 мМ; 0,5 мМ та 1,0 мМ. Проростки витримувалися у термостаті при різних показниках температури 32 °С, 38 °С, 45 °С.

Корені проростків відбирали через 30 та 180 хвилин за схемою експерименту (табл. 1).

Таблиця 1

Схема факторного експерименту

№	Концентрація $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, мМ	Температура, °С	Час дії факторів, хв	
1	0,05	32	30	180
2	1,0	32	30	180
3	0,05	45	30	180
4	1,0	45	30	180
5	0,5	38	30	180

Отримані дані обробляли математично з використанням методу планового факторного експерименту.

Двохфакторний експеримент є більш досконалим для вивчення складних процесів порівняно з однофакторним, оскільки найбільший недолік однофакторного експерименту полягає в тому, що висновки, зроблені на його основі, навіть після статистичної обробки результатів справедливі тільки для тих строго фіксованих умов, в яких цей експеримент був поставлений. Ця обставина значною мірою знецінює однофакторний підхід до вивчення складних процесів.

Повторність дослідів трикратна.

Визначали вміст відновленого глутатіону за допомогою спектрофотометричного методу з використанням реактиву Еллмана в коренях проростків, що зазнали впливу гіпертермії та іонів нікелю, Використовували метод визначення відновленого глутатіону, модифікований для рослинних тканин [7].

Дані обробляли математично за допомогою комп'ютерної програми StatGraphics.

Надійність одержаних результатів – 95 %.

Результати та їх обговорення. Сполуки важких металів, дія яких спричинює окислювальний стрес, завдають значної шкоди рослинним організмам. У ланцюгу відповідних реакцій рослин на токсичний вплив важких металів важливе місце посідає глутатіонова система. Зміни вмісту глутатіону та активності глутатіонзалежних ферментів визначають стан антиоксидантної системи рослин. У толерантних видів збільшення концентрації глутатіону є адаптивною реакцією на підвищення концентрації важких металів у тканинах.

Вплив гіпертермії призводить до зміни жирнокислотного складу мембран, відбувається окиснення ліпідів, що суттєво змінює структуру ліпідного біошару мембран, це призводить до посилення пасивного транспорту іонів та метаболітів, у тому числі іонів сполук важких металів. Також за дії високих температур відбувається порушення гомеостазу організму, при якому у рослин спостерігається посилене утворення активних форм кисню. Для захисту від їх негативного впливу в клітині працює система антиоксидантних ферментів, серед яких є і ферменти глутатіонового циклу [10].

У проведенному нами модельному експерименті ми враховували спільну дію двох абіотичних чинників: гіпертермії та іонів нікелю. У результаті дослідження отримали дані, приведені в табл. 2.

Таблиця 2

Вміст відновленої форми глутатіону у коренях кукурудзи за сумісного впливу двох стресових факторів

Концентрація іонів нікелю, мМ	Значення високої температури, °С	Вміст відновленого глутатіону, мкМ/г
Короткочасна дія (30 хв) двох абіотичних факторів		
0,05	32	22,2±1,2
1,0	32	24,0±1,0
0,05	45	17,3±1,4
1,0	45	16,9±1,2
0,5	38	25,4±1,3
дистильована вода	26	11,6±1,5
Довготривала дія (180 хв) двох абіотичних факторів		
0,05	32	25±1,4
1,0	32	36±1,2
0,05	45	19±1,2
1,0	45	21±1,0
0,5	38	41±1,5
дистильована вода	26	10±1,3

Ми проаналізували утворення відновленого глутатіону в коренях проростків кукурудзи і встановили, що через 30 хв вплив гіпертермії та іонів нікелю був майже однаковим. Ефект взаємодії двох факторів є статистично достовірним (95 % значущості).

Вплив як високої температури, так і іонів нікелю не досягав рівня значущості, отже окрема дія кожного з цих двох факторів на етапі 30 хв не спричинює сильного окислювального стресу.

Ефект взаємодії двох факторів свідчить про явище синергізму двох стресорів, оскільки призводить до суттєвого зменшення відновлених форм глутатіону в коренях проростків. У свою чергу це свідчить про інтенсивне використання глутатіону у процесах антиоксидантного захисту.

Вплив як високої температури, так і іонів нікелю не досягав рівня значущості, отже окрема дія кожного з цих двох факторів на етапі 30 хв не спричинює сильного окислювального стресу (рис. 1).

При наступному відборі через 180 хв було встановлено, що як і на етапі 30 хв окремий вплив гіпертермії і вплив іонів нікелю не набував статистичної достовірності, отже через 180 хв вплив кожного з цих чинників не спричинює достатньо сильного стресу (рис. 2).

На етапі 180 хв також має явище синергізму двох абіотичних чинників. Встановлено значне підвищення концентрації відновленої форми глутатіону, що свідчить про достатній рівень виконання антиоксидантних функцій.

За допомогою факторного аналізу отримали рівняння регресії для встановлення закономірностей впливу гіпертермії та іонів нікелю на вміст відновленого глутатіону у коренях кукурудзи, зробили розрахунки ефектів впливу кожного з двох факторів та ефекту їх взаємодії. Достовірність отриманих результатів дорівнює 95 %.

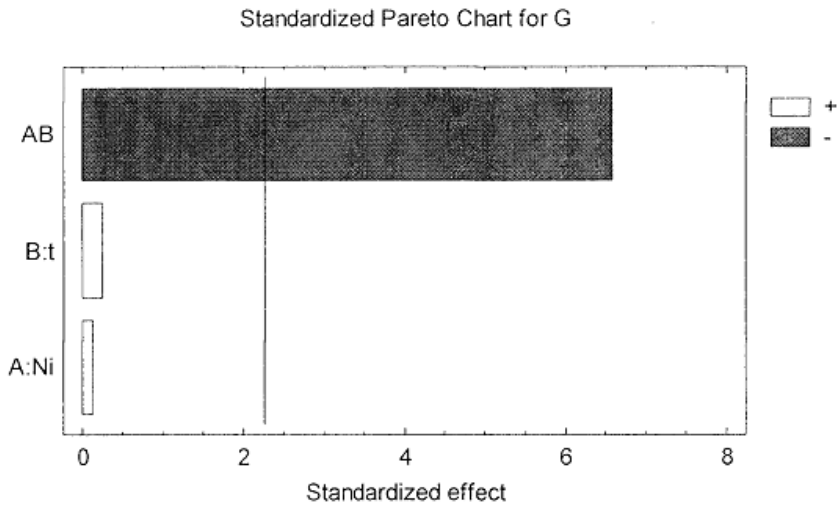


Рис. 1. Оцінка впливу іонів нікелю та високої температури на вміст відновленого глутатіону у коренях проростків кукурудзи через 30 хв експерименту:
A – вплив іонів нікелю; B – вплив високої температури;
AB – ефект взаємодії двох факторів

Вплив двох факторів на етапі 30 хв виражався за допомогою регресійної математичної моделі, яка наведена в табл. 3. Стандартна помилка дорівнює 0,37, рівень дисперсії складає 52,4 %. Коефіцієнти регресії: фактор A (Ni): 11,61; фактор B (t): 9,87; фактор AB: – 31,25.

При зміні концентрації іонів нікелю у середовищі від 0,05 мМ до 1 мМ спостерігаємо збільшення концентрації відновленого глутатіону на 13 % при мінімальній температурі. При максимальній температурі 45 °С спостерігалось зменшення вмісту глутатіону на 16 %.

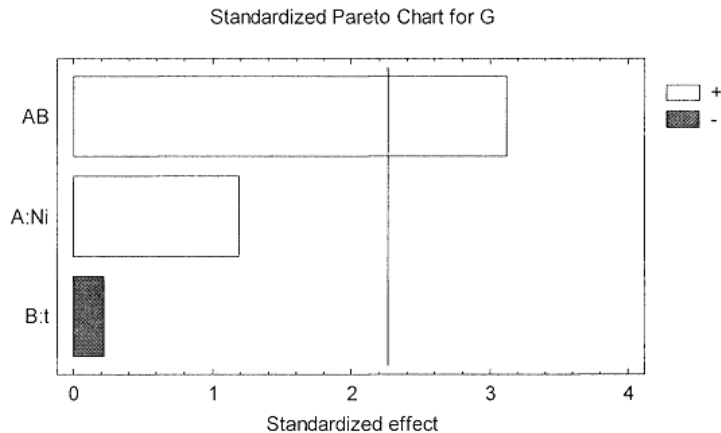


Рис. 2. Оцінка впливу іонів нікелю та високої температури на вміст відновленого глутатіону у коренях проростків кукурудзи через 180 хв експерименту:
A – вплив іонів нікелю; B – вплив високої температури;
AB – ефект взаємодії двох факторів

Зміна значень високої температури на тлі мінімальної концентрації розчину $Ni(NO_3)_2$ викликає збільшення утворення відновленого глутатіону на 13 % відносно середнього значення в експерименті. На тлі максимальної концентрації розчину спостерігається зменшення вмісту глутатіону на 15 %. Ефект взаємодії

двох абіотичних чинників спричиняє зменшення вмісту відновленого глутатіону на 18 %.

Таблиця 3

Негативний вплив гіпертермії (x_2) та важких металів (x_1) на вміст відновленого глутатіону (y) у коренях кукурудзи

Термін дії факторів, хв	Математична модель	Ефекти впливу іонів нікелю	Ефекти впливу гіпертермії	Ефекти взаємодії факторів
30	$y=23,1-0,2x_1-0,13x_2-1,7x_1x_2$	$A_{1^-}=13$ $A_{1^+}=-16$	$A_{2^-}=13$ $A_{2^+}=-15$	$A_{12}=-18$
180	$y=4,2+1,2x_1-0,5x_2+0,9x_1x_2$	$A_{1^-}=14,2$ $A_{1^+}=5,7$	$A_{2^-}=6,6$ $A_{2^+}=19$	$A_{12}=42$

Таким чином, через 30 хвилин експерименту прояв окисного стресу у рослинному організмі спостерігається при зростанні температури у присутності максимальної концентрації $Ni(NO_3)_2$ та збільшення концентрації іонів нікелю у розчині за дії максимального значення температури. При взаємодії двох абіотичних факторів виявлено більш значний прояв стресу, ніж при дії цих факторів окремо. При короткочасному безперервному впливові гіпертермії на тлі різних концентрації іонів нікелю у розчині активуються системи захисту рослин, оскільки температурний вплив на рослинний організм не обмежується внутрішньоклітинними бар'єрами. Можна припустити, що температурний вплив призводить до зміни активності стартових ферментів сигнальних систем, більшість із яких локалізовано в плазмалемі та появі відповідних сигнальних інтермедіатів, припускають, що важливими інтермедіатами між температурним впливом та біохімічною відповіддю клітини можуть бути активні форми кисню. Для захисту від їх негативного впливу в клітині працює система антиоксидантних ферментів, серед яких є ферменти глутатіонового циклу.

На етапі 180 хв було отримано рівняння регресії, наведене в табл. 3, при цьому рівень дисперсії складає $R^2=34,5\%$, стандартна помилка дорівнює 0,32. Коефіцієнти регресії: фактор А (Ni) =7,22; фактор В(t) =-2,61; фактор АВ =9,37.

Із представлених ефектів впливу абіотичних чинників у табл. 3 можна стверджувати, що вплив максимального значення ($45^\circ C$) температури та максимальної концентрації розчину $Ni(NO_3)_2$ на корені проростків кукурудзи викликають у клітинах рослин прояви окисного стресу, а саме збільшення вмісту відновленого глутатіону на 5,7 % та 19 % відповідно.

При зростанні від мінімальної до максимальної концентрації розчину $Ni(NO_3)_2$ на фоні мінімального значення температури також спостерігається збільшення концентрації глутатіону на 14,2 %. Збільшення вмісту глутатіону на 6,6 % спостерігається при зміні значень високої температури у присутності мінімальної концентрації іонів нікелю у середовищі. Ефект взаємодії двох абіотичних чинників сприяє збільшенню вмісту відновлених форм глутатіону у клітинах проростків кукурудзи на 42 %.

Таким чином, після 180 хв експерименту значно активуються процеси утворення відновленого глутатіону під впливом обох стресових факторів, що має значний адаптивний характер. Ефект зростання температури та тлі мінімальної концентрації іонів нікелю та вплив зростання концентрації іонів нікелю на тлі мінімальної температури викликають окисний стрес, який рослині вдається подолати, вмикаючи компенсаторні реакції та активуючи захисні системи.

Висновки. Проведено плановий факторний експеримент для визначення сумісної дії іонів нікелю та гіпертермії на функціонування метаболічного циклу глутатіону, який є однією з найважливіших захисних систем рослинного організму.

Встановлено, що кукурудза не зазнає значного стресу за дії іонів нікелю та гіпертермії як окремих факторів, що свідчать про меншу швидкість надходження нікелю до коренів та більшу термостабільність ферментних систем, але при взаємодії цих факторів відмічається зменшення вмісту глутатіону, що свідчить про інтенсивне його використання у антиоксидантному захисті клітин.

Бібліографічні посилання

1. Амосова Н. Ф. Фито- и генотоксическое действие ионов железа, кобальта и никеля на физиологические показатели растений различных видов / Н. Ф. Амосова, И. А. Тазина // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 5. – С. 49–54.
2. Андреева И. В. Никель в растениях / И. В. Андреева, В. В. Говорина, Б. А. Ягодина // Агрохимия. – 2001. – № 3. – С. 82–94.
3. Воскресенская О. Л. Организм и среда: факториальная экология / О. Л. Воскресенская, Е. А. Скочилова. – Йошкар-Ола, 2005. – 175 с.
4. Гришко В. М. Функціонування глутатіонзалежної антиоксидантної системи у гороху, сої, кукурудзи та дії сполук кадмію / В. М. Гришко, Д. В. Сищиков // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т. 36. – № 6. – С. 23–27.
5. Демура Т. А. Функціонування аскорбатзалежної ланки антиоксидантного захисту проростків кукурудзи за сумісної дії іонів кадмію та нікелю / Т. А. Демура, В. М. Гришко // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. – К. : Логос, 2009. – Т. 2. – С. 255–262.
6. Коршиков И. И. Взаимодействие растений с техногенно загрязненной средой / И. И. Коршиков. – К. : Наук. думка, 1995. – 192 с.
7. Мусієнко М. М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М. М. Мусієнко, Т. В. Паршикова, П. С. Славний. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 200 с.
8. Половникова М. Г. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды / М. Г. Половникова, О. Л. Воскресенская // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – № 5. – С. 777–785.
9. Хромих Н. О. Стан глутатіонзалежної системи *Aesculus hippocastanum* за умов антропогенного забруднення / Н. О. Хромих // Вісник Львів. ун-ту. – Сер. біологічна. – 2012. – Вип. 58. – С. 265–270.
10. Хромих Н. О. Активність глутатіон-S-трансферази проростків кукурудзи за комбінованого впливу високої температури та важких металів / Н. О. Хромих, В. С. Бельчук // Вісник Дніпропетр. ун-ту. – Сер. Біологія та екологія. – 2009. – Вип. 17. – Т. 2. – С. 122–126.

Надійшла до редколегії 15.06.2015

УДК 581.1

Ю. В. Лихолат, І. В. Білик, Є. С. Бородай, І. Ю. Буряк

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

СТІЙКІСТЬ ВИСОКОДЕКОРАТИВНИХ КВІТКОВИХ РОСЛИН ЗА РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ УМОВ

Досліджено рівні накопичення важких металів високодекоративними квітково-декоративними рослинами, що зростали в різних екологічних умовах. За допомогою кластерного аналізу встановлено зв'язок між вмістом окремих важких металів та деякими ростовими показниками квітково-декоративних рослин. Виявлено видові особливості стійкості досліджуваних рослин за дії поллютантів, які рекомендовано враховувати при проведенні озеленення промислового міста.

Ключові слова: квітково-декоративні рослини, ростові показники, стійкість, важкі метали, кластерний аналіз.

© Ю. В. Лихолат, І. В. Білик, Є. С. Бородай, І. Ю. Буряк, 2015