

О.І.ПАЦУЛА, Н.М.ВОРОБЕЦЬ

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул.Грушевського, 4 79005, м.Львів, Україна

**РЕАКЦІЯ СОНЯШНИКА НА ДІЮ СВИНЦЮ ЗА УЧАСТЮ
ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗИ**

ключові слова: Helianthus annuus L., ріст, свинець, глутатіонпероксидаза
key words: Helianthus annuus L., growth, lead, glutathione peroxidase

O.I.PATSULA, N.M.VOROBETS

**THE REACTION OF HELIANTHUS ANNUUS L. ON THE ACTION OF
LEAD WITH PARTICIPATION OF GLUTATHIONE PEROXIDASE**

Ivan Franko National University of Lviv
4 Hrushevs'ky Str., 79005 L'viv, Ukraine

The involvement of the glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in the defense against lead-induced oxidative stress was studied in the roots and shoots of *Helianthus annuus* L. Three days germinated plants were grown on 10^{-8} , 10^{-5} , 10^{-3} M lead acetate for 2-, 5- and 9-days. The root glutathione peroxidase activity was higher than shoot one. With increase of lead concentration we observed the increase of enzymes activity in the 5- and 8-days old plants and decrease in the 12-day old ones.

Протягом останніх кількох десятиліть темпи нагромадження важких металів у біосфері настільки зросли, що постала загроза порушення функціональних систем живих організмів. Одним із таких металів є свинець. Більша частина його надходить у зону коренів, де він може поглинатися, а звідти пересуватися по рослині, і, потрапивши в різні тканини, впливати на активність ферментів, проникність мембран, водний обмін, фотосинтез [8]. Найнегативніше його дія проявляється на ранніх етапах розвитку рослини. Тому вивчення механізмів стійкості рослин до дії свинцю є важливою.

Реакцією-відповіддю впливу свинцю на рослини є утворення активних форм кисню. Цей термін є узагальненим, і включає в себе не лише супероксидні й гідроксидні радикали, але й пероксид водню. Супероксидний радикал і пероксид водню синтезуються в клітині й за нормальних умов в основних етапах аеробного обміну за допомогою ферментних систем клітини, а також за дії стресових чинників [6]. Їх утилізують антиоксидантні системи клітини, що включають ряд ферментів і сполук з низькою молекулярною масою. Одним із таких ферментів є глутатіонпероксидаза [5]. Вона відновлює токсичні

пероксиди, що утворюються в результаті окисдантного стресу, до відповідних спиртів. Це такі пероксиди, як пероксид водню, пероксиди жирних кислот і фосфоліпідів. Цей процес відбувається з використанням відновленого глутатіону. Було показано, що прямий захисний ефект глутатіонпероксидази призводить до підсилення толерантності рослин до стресових факторів, а індуковане глутатіонпероксидазою збільшення вмісту окисленої форми глутатіону в клітині, є сигналом для активації подальших захисних механізмів [4].

Метою нашої роботи було вивчити вплив різних концентрацій ацетату свинцю на активність глутатіонпероксидази [КФ1.11.1.9] у паростках соняшника.

Методика досліджень

Досліди проводили на паростках соняшника *Helianthus annuus* L. сорту Світоч, вирощених на різних концентраціях ацетату свинцю (10^8 , 10^5 , 10^3 М). Контролем служили рослини, вирощені на бідистильованій воді. За 5, 8, 12 діб від початку експерименту вимірювали довжину та масу коренів і пагонів проростків, а також активність глутатіонпероксидази за модифікованою методикою Моїна [2]. Для визначення активності фермента, наважки рослинного матеріалу гомогенізували в ступці в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 7,5) у співвідношенні 1:5, екстрагували протягом 30 хв. за температури $+5^{\circ}\text{C}$, центрифугували протягом 30 хв. за 13000g. Надосадову рідину використовували як ферментний препарат. Для визначення активності фермента 0,1 мл ферментного препарату змішували з 4,8 мМ розчином відновленого глутатіону в 0,1 М трис-НСІ буфері (рН 8,5), з 6 мМ ЕДТА та 12 мМ азиду натрію; через 5 хв. додавали 14 мМ tВНР (гідропероксид третинного бутилу) та інкубували протягом 30 хв. за температури $+30^{\circ}\text{C}$. Реакцію зупиняли додаванням холодної 20% ТХО. У контрольну пробірку додавали ферментний препарат. Осадженні білки видаляли центрифугуванням за 1500 об./хв. протягом 15 хв. Надосадову рідину змішували з 0,1 М трисНСІ (рН 8,5) і додавали реактив Елмана. Через 5 хв. проби фотометрували за довжини хвилі 412 нм. Питому активність глутатіонпероксидази виражали в мкМ на 1 г білка за 1хв.

Білок у ферментному препараті визначали за методом Лоурі [7].

Статистичне опрацювання даних проводили, визначаючи середнє арифметичне зі стандартною похибкою ($M \pm m$).

Результати досліджень

У таблицях 1 і 2 представленні результати впливу різних концентрацій ацетату свинцю на ростові показники 5-, 8- і 12-добових

проростків *Helianthus annuus* L. Як бачимо, у випадку дії важких металів, ріст коренів інгібувався, їх довжина й маса були меншими, порівняно з контролем.

Таблиця 1.

Довжина проростків *Helianthus annuus* L., вирощених на різних концентраціях ацетату свинцю (у процентах від контролю)

| Варіант | Довжина, % | | | | | |
|-----------------------------------------------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | корені | | | пагони | | |
| | 5 діб | 8 діб | 12 діб | 5 діб | 8 діб | 12 діб |
| 10^{-8} M Pb(CH ₃ COO) ₂ | 98,82 | 101,15 | 102,00 | 58,53 | 86,79* | 194,04 |
| 10^{-5} M Pb(CH ₃ COO) ₂ | 82,95 | 81,18* | 68,95 | 96,84 | 69,90 | 92,06 |
| 10^{-3} M Pb(CH ₃ COO) ₂ | 90,18 | 88,18 | 50,00 | 92,42 | 69,69 | 63,01 |

* — дані не достовірні

Таблиця 2.

Маса проростків *Helianthus annuus* L., вирощених на різних концентраціях ацетату свинцю (в процентах від контролю)

| Варіант | Маса, % | | | | | |
|-----------------------------------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | корені | | | пагони | | |
| | 5 діб | 8 діб | 12 діб | 5 діб | 8 діб | 12 діб |
| 10^{-8} M Pb(CH ₃ COO) ₂ | 106,67 | 89,67* | 102,00 | 104,62 | 88,89* | 108,82 |
| 10^{-5} M Pb(CH ₃ COO) ₂ | 66,67 | 66,67* | 120,00 | 84,62 | 83,33 | 87,94 |
| 10^{-3} M Pb(CH ₃ COO) ₂ | 16,67 | 33,67 | 33,00 | 42,30 | 66,67 | 54,04 |

* — дані не достовірні

У 5-добових проростків інгібування проявлялося меншою мірою, однак з часом інгібуючий ефект високих доз свинцю посилювався. У 12-добових проростків спостерігалось досить помітне зниження маси коренів, особливо за дії ацетату свинцю в концентраціях 10^{-5} M і 10^{-3} M.

У пагонах також спостерігався інгібуючий ефект, особливо це було помітно через зміну маси пагонів. Довжина пагонів, порівняно з

контролем, була найменшою за дії ацетату свинцю в концентрації 10^{-3}M у 8- і 12-добових проростків. Молодші пагони не зазнавали значного впливу ацетату свинцю у застосованих нами концентраціях.

На рис. 1, 2 представленні дані за результатами впливу різних концентрацій ацетату свинцю на питому активність глутатіонпероксидази 5-, 8- і 12-добових проростків соняшника.

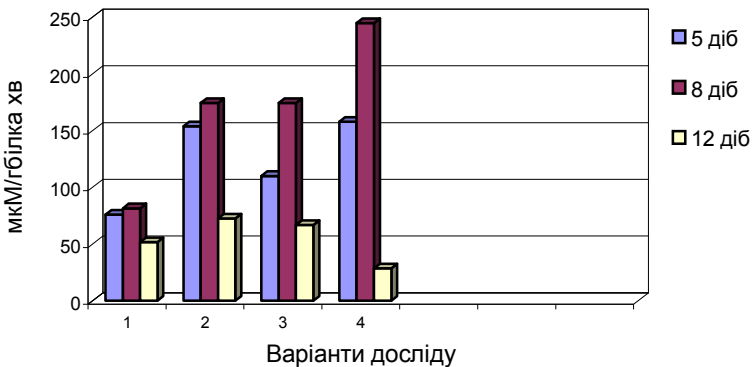


Рис.1 Активність глутатіонпероксидази під впливом різних концентрацій ацетату свинцю в коренях соняшника. 1 — контроль, 2 — 10^{-8}M Pb^{2+} , 3 — 10^{-5}M Pb^{2+} , 4 — 10^{-3}M Pb^{2+} .

Корені та пагони 5-ти-добових рослин контрольного варіанту мали, приблизно, однаковий рівень активності. Протягом періоду переходу до автотрофного живлення рослин у коренях активність ферменту дещо зростала, а в пагонах зростала майже в 3 рази. Після переходу до автотрофного живлення в коренях і в пагонах контрольних рослин активність глутатіонпероксидази мала найменше значення. У випадку вирощування рослин на всіх, застосованих нами, концентраціях ацетату свинцю активність глутатіонпероксидази в коренях 5-ти та 8-ми добових рослин була в 2-3 рази вищою від контролю, однак у 12-ти добових рослин активність фермента знижувалася й на 10^{-3}M ацетаті свинцю була нижчою від контролю.

Протягом росту пагонів від 5 до 8 доби активність глутатіонпероксидази в них зростала, якщо концентрація ацетату свинцю в поживному розчині не перевищувала 10^{-5}M і дещо знижувалася в 12-ти добових проростків, хоча значення активності перевищувало контрольні. У пагонах рослин, вирощених на 10^{-3}M ацетаті свинцю активність ферменту не змінювалася протягом усього експерименту.

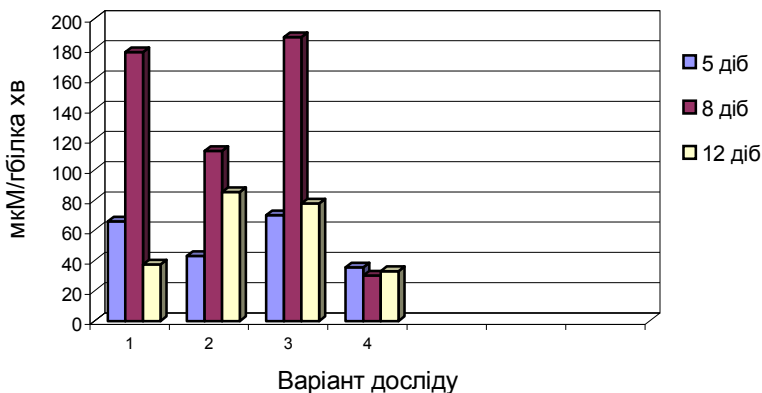


Рис. 2 Активність глутатіонпероксидази за дії різних концентрацій ацетату свинцю у пагонах соняшника: 1 — контроль, 2 — 10^{-8} М Pb^{2+} , 3 — 10^{-5} М Pb^{2+} , 4 — 10^{-3} М Pb^{2+} .

Наведені дані узгоджуються з одержаними нами раніше результатами для квасолі [3]. Інші дослідники також відзначали підвищення активності глутатіонпероксидази після дії стресових чинників [1; 4].

Виявлені закономірності свідчать, що глутатіонпероксидаза бере участь у захисті рослин соняшника у випадку дії свинцю в період гетеротрофного та міксотрофного живлення в більшій мірі, ніж після переходу їх лише до автотрофного. Можливо, у випадку переходу до автотрофного живлення включаються інші захисні механізми. Однак, у разі гетеротрофного живлення проростка, глутатіонпероксидаза має важливе значення. Високі рівні свинцю в поживному середовищі інгібують роботу ферменту в пагонах і коренях соняшника.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гришко В.Н., Сьщиков Д.В. Peroxidное окисление липидов и функционирование некоторых антиокислительных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении фтористым водородом // Укр. биохим. журн. – 1999. – 71, 3. – С. 51-57.
2. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – 12. – С. 724-726.
3. Пацула О.И., Воробец Н.Н., Мыкневич И.М. Формирование глутатионпероксидазной системы защиты у фасоли в условиях действия свинца // Тезисы V11 Молодежной конференции ботаников в Санкт-Петербурге (15-19 мая 2000 г.) – Санкт-Петербург, 2000. – С.143.
4. Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G. Plant glutathione peroxidases // Physiol. Plantarum. – 1997. – 100, 2. – P. 234-240.

5. **Noctor G., Foyer C.H.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1998. – 49. – P. 249-279.
6. **Inze D., Van Montagu M.** Oxidative stress in plants // *Current Opinion in Biotechnology.* – 1995. – 6. – P. 153-158.
7. **Lowry O.H., Ruserbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. – 193, 1. – P. 165-275.
8. **Olów** w komórkach roślinnych / Adam Woźny (red.). – Poznań : Wyd-wo Sorus, 1995. – 143 s.