

УДК 581.1

## ВПЛИВ ІОНІВ МІДІ ТА рН СЕРЕДОВИЩА НА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ У ТКАНИНАХ КОРЕНІВ ПРОРОСТКІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

М.С. РЯЗАНОВА<sup>1</sup>, Л.М. БАЦМАНОВА<sup>2</sup>, М.С. КОВАЛЕНКО<sup>2</sup>, Л.М. МИХАЛЬСЬКА<sup>1</sup>,  
В.В. ШВАРТАУ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: marina.rz@mail.ru

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
01601 Київ, вул. Володимирська, 64  
e-mail: l.batsmanova@gmail.com

Досліджено вплив іонів міді та рН середовища на активність ензимів антиоксидантної системи й пероксидне окиснення ліпідів у тканинах коренів проростків озимої пшениці. Встановлено, що в разі добавляння до середовища невеликих кількостей сульфату міді (0,3; 5 мкмоль) антиоксидантна активність у тканинах коренів пшениці підвищується. Зростання кислотності розчину для пророщування посилює вплив іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на рослини озимої пшениці.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum* L.,  $\text{Cu}^{2+}$ , супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидне окиснення ліпідів, рН.

Пшениця є головною продовольчою культурою для населення багатьох країн світу. Найбільшими виробниками пшениці є Китай, Індія та США [2]. За даними ФАО, частка пшениці у виробництві зернових культур в Україні становить від 40 до 50 % [16].

Для нормального росту й розвитку рослини потребують оптимального рівня мінерального живлення, який залежить від багатьох чинників і визначається типом ґрунту, кліматом, потенційним урожаєм [1, 10]. Кислі ґрунти значно поширені у світі. Кислотність ґрунту може впливати на мобільність елементів живлення та здатність коренів до їх абсорбції. Зі зниженням кислотності середовища спостерігається дефіцит багатьох мікроелементів, а за зменшення рН ґрунту доступність іонів алюмінію і мангану збільшується до токсичних рівнів [1, 23].

Окисно-відновні процеси — головна складова аеробного метаболізму. Генерування молекул з макроергічними зв'язками, енергія яких використовується в процесах біосинтезу, потребує молекулярного кисню, що є кінцевим окисником і акцептором електронів. Він забезпечує перебіг окисно-відновних реакцій, включаючи ті, які є частиною електронтранспортного ланцюга, локалізованого на внутрішній мембрані мітохондрій. Кінцевим продуктом відновлення кисню є вода. Активні форми кисню (АФК), такі як супероксидні аніон-радикали, формуються внаслідок одноелектронного відновлення кисню. Під впливом супероксиддисмутази (СОД) вони здатні швидко дисмутувати у воду й перок-

сид водню, який, у свою чергу, відновлюється до гідроксильного радикала — потенційно найсильнішого окисника з високою реакційною здатністю [15]. Утворенню надлишку гідроксильних радикалів заважають пероксидаза і каталаза.

Мідь — необхідний елемент для росту рослин, відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних процесах: фотосинтезу, дихання, розподілу вуглеводів, фіксації азоту, підтримання білкового обміну, антиоксидантної активності, метаболізму компонентів клітинної стінки, гормональної регуляції. На клітинному рівні іони міді є структурним і каталітичним компонентом багатьох білків та ферментів різних метаболічних шляхів [23]. Водночас у рослинах підтримується низький рівень міді в клітинах, бо за високих концентрацій цей елемент може бути фітотоксичним стресовим чинником [26]. Навіть незначне підвищення рівня фізіологічно доступної міді призводить до токсичних ефектів, які виявляються у зміні фотосинтетичних і дихальних процесів, ферментативної активності, порушенні цілісності мембран, генеруванні АФК й окисному стресі, що зумовлюють порушення метаболічних шляхів та інгібування росту [5, 13]. У результаті акумуляції АФК активуються механізми антиоксидантного захисту, серед яких посилення активності ферментів СОД, пероксидази, каталази і неферментних компонентів, що включають глутатіон, аскорбінову кислоту та ін. [12, 24].

Метою роботи було дослідження впливу іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на антиоксидантну активність у тканинах коренів рослин озимої пшениці на початкових етапах розвитку за підвищеної кислотності середовища.

## Методика

Стерилізоване насіння озимої пшениці сорту Смуглянка (*Triticum aestivum* L., опромінювач бактерицидний ОБН-35м) пророщували у чашках Петрі на двошаровому фільтрувальному папері, змоченому стерильним розчином з рН 4,7 та 6,2 (5 мМ ацетатний буфер), у темряві, за 20 °С протягом 48 год (холодотермостат ХТ 3/70-2). Через 48 год інкубації проростки обробляли розчином  $\text{CuSO}_4$  концентраціями 0—50 мкМ. На 3-тю добу після обробки корені проростків піддавали біохімічному аналізу.

Для приготування витяжки ферментів 150 мг коренів промивали дистильованою водою й гомогенізували з 1,5 мл 50 мМ фосфатного буферу (рН 7,8). Гомогенат центрифугували протягом 5 хв за 12 000 об/хв при 4 °С. Надосадову рідину зберігали при 4 °С й використовували для визначення активності ферментів і вмісту білка.

Активність СОД (КФ 1.15.1.1) визначали за здатністю інгібувати відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) при  $\lambda = 560$  нм. Реакційна суміш містила 1 мл рибофлавіну, 1 мл метіоніну, 1 мл НСТ і 50 мкл екстракту. За одиницю активності ферменту брали 50 %-ве пригнічення утворення формазану. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг білка в екстракті [11].

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за методом Ебі [4]. Реакційна суміш містила 2,9 мл фосфатного буфера (рН 7,0), 90 мкл екстракту та 10 мкл 33 %-го розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Вимірювання проводили при  $\lambda = 240$  нм на спектрофотометрі UV-1800 (Shimadzu) протягом 60 с. Активність виражали в умовних одиницях у перерахунку на 1 мг білка.

Рівень пероксидного окиснення ліпідів визначали за накопиченням ТБК-активних сполук за методом Кумар і Ноулеса [17] з модифікаціями. 200 мг коренів гомогенізували з невеликою кількістю (1,5 мл) *трис*-NaCl буфера (pH 7,6), об'єм екстракту доводили до 3 мл. До отриманого гомогенату додавали 1 мл 0,5 %-го розчину тіобарбітурової кислоти (ТБК) та 2 мл 20 %-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХО). Пробірки з гомогенатом упродовж 30 хв витримували на киплячій водяній бані й центрифугували за 3000 об/хв протягом 10 хв. Визначення проводили при  $\lambda = 533$  нм на спектрофотометрі UV-1800 (Shimadzu). Кількість ТБК-активних сполук виражали в мікромолях малонового діальдегіду за молярного коефіцієнта екстинкції  $1,55 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

Інтегральний показник загальної антиоксидантної активності, що характеризує антиоксидантний потенціал, розраховували за Чеварі [3].

Кількість сухої біомаси встановлювали відповідно до ГОСТ 16932–93.

Вміст білка визначали за методом Бредфорда [7]. Реакційна суміш складалася з 2 мл реактиву Бредфорда, 16 мкл 0,15 М NaCl і 40 мкл екстракту. Пробірки залишали на 2 хв, оптичну густину вимірювали за допомогою спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu) при  $\lambda = 595$  нм. Концентрацію білка в екстракті розраховували за калібрувальним графіком за бичачим сироватковим альбуміном Merck.

Отримані дані оброблено статистично за програмою Statistica 6.0. Досліди повторювали тричі в семи аналітичних повторностях, вірогідність різниці між середньоарифметичними значеннями показників встановлювали за критерієм Стьюдента. Відмінності вважали істотними за  $P \leq 0,05$ .

## Результати та обговорення

АФК формуються з кисню як побічні продукти за нормального метаболізму й відіграють важливу роль у сигнальній системі клітини. Проте в умовах стресу продукування АФК істотно підвищується, що призводить до істотних пошкоджень компонентів клітини [14]. Мідь є редокс-активним металом, який здатний каталізувати утворення вільних гідроксильних радикалів, алкілів або пероксиду, що спричинює оксидний стрес [10]. Як правило, за стресових умов активність одного чи кількох ферментів антиоксидантної системи зростає і це корелює з підвищенням толерантності до стресового чинника [22].

Вільні радикали, що формуються під дією різних стресових чинників (температура, засолення, наявність важких металів), здатні пошкоджувати мембранні ліпіди і призводити до порушення іонного гомеостазу клітини. Тому рівень ПОЛ є важливим симптомом токсичності [14]. Ми встановили, що розвиток окисних процесів за дії іонів міді залежить від pH середовища (рис. 1). Так, у разі вирощування проростків на кислому середовищі (pH 4,7) вміст ТБК-активних продуктів збільшувався порівняно з проростками, культивованими на середовищі з pH 6,2. Після введення в середовище іонів міді окисні процеси наростали відповідно до збільшення концентрації Cu у середовищі з pH 4,7. У коренях проростків, які росли на середовищі з pH 6,2, вміст ТБК-активних продуктів істотно збільшувався тільки у варіантах з підвищеними концентраціями іонів міді (5 і 50 мкМ).

Отже, отримані нами результати підтвердили, що в разі вирощування проростків на більш кислому середовищі порушується бар'єрна

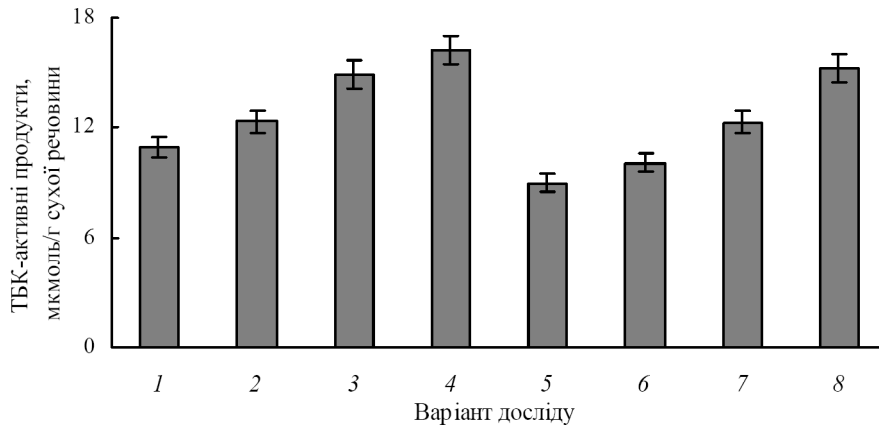


Рис. 1. Вплив сульфату міді на вміст ТБК-активних продуктів у коренях озимої пшениці залежно від рН середовища. Тут і на рис. 2—4:

1 – рН 4,7; 2 – рН 4,7 + 0,3 мкмоль  $\text{CuSO}_4$ ; 3 – рН 4,7 + 5 мкмоль  $\text{CuSO}_4$ ; 4 – рН 4,7 + 50 мкмоль  $\text{CuSO}_4$ ; 5 – рН 6,2; 6 – рН 6,2 + 0,3 мкмоль  $\text{CuSO}_4$ ; 7 – рН 6,2 + 5 мкмоль  $\text{CuSO}_4$ ; 8 – рН 6,2 + 50 мкмоль  $\text{CuSO}_4$

функція коренів на ранніх етапах онтогенезу, що призводить до перевищення вмісту іонів міді в клітинах. Надлишок міді спричинює утворення АФК і вільних радикалів, які, у свою чергу, здатні пошкоджувати клітинні мембрани внаслідок окиснення сульфгидрильних груп білків або підвищення ПОЛ [18]. Отримані результати узгоджуються з літературними даними. Так, за дії високих концентрацій іонів міді на проростки *Brassica jincea* L. спостерігали дозозалежне підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у коренях і меншою мірою — в листках [25].

СОД є важливим компонентом антиоксидантної системи захисту рослин і каталізує дисмутацію супероксидних аніон-радикалів з утворенням кисню й пероксиду водню [21]. Активність СОД пов'язана з інтенсивністю ПОЛ і залежить від кількості накопичених інтермедіатів. У результаті визначення активності СОД тканин коренів проростків установлено, що за дії іонів міді вона підвищувалась в усіх варіантах дослідження — як на середовищі з рН 4,7, так і з рН 6,2 (рис. 2), що може

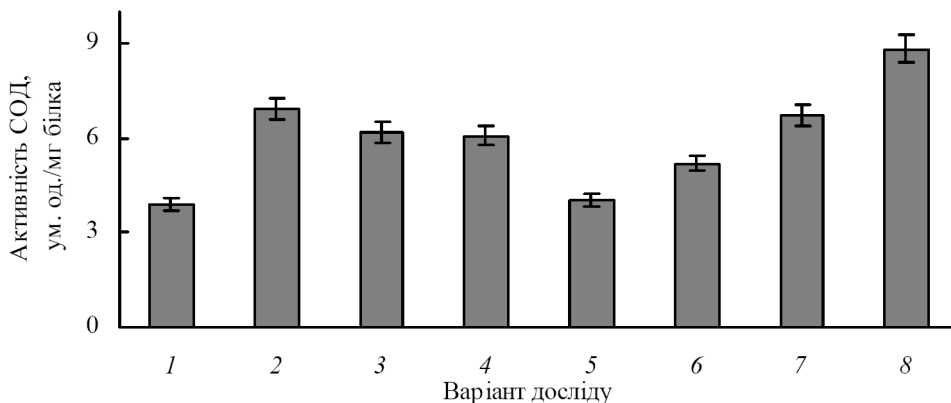


Рис. 2. Вплив сульфату міді на активність супероксиддисмутази у коренях озимої пшениці залежно від рН середовища

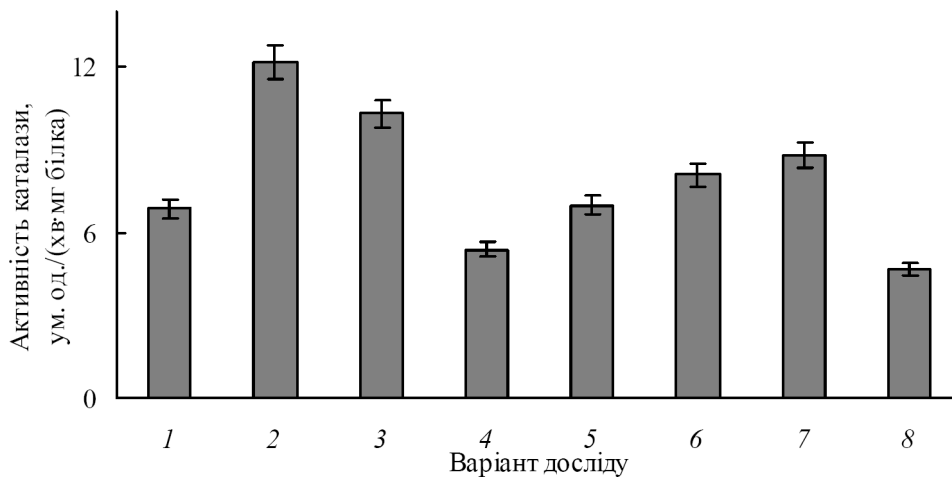


Рис. 3. Вплив сульфату міді на активність каталази у корнях озимої пшениці залежно від рН середовища

свідчити про розвиток адаптаційних процесів. Зростання активності СОД в умовах  $\text{Cu}^{2+}$ -стресу узгоджується з літературними даними [6, 8].

Пероксид водню, який утворюється в результаті реакції дисмутації, розкладається каталазою на кисень і воду [20]. Згідно з отриманими нами даними, активність каталази залежить від концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  та рН середовища (рис. 3).

З підвищенням концентрації сульфату міді активність ферменту спочатку збільшується, а потім поступово спадає. Іони міді концентрацією 50 мкМ незалежно від рН середовища викликають розвиток деградаційних процесів, оскільки на фоні накопичення ТБК-активних продуктів і високої активності СОД активність каталази знижується. СОД за цих умов може спричинити прооксидантні ефекти — накопичення  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Зниження активності каталази розглядають як загальний відгук проростка на токсичність іонів  $\text{Cu}^{2+}$ , що ймовірно виявляється в інгібуванні синтезу ферменту або збирання його субодиниць [20]. Зазначимо, що зниження рН середовища дає сильніший відгук активності каталази на зростання концентрації іонів міді у розчині.

Для характеристики розвитку адаптаційних реакцій рослин найпоказовішим є рівень загальної антиоксидантної активності тканин, що враховує співвідношення антиоксидантів і прооксидантів (рис. 4).

Як показав аналіз отриманих результатів, вирощування проростків на середовищі з рН 4,7 порівняно з контрольним варіантом (рН 6,2) є стресовим чинником, що спричинює зменшення показника антиоксидантного стану в 1,3 раза. Додавання до розчину невеликих кількостей сульфату міді (0,3 і 5 мкМ) сприяло підвищенню цього показника: на середовищі з рН 4,7 — у 2,8 та 1,8 раза порівняно з варіантом без міді; за рН 6,2 — відповідно в 1,3 та 1,5 раза. Більший вплив іонів міді на антиоксидантну активність коренів в умовах високої кислотності середовища можна пояснити підвищенням активності досліджуваної речовини [23]. Збільшення концентрації іонів  $\text{Cu}^{2+}$  до 50 мкМ у кислому середовищі призводило до зниження антиоксидантного стану до рівня варіанта 1 (без додавання сульфату міді), на середовищі з рН 6,2 цей показник був нижчим у 1,2 раза порівняно з варіантом 5. Розвиток таких процесів

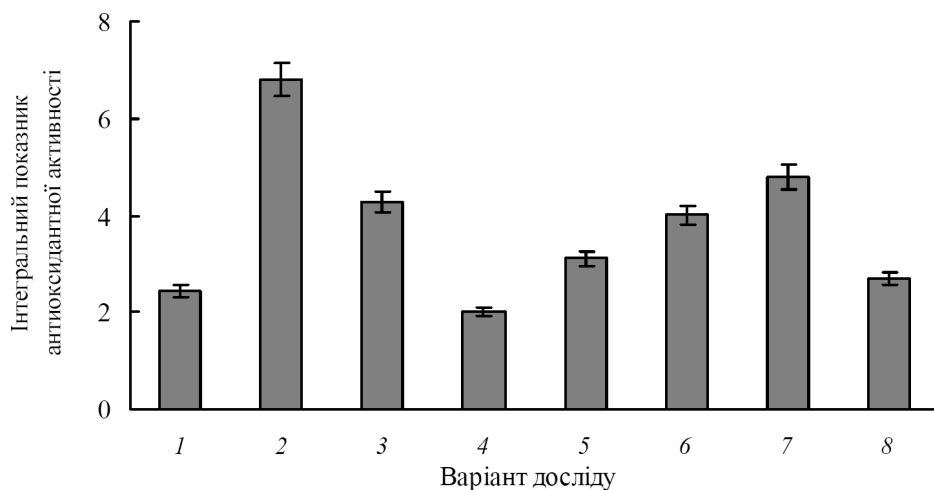


Рис. 4. Загальна антиоксидантна активність тканин коренів озимої пшениці залежно від рН середовища та концентрації іонів міді

можна пояснити з позицій теорії гормезису [19]. Згідно з цією теорією, для стресового агента характерний двофазний ефект: у малих дозах він позитивно впливає на розвиток клітини або організму, у великих — гальмує процеси розвитку або чинить токсичний ефект. У біології гормезис розглядають як адаптивний відгук клітин або організму на помірний стрес. Ймовірно, іони міді у фізіологічних концентраціях діють як сигнали, які стимулюють відповідь організму на стрес, спричиняють нелінійні модуляторні зміни ендогенно підсилених процесів.

Отже, іони міді концентраціями 0,3 і 5 мкМ стимулюють активність антиоксидантної системи у тканинах коренів проростків пшениці. Висока кислотність середовища посилює вплив іонів міді на антиоксидантну активність коренів. Розширення адаптивної пластичності рослин у разі вирощування за несприятливих умов можливе коригуванням рН середовища.

1. Балюк С.А., Фатеев А.І. Наукові та технологічні основи управління мікроелементним живленням сільськогосподарських культур: матеріали засідання бюро Президії НААН (20 червня 2012 р.) — Харків: КП Миськдрук, 2012. — 32 с.
2. Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — **42**, № 5. — С. 371—392.
3. Чевари И.С., Андел Г., Штенгер Я. Определение антиоксидантных препаратов крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. — 1991. — **10**. — С. 9—13.
4. Aeby H. Catalase in vitro // Methods Enzymol. — 1984. — **105**. — P. 121—126.
5. Alaoui-Sosse B., Genet P., Vinit-Dunand F. et al. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents // Plant Sci. — 2004. — **166**. — P. 1213—1218.
6. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**. — P. 1331—1341.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — **72**. — P. 248—254.
8. Draobzkievicz M., Skorzynska-Polit E., Krupa Z. Copper induced oxidative stress and antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana* // BioMetals. — 2004. — **17**. — P. 379—387.
9. Fageria N.K., Baligar V.C., Jones C.A. Growth and mineral nutrition of field crops. — Boca-Raton: CRC Press, 2011. — 574 p.

10. Gao S., Yan R., Cao M. et al. Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling // Plant Soil Environ. — 2008. — **54**, N 3. — P. 117–122.
11. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. — 1972. — **59**. — P. 309–314.
12. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // J. Exp. Bot. — 2002. — **53**. — P. 1–11.
13. Hegedus A., Erdei S., Horvath G. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress // Plant Sci. — 2001. — **160**. — P. 1085–1093.
14. Kanoun-Boule M., De Albuquerque M.B., Nabais C., Freitas H. Copper as an environmental contaminant: phytotoxicity and human health implications // Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health / Ed. M.N.V. Prasad. — Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008. — P. 653–678.
15. Klotz L.O. Oxidative stress, antioxidants, and chemoprevention: on the role of oxidant-induced signaling in cellular adaptation // Recent advances in redox active plant and microbial products. From basic chemistry to widespread applications in medicine and agriculture / Eds C. Jacob, G. Kirsch, A. Slusarenko et al. — Heidelberg: Springer, 2014. — P. 119–146.
16. Kobuta I., Sikachyna O., Zhygadlo V. Wheat export economy in Ukraine // Policy studies on rural transition. — 2012. — N 4. — 56 p. — Режим доступа: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/c83d71e2-9ced-5737-9e55-2b046d0bf7d1/>
17. Kumar G.N.M., Knowles N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers // Plant Physiol. — 1993. — **102**. — P. 115–124.
18. Liu J., Xiong Z.T., Li T.Y., Huang H. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from copper contaminated and non-contaminated sites // Environ. Exp. Bot. — 2004. — **52**. — P. 43–51.
19. Mattson M.P. Hormesis defined // Aging Res. Rev. — 2008. — **7**, N 1. — P. 1–7.
20. Meng Q., Zou J., Zou J. et al. Effect of Cu<sup>2+</sup> concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.) // Acta Biol. Crac.: botanica. — 2007. — **49**, N 1. — P. 95–101.
21. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. — 2002. — **7**. — P. 405–410.
22. Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M. et al. Copper cofactor delivery in plant cells // Curr. Opin. Plant Biol. — 2006. — **9**. — P. 256–263.
23. Rengel Z. Soil pH, Soil Health and Climate Change // Soil Health and Climate Change / Eds B.P. Singh, A.L. Cowie, K.Y. Chan. — Heidelberg: Springer, 2011. — P. 69–85.
24. Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signalling pathways in higher plant cells // Int. J. Biol. Sci. — 2008. — **4**. — P. 8–14.
25. Wang S., Yang Z., Yang H. et al. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. // Bot. Bull. Acad. Sin. — 2004. — **45**. — P. 203–212.
26. Yruela I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions // Functional Plant Biol. — 2009. — **36**. — P. 409–430.

Отримано 24.09.2015

#### ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ И pH СРЕДЫ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

М.Е. Рязанова<sup>1</sup>, Л.М. Бацманова<sup>2</sup>, М.С. Коваленко<sup>2</sup>, Л.Н. Михальская<sup>1</sup>, В.В. Швартау<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Исследовано влияние ионов меди и pH среды на активность ферментов антиоксидантной системы и пероксидное окисление липидов в тканях корней проростков озимой пшеницы. Установлено, что при добавлении в среду небольших количеств сульфата меди (0,3; 5 мкмоль) антиоксидантная активность в тканях корней пшеницы повышается. Возрастная кислотности раствора для проращивания усиливает влияние ионов Cu<sup>2+</sup> на растения озимой пшеницы.

EFFECT OF COPPER IONS AND pH OF MEDIUM ON ANTIOXIDANT ACTIVITY IN  
ROOT TISSUES OF WINTER WHEAT SEEDLINGS

*M.E. Riazanova<sup>1</sup>, L.M. Batsmanova<sup>2</sup>, M.S. Kovalenko<sup>2</sup>, L.M. Mykhalska<sup>1</sup>, V.V. Schwartau<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv  
64 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

Effect of Cu<sup>2+</sup> ions and pH of medium on lipid peroxidation and activity of root tissues antioxidant system of winter wheat seedlings was investigated. It was found that low copper sulphate concentrations (0.3; 5 μM) rise the antioxidant activity in root tissues of wheat plants. Effect of copper ions on wheat plants increased under low pH.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., Cu<sup>2+</sup>, superoxide dismutase, catalase, peroxidation of lipids, pH.