



УДК 54.024;546.21

© 2010

В. В. Бараненко

## Активні форми кисню у процесі росту коренів *Pisum sativum* L.

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Є. Л. Кордюм)

Вивчено утворення активних форм кисню (АФК), зокрема супероксидних аніон-радикалів ( $O_2^-$ ) та пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) у коренях 3–5-добових проростків гороху. За допомогою модифікаторів рівня АФК (антиоксидантів та прооксидантів) перевірено їх участь у процесах росту та розвитку коренів. Локалізацію  $O_2^-$  та  $H_2O_2$  у коренях досліджено шляхом прижиттєвого забарвлення коренів нітросинім тетразолієм та 3,3'-діамінбензидином відповідно. Виявлено, що  $O_2^-$  та  $H_2O_2$  локалізуються головним чином у зонах меристеми та розтягання головного кореня і менш значно — у зоні диференціювання. Апекси бокових коренів, які починали утворюватися з 4-ї доби, також забарлювалися подібно головному кореню. Зменшення рівня АФК шляхом обробки антиоксидантами призвело до зниження росту головних коренів, тоді як зростання продукції АФК за допомогою обробки прооксидантами, навпаки, — до подовження головних коренів та зниження росту бокових коренів порівняно з контрольними зразками. Обговорено участь АФК у процесах росту та розвитку коренів гороху.

Активні форми кисню (АФК) є звичайними метаболітами, похідними молекулярного кисню, що постійно утворюються в клітинах і тканинах рослин. АФК продукуються практично в усіх компартментах клітини, а також в апопласті [1–3].

Первинним продуктом одноелектронного відновлення молекулярного кисню є супероксидний аніон-радикал ( $O_2^-$ ). Потім, під час його дисмутації спонтанно чи за участю супероксиддисмутази, утворюється пероксид водню ( $H_2O_2$ ). Надалі за участю  $O_2^-$  та  $H_2O_2$  у присутності металів змінної валентності формуються надзвичайно реактивні гідроксильні радикали ( $OH\cdot$ ), які не мігрують від місць свого утворення, а, утворившись, негайно взаємодіють з найближчою молекулою свого оточення.

Рівень АФК за звичайних умов функціонування такої, що виключає накопичення окиснювальних пошкоджень. Проте за умов дії несприятливих факторів, зокрема високих чи низьких температур, посухи чи затоплення, засолення, інфікування патогенними мікроорганізмами рівень АФК зростає [2, 4, 5]. Щодо ролі АФК, їх тривалий час розглядали як агентів окиснювальної деструкції, і більшість пошкоджень за несприятливих впливів по-

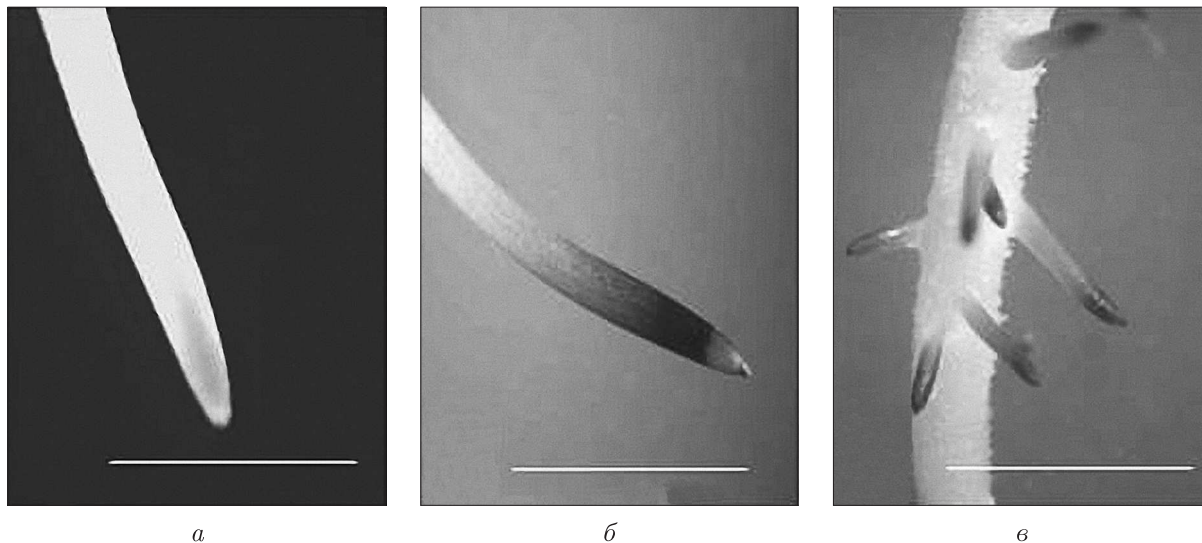


Рис. 1. Загальний вигляд апексів коренів проростків гороху (б) та бокових коренів (в) після забарвлення 0,5 мМ розчином НСТ; а — незабарвлений контроль. Масштаб: 5 мм

в'язували саме з дією АФК [6]. І це дійсно так. Проте протягом останнього десятиріччя накопичилися нові дані щодо ролі АФК, зокрема відмічено їх важливу участь у процесах росту та розвитку рослин [7, 8]. Тобто АФК можуть виконувати подвійну роль в онтогенезі рослин: за одних умов спричинювати окиснювальні пошкодження важливих внутрішньоклітинних компонентів, а за інших — бути необхідними для росту та розвитку.

Метою проведеного дослідження було вивчити утворення АФК, зокрема супероксидних аніон-радикалів ( $O_2^-$ ) та пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), в коренях проростків гороху та перевірити їх участь у процесах росту коренів.

**Матеріал та методи дослідження.** Для вивчення локалізації супероксидних аніон-радикалів у коренях гороху здійснювали прижиттєве забарвлення коренів 3–5-добових проростків гороху (*Pisum sativum* L.) 0,5 мМ розчином нітросинього тетразолію (НСТ) [9] та розчином 3,3'-діамінбензидину (1 мг/мл) — для виявлення пероксиду водню [5]. Вміст супероксидних радикалів в окремих зонах коренів гороху визначали з використанням НСТ згідно з [10].

Для з'ясування участі АФК у процесах росту коренів рослини обробляли розчинами, які змінюють (підвищують чи знижують) рівень АФК, і при цьому вивчали інтенсивність росту коренів. У дослідженнях були використані розчини аскорбінової кислоти (5; 10; 15 мМ) та пірогалолу (0,5, 1, 3 мМ), які знижують загальний вміст АФК, розчини бензоату натрію (0,5, 1, 5 мМ) та йодиду калію (0,5, 1, 5 мМ), які є інгібіторами  $OH^\cdot$  та  $H_2O_2$  відповідно, суміш Фентона, яка сприяє утворенню  $OH^\cdot$ , та розчин  $H_2O_2$  (0,5 та 1 мМ). Наведені в роботі результати досліджень отримано з використанням середніх концентрацій розчинів, оскільки високі концентрації спричиняли значне пригнічення росту коренів та їх пожовтіння, тобто були токсичними для рослин.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Прижиттєве забарвлення коренів проростків гороху розчином нітросинього тетразолію показало локалізацію барвника і, відповідно, супероксидних радикалів головним чином у зоні меристеми та дистальній частині зони розтягання (рис. 1, а, б). У центральній зоні розтягання забарвлення було менш інтенсив-

ним, у зоні диференціювання — майже відсутнє. Апекси бокових коренів, які починали утворюватися з 4-ї доби, також забарвлювалися, аналогічно головному кореню (див. рис. 1, *в*). З початком росту бокових коренів інтенсивність забарвлення апекса головного кореня зменшувалася. Реєстрація вмісту супероксидних радикалів підтвердила найбільшу їх кількість у зоні меристеми; у зонах розтягання та диференціювання їх кількість становила 65 та 24% відповідно від вмісту у зоні меристеми (табл. 1).

На поперечних зрізах кореня забарвленими виявилися епідерміс, субепідермальний шар кори та провідна система.

Прижиттєве забарвлення коренів гороху розчином ДАВ виявило локалізацію пероксиду водню в зонах меристеми та розтягання, як і у випадку супероксидних аніон-радикалів. У зоні диференціювання наявність  $H_2O_2$  відмічено в бокових коренях у зонах, що активно ростуть.

Обробка рослин розчинами, які змінюють рівень АФК, показала, що зростання чи зменшення вмісту АФК у коренях супроводжується змінами в швидкості росту та морфології коренів. При обробці проростків розчинами аскорбату та пірогалолу, які знижують загальний вміст АФК, та розчинами бензоату натрію та йодиду калію, які зменшують вміст окремих АФК, відмічено інгібування росту головних коренів порівняно з коренями проростків, які зростали на дистильованій воді (див. табл. 1; рис. 2, *б, в*).

Обробка рослин розчинами, які сприяють підвищенню вмісту АФК (пероксид водню, суміш Фентона), навпаки, призвела до посилення росту головних коренів, тоді як ріст бокових коренів інгібувався (табл. 2; див. рис. 2, *г, д*). До того ж головні корені були тоншими за корені контрольних проростків.

Отже, отримані результати досліджень свідчать про те, що в тих зонах головного та бокових коренів, де відбувається активний поділ клітин та їх ріст розтяганням, має місце інтенсивне продукування АФК. Припущення, що АФК задіяні в процесах росту коренів, зокрема в довжину, підтверджується результатами обробки рослин розчинами — модифікаторами рівнів АФК. Механізм дії АФК при цьому повністю не з'ясований. Розглядається участь гідроксильних радикалів у розм'якшенні клітинних стінок шляхом окиснення їх полісахаридів, зокрема карбогідратів, внаслідок чого полегшується ріст клітин роз-

Таблиця 1. Вміст супероксидних аніон-радикалів у ростових зонах коренів гороху, мкМ/г сирі маси, %

Умови вирощування	Зона меристеми	Зона розтягання	Зона диференціювання
Дистильована вода	92,37 ± 7,1 (100%)	60,12 ± 4,2 (65%)	22,46 ± 1,5 (24%)
Аскорбінова кислота (10 мМ)	61,35 ± 5,2 (66%)	26,64 ± 1,7 (28,8%)	18,25 ± 1,2 (20%)
Пропілгалат (1 мМ)	57,73 ± 4,1 (63%)	22,14 ± 1,4 (24%)	16,51 ± 1,1 (18%)

Таблиця 2. Довжина головного кореня 3-добових проростків гороху за умов обробки рослин модифікаторами рівня АФК

Модифікатори рівня АФК	Довжина головного кореня, см
$H_2O_2$ (контроль)	9,6 ± 0,7 (100%)
Аскорбінова кислота, 10 мМ	8,6 ± 0,6 (89%)
<i>n</i> -пропілгалат, 1 мМ	8,1 ± 0,7 (84%)
Na-бензоат, 1 мМ	7,8 ± 0,5 (81%)
KI, 1 мМ	8,4 ± 0,6 (88%)
$H_2O_2$ , 0,5 мМ	10,75 ± 0,8 (112%)
ОН <sup>-</sup> -генеруюча суміш (суміш Фентона)	11,0 ± 0,7 (115%)

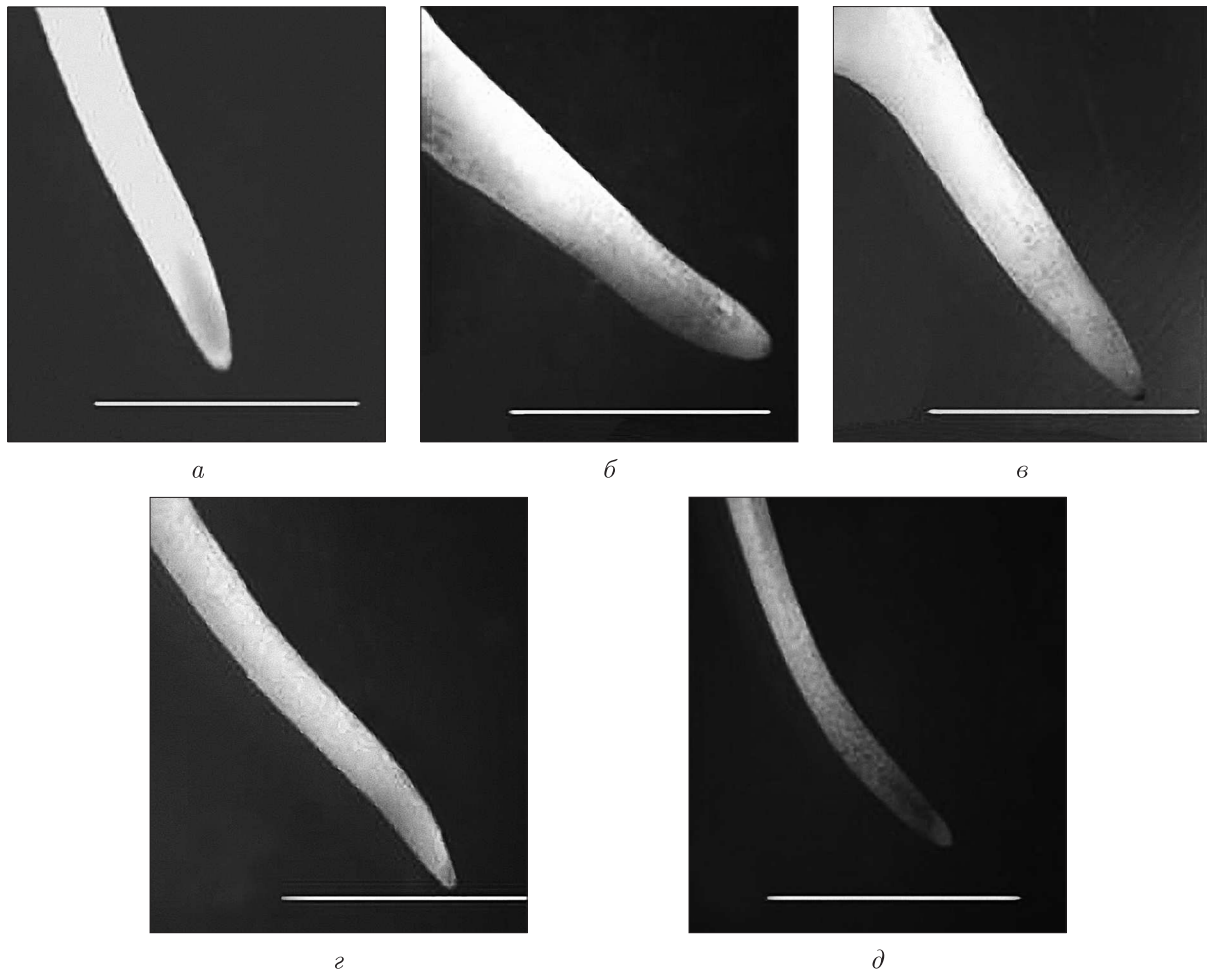


Рис. 2. Загальний вигляд апексів коренів проростків гороху після обробки модифікаторами рівня АФК: *a* — незабарвлений контроль; *б* — +аскорбат, +НСТ; *в* — +пропілгалат, +НСТ; *г* — +ОН<sup>-</sup>-генеруюча суміш, -НСТ; *д* — +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, +НСТ). Масштаб: 5 мм

тяганням [11]. Участь пероксиду водню та супероксидних аніон-радикалів у рості клітин у довжину, очевидно, пояснюється тим, що дані АФК є джерелом утворення гідроксильних радикалів. Крім того, АФК можуть брати самостійну участь в індукції інших механізмів, задіяних у процесах росту. Відомо, що зростання рівнів АФК за різних впливів є своєрідним тригером, що запускає включення інших систем, задіяних у перебудові метаболізму клітин за нових умов існування [8, 12]. Зокрема, обговорюються різні аспекти взаємозв'язку між АФК та іонами кальцію [12, 13], цитоскелетом [14], фітогормонами [13, 15]. Відмічено, що АФК активують Ca<sup>2+</sup>-канали [12, 13], тобто вони можуть сприяти утворенню градієнта кальцію, необхідного для полярного росту кореневих волосків. Таким чином, участь АФК у процесах росту коренів може бути безпосередньою та/чи опосередкованою (сигнальною) через включення систем, задіяних у даних процесах.

Також необхідно зазначити, що зростання АФК під час росту коренів є тимчасовим; зниження інтенсивності росту коренів супроводжується зменшенням рівнів АФК. Ще одне, очевидно, зростання АФК під час росту коренів відбувається лише до певного рівня, оскільки значне підвищення рівнів АФК (у 2,3 раза) при обробці проростків високими концентра-

ціями модифікаторів супроводжувалося пригніченням росту коренів, тобто було токсичним для рослин.

Таким чином, базуючись на результатах досліджень, можна зробити такі висновки. Інтенсивне утворення супероксидних аніон-радикалів та пероксиду водню відбувається в зонах меристеми та розтягання головного і бокових коренів проростків гороху, тобто у тих зонах коренів, які активно діляться та ростуть розтягом. Зменшення інтенсивності росту головного кореня супроводжується зниженням рівня АФК, тобто зростання кількості АФК під час росту є тимчасовим. Участь АФК у процесах росту може бути безпосередньою чи/та опосередкованою через активацію ними інших сигнальних систем та експресію генів. АФК задіяні в процесах росту коренів на певному фізіологічному рівні, підвищення якого призводить до інгібуючої дії.

1. *Asada K.* Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**. – P. 391–396.
2. *Hernandez J. A., Ferrer M. A., Jimenez A. et al.* Antioxidant systems and  $O_2^-/H_2O_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins // *Ibid.* – 2001. – **127**. – P. 817–831.
3. *Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.-P.* Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria // *Physiol. Plant.* – 2007. – **129**, No 1. – P. 185–195.
4. *Kotchoni S. O., Gachomo E. W.* The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants // *J. Biosci.* – 2006. – **31**, No 3. – P. 389–404.
5. *Romero-Puertas M. C., Rodeigues-Serrano M., Corpas F. J. et al.* Cadmium-induced subcellular accumulation of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  in pea leaves // *Plant, Cell & Environment.* – 2004. – **27**, No 9. – P. 1122–1134.
6. *Мерзляк М. Н.* Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. – Москва: ВИНТИ, 1989. – 167 с. – (Итоги науки и техники. Сер. физиология растений; Т. 6).
7. *Gapper C., Dolan L.* Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species // *Plant Physiol.* – 2006. – **141**, No 2. – P. 341–345.
8. *Pitzschke A., Forzani C., Hirt H.* Reactive Oxygen Species Signaling in Plants // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2006. – **8**, No 9–10. – P. 1757–1764.
9. *Bielski B. H. J., Shine G. G., Bajuk S.* Reduction of nitro blue tetrazolium by  $CO_2^-$  and  $O_2^-$  radicals // *J. Phys Chem.* – 1980. – **84**. – P. 830–833.
10. *Green M. J., Hill M. A. O.* Chemistry of dioxygen // *Methods Enzymol.* – 1984. – **105**. – P. 3–22.
11. *Schopfer P.* Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth // *Plant J.* – 2001. – **28**, No 6. – P. 679–688.
12. *Demidchik V., Shabala S. N., Coultts K. B. et al.* Free oxygen radicals regulate plasma membrane  $Ca^{2+}$ - and  $K^+$ -permeable channels in plant root cells // *J. Cell Sci.* – 2003. – **116**, No 1. – P. 81–88.
13. *Mori I. C., Schroeder J. I.* Reactive oxygen species activation of plant  $Ca^{2+}$  channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // *Plant Physiol.* – 2004. – **135**, No 2. – P. 702–708.
14. *Yun B.-W., Atkinson H. A., Gaborit C. et al.* Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in Arabidopsis against wheat powdery mildew // *Plant J.* – 2003. – **34**. – P. 768–777.
15. *Kwak J. M., Mori I. C., Pei Z.-M. et al.* NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis // *EMBO J.* – 2003. – **22**. – P. 2623–2633.

## Reactive oxygen species in growth of *Pisum sativum* L. roots

*Reactive oxygen species (ROS), the superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), in roots of 3–5-day-old *Pisum sativum* L. seedlings are investigated. The effects of changing the levels of ROS by antioxidants and prooxidants on the root growth and development are studied. Both  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  localizations are assessed by light microscopy, using nitroblue tetrazolium and 3,3'-diaminebenzidine, respectively. Superoxide radicals and hydrogen peroxide were predominantly located in the meristem and the elongation zone, and in minor in the differentiation zone of main roots. Apices of lateral roots, which begin to be formed from the 4th day, are stained analogously to main roots. Treatments by antioxidants that decrease the ROS concentration reduce the root elongation, while the increasing of ROS production due to the treatment by prooxidants promoted the root elongation and suppressed the root hair formation. The respective roles of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  in the root growth and development are discussed.*