

УДК 581.1:633/35:577.125:504.73

РЕГУЛЮВАННЯ АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЙ ПРОРОСТКІВ СОЇ СІРКОЮ ЗА УМОВ СВИНЦЕВОГО ЗАБРУДНЕННЯ

О.В. СИТАР

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01033 Київ, вул. Володимирська, 64
e-mail: o_sytar@ukr.net*

За накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів, зміною активності антиоксидантних ферментів та вмісту вільних і білкових тіолів досліджено особливості адаптивної реакції, можливість її регулювання сіркою у фотосинтетичних тканинах проростків сої звичайної за дії іонів свинцю. Встановлено, що утворення неспецифічних антистресових сполук тіолової природи забезпечує ефективне регулювання сіркою адаптивних реакцій проростків сої за наявності іонів свинцю. Під впливом сірки підвищується активність як ферментативних (зростає активність СОД на 6-ту годину експозиції), так і неферментативних (збільшується вміст вільних тіолів на 48-му годину експозиції) антиоксидантних систем. Проростки сої, вирощені на поживному середовищі із додаванням сірки, характеризувались ранішою, тривалішою і стабільнішою реакцією на дію іонів свинцю.

Ключові слова: соя, адаптивні реакції, іони свинцю, пероксидне окиснення ліпідів, сульфохіновозилдіацилгліцерол, вільні тіоли, білкові тіоли, супероксиддисмутаза, каталаза.

Однією з основних умов успішного функціонування агроценозів є оптимізація живлення рослин. Для досягнення їх оптимальної продуктивності важливо дослідити зв'язок між надходженням елементів у рослину та її реакцією, що, у свою чергу, дасть змогу передбачити перебіг процесів росту і розвитку рослин в умовах підживлення певним елементом. Ґрунти нашої держави нині характеризуються підвищеним вмістом важких металів, особливо свинцю [9]. Для вирішення проблеми вирощування рослин в умовах свинцевого забруднення актуально вивчити підживлення їх сіркою — основним компонентом тіолових сполук, які знешкоджують іони свинцю в рослинному організмі [19]. В останні роки у зв'язку з екологізацією виробництва дослідники відмічають невпинне зменшення вмісту сірки в ґрунті [12], що призводить до зниження продуктивності [18] і погіршення якості врожаю рослин.

Соя, площі якої в Україні постійно зростають, споживає значну кількість сірки. У зв'язку з цим для збільшення виробництва її в нашій державі активно розробляють технології вирощування цієї культури з використанням сірковмісних добрив. Водночас дослідження, пов'язані із забезпеченням рослин сіркою, пріоритетні для отримання екологічно чистої соєвої продукції в умовах забруднення навколишнього середовища свинцем. Метою нашого дослідження було встановлення ролі сірковмісних сполук у підвищенні адаптивної здатності рослинного організму за дії іонів свинцю.

Методика

У модельних експериментах для встановлення ролі сірки в регулюванні адаптивних реакцій рослин за дії іонів свинцю сою вирощували на різних поживних середовищах — із сіркою й без сірки методом водяної культури: освітленість — 5000 лк, температура — 20–25 °С, тривалість світлового періоду — 16 год. Досліджено такі варіанти: контроль (із сіркою, +S) — $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,44, K_2HPO_4 — 0,25, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ — 0,25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3 г/л; (без сірки, –S) — $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,44, K_2HPO_4 — 0,25, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ — 0,25, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ — 0,135 г/л.

Після досягнення проростками 14-добового віку їх обробляли 0,5 мМ розчином нітрату свинцю позакореневим способом і визначали основні параметри стресового стану рослин на 6-, 24-ту і 48-му години після обробки. Рослини контрольного варіанта обприскували дистильованою водою. Повторність модельного досліду — триразова.

Специфічні зміни складу компонентів ліпід-пігментного комплексу, про- та антиоксидантної систем досліджували у фотосинтетичних тканинах сої. Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за кількістю малонового діальдегіду (МДА) на основі реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою [14] в модифікації Андреевої [1]. Активність антиоксидантних ферментів визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД) [11] і каталази [16]. Вміст сульфохіновозилдіацилгліцеролу в модельних дослідях встановлювали за методикою Кіна [15]. Кількість пігментів визначали спектрофотометрично загальноприйнятим методом [4]. Математичну обробку даних виконували методом дисперсійного аналізу за Фішером [6]. Вірогідність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Стюдента за рівня значущості $P = 0,05$.

Результати та обговорення

Аналіз літературних даних за узгодження з результатами наших експериментальних досліджень дав підставу припустити ймовірність такого перебігу фізіолого-біохімічних реакцій у фотосинтезуючих органах рослин в умовах забруднення середовища важкими металами. Першою

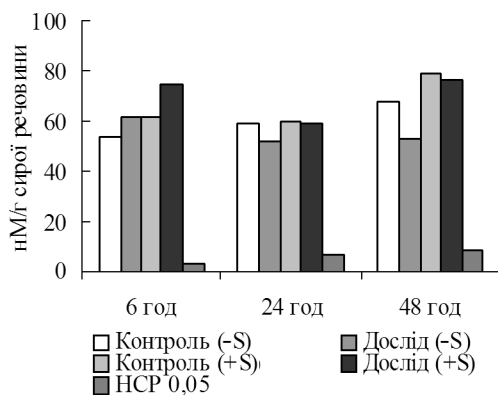


Рис. 1. Вміст малонового діальдегіду у проростках сої, вирощених без додавання і з додаванням у поживне середовище сірки, за дії іонів свинцю. Тут і на рис. 2–4:

контроль — обприскування водою, дослід — 0,5 мМ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

стрес-відповіддю на дію цього стресора є порушення антиоксидантного статусу клітини, що призводить до інтенсифікації вільнорадикальних процесів і збільшення кількості продуктів ПОЛ на 6-ту годину експозиції в обох варіантах досліду — за внесення і без внесення сірки в поживне середовище (рис. 1).

У разі надходження в рослинний організм важких металів розвивається окиснювальний стрес, який супроводжується порушенням рівноваги між швидкістю вільнорадикального окиснення й активністю антиоксидантних систем у бік накопичення активних форм кисню

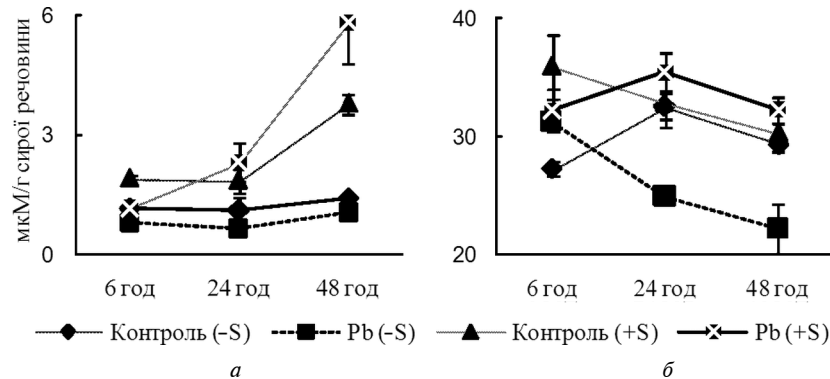


Рис. 2. Зміна вмісту вільних (а) і білкових (б) тіолів у проростках сої, вирощених без додавання і з додаванням у поживне середовище сірки, за дії іонів свинцю

(АФК) та пероксидних модифікацій макромолекул [3]. АФК також можуть відігравати роль вторинних посередників, які беруть участь у трансдукції сигнальної інформації й експресії низки генів. На сьогодні вважають, що продукти ПОЛ займають одну з ключових позицій у процесах передачі сигналів, яка визначає можливість виживання клітини у стресовій ситуації [10]. Ступінь вияву руйнівної дії АФК за впливу важких металів у тканинах залежить від потенційних можливостей організму мобілізувати фізіологічні антиоксидантні системи, а також від здатності клітин продукувати тіолові сполуки [19], захисна роль яких полягає в утворенні нешкідливих комплексів з іонами важких металів [17].

Рослини сої, вирощені на середовищі з додаванням сірки, характеризувались значно більшим вмістом тіолових сполук, що засвідчує вищу захисну здатність ферментативної системи (рис. 2). Відповідно стрес-відповідь у цих рослин на дію важких металів була тривалішою і стабільнішою, що характерно для стійкіших видів [2, 5].

Зменшення вмісту вільних тіолів на 6-ту годину експозиції в обох варіантах, може підтверджувати їх участь в усуненні супероксиду і H_2O_2 у хлоропласті через аскорбат-глутатіоновий цикл, в якому аскорбат регенерується з окисненої форми — дегідроаскорбату з неодмінним використанням відновленого глутатіону як донора електронів, оскільки останній належить до групи вільних тіолів. Крім того, вільні тіоли можуть утворювати комплекси з важкими металами і транспортувати їх до вакуолі клітини, що також супроводжується зменшенням їх вмісту.

Дослідженням вмісту білкових тіолів у рослинах, вирощених без внесення сірки, встановлено, що на 6-ту годину експозиції їх рівень зростає на 12 %, на 24-ту і 48-му години — відповідно на 13 і 24 % знижувався (див. рис. 2, б). У рослинах, вирощених на середовищі з додаванням сірки, вже на 6-ту годину експозиції спостерігалась тенденція до зменшення вмісту білкових тіолів, а на 24-ту і 48-му години їх вміст був на рівні контролю (див. рис. 2, б) на відміну від варіанта без додавання сірки в поживне середовище, коли їх вміст зменшувався. Таке зростання вмісту вільних тіолів може засвідчувати високу активність захисної системи у рослин, вирощених на середовищі з додаванням сірки, яка спрямована на знешкодження АФК, а також іонів свинцю. Отже, у рослин сої, вирощених на середовищі з додаванням сірки, стрес-відповідь на дію іонів свинцю була тривалішою і стабільнішою. Крім того, вона розпочиналась раніше — вміст сульфоліпиду, який є одним зі структур-

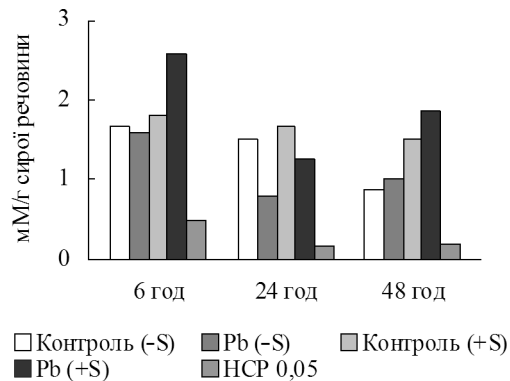


Рис. 3. Зміна вмісту сульфохіновосилідацілгліцеролу у проростках сої, вирощених без додавання і з додаванням у поживне середовище сірки, за дії іонів свинцю

но-функціональних маркерів стресового стану рослин, у перші години експозиції зростає на 41 % відносно контролю (рис. 3).

У рослин сої, вирощених без внесення сірки у поживне середовище, стрес-відповідь на свинцеве забруднення наставала пізніше (вміст сульфоліпиду на 24-ту годину експозиції зменшувався на 46 %), ніж у варіанті з додаванням сірки в поживне середовище, і характеризувалась меншою активністю неферментативної системи захисту. Через це за умов свинцевого навантаження нормальний розвиток рослин сої порушувався, що супроводжувалось деградацією фотосинтетичних пігментів, зміною нормального складу ліпідів мембран.

Разом з цим толерантність рослин до важких металів може одночасно формуватись за кількома адаптивними механізмами. Крім неферментативної системи захисту в адаптивній реакції важливу роль відіграє антиоксидантна система, активність якої залежить від накопичення інтермедіатів ПОЛ (пероксидів жирних кислот, альдегідів, кетонів, інших продуктів), які, у свою чергу, спричинюють зміну активності певних антиоксидантних ферментів.

Згідно з дослідженнями деяких авторів, іони важких металів, такі як Ni^{2+} , Co^{2+} , пригнічують активність каталази і СОД, стимулюють ПОЛ, окиснення НАДН і НАДФН [8]. Активність супероксиддисмутази сильніше пригнічується у менш стійких до важких металів рослин [3], що і спостерігалось на 6-ту годину у варіанті без внесення сірки в поживне середовище (рис. 4). Водночас активність каталази на 6-ту годи-

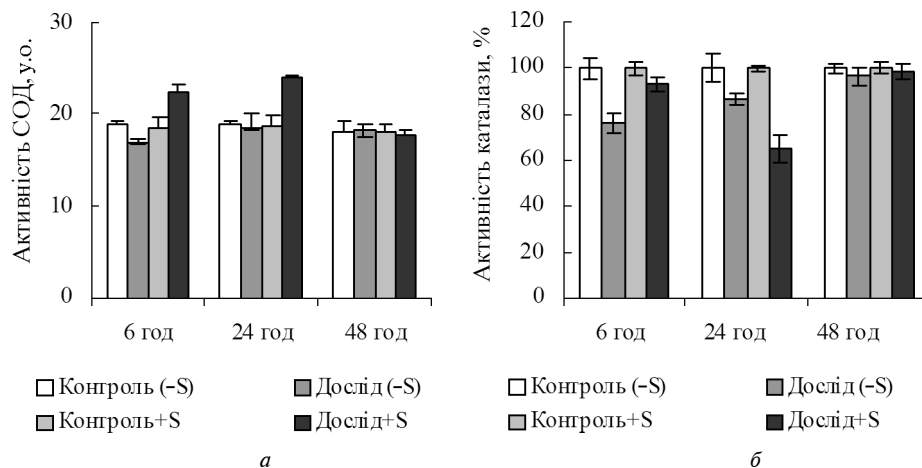


Рис. 4. Активність супероксиддисмутази (а) та каталази (б) у проростках сої, вирощених без додавання і з додаванням у поживне середовище сірки, за дії іонів свинцю

ну експозиції зменшувалась на 24 %. Характерно, що тенденція до пригнічення її активності зберігалась і на 24-ту годину експозиції.

Зниження активності каталази може бути спричинене як інактивацією ферменту свинцем, так і пригніченням білкового синтезу внаслідок підвищеного генерування АФК [13]. Інтенсивне збільшення кількості АФК є наслідком руйнування захисної системи клітини, що підтверджує пригнічення активності СОД. Також зниження активності каталази і СОД може бути пов'язане зі зміщенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у бік посилення генерування АФК і залучення їх до процесів окиснення ліпідів мембран.

У наших дослідах у проростків сої, вирощених на середовищі з додаванням сірки, за дії іонів свинцю виявлено підвищення активності СОД на 6-ту годину експозиції, що пов'язано з пригніченням інтенсивності вільнорадикального процесу ПОЛ і може бути наслідком адаптивної перебудови мембран та кращого їх функціонування за стресових умов. Внесення сірки в поживне середовище сприяло збільшенню вмісту вільних тіолів, що ослаблювало деградувальну дію іонів важких металів унаслідок їх зв'язування, що підтверджує відсутність значного зменшення вмісту фотосинтетичних пігментів.

На підставі отриманих нами результатів можна припустити, що регулювальна дія сірки пов'язана з посиленням захисних функцій і розвитком у проростків більш ранньої стрес-відповіді, ніж у рослин, вирощених без додавання сірки в поживне середовище. Оскільки сірка входить до складу таких сірковмісних сполук, як сульфоліпід і тіолові сполуки, її внесення в поживне середовище забезпечує рослинний організм у процесі росту достатньою кількістю цього мікроелемента. Функціональна здатність аскорбат-глутатіонового циклу, а також синтез похідних глутатіону залежить від концентрації антиоксидантів і споріднених активних ферментів. Ці параметри є певними маркерами антиоксидантних систем [17], які у проростках сої, вирощених на поживному середовищі з додаванням сірки, за наявності іонів свинцю функціонують значно ефективніше. Отже, внесення сірки в поживне середовище забезпечує збільшення вмісту як вільних, так і білкових тіолів, а за наявності іонів свинцю сприяє підтриманню оптимального рівня АФК внаслідок значно вищої активності аскорбат-глутатіонового циклу. Набагато більший вміст вільних тіолів за впливу іонів свинцю зменшує негативний вплив окиснювального стресу на вміст пігментів і ліпідів мембран у результаті утворення комплексів важкого металу з SH-групами тіолових сполук. Підживлення сіркою інтенсифікує метаболічні процеси, що, у свою чергу, забезпечує синтез достатньої кількості фітохелатинів для детоксикації іонів свинцю, а це значно підвищує толерантність рослин сої в умовах свинцевого забруднення.

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. — 1988. — № 11. — С. 41—43.
2. Бессонова В.П., Лыженко И.И. Перекисное окисление липидов в вегетативных и генеративных органах растений — показатель загрязнения среды тяжелыми металлами // Экологические проблемы охраны живой природы. — М., 1990. — Ч. 2. — С. 89.
3. Бессонова В.П. Цитофизиологические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. — Запорожье: Изд-во Запорож. ун-та, 1999. — 208 с.
4. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. — М.: Высш. шк., 1975. — 392 с.

5. *Гуральчук Ж.З.* Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. — 1994. — **26**, № 2. — С. 107—117.
6. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 350 с.
7. *Рудакова Э.В., Каракис К.Д., Сидоршина Т.Н.* Роль клеточных оболочек растений в поглощении и накоплении ионов металлов // Физиология и биохимия культ. растений. — 1989. — **20**, № 1. — С. 3—11.
8. *Серегин И.В., Иванов В.Б.* Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. — 2001. — **48**, № 4. — С. 606—630.
9. *Скопецька О.В., Косик О.І., Мусієнко М.М.* Комплексний еколого-фізіологічний аналіз міграції та нагромадження свинцю в агроекосистемах // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — **36**, № 1. — С. 27—35.
10. *Чиркова Т.В., Новицкая Л.О., Блохина О.Б.* Перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных систем при аноксии у растений с разной устойчивостью к недостатку кислорода // Физиология растений. — 1998. — **45**, № 1. — С. 65—73.
11. *Beachamp C.O., Fridovich I.* Izozyme of superoxide dismutase from wheat germ // Biochem. Biophys. Acta. — 1973. — **317**. — P. 50—64.
12. *Seccoti S., Messick D.* Plant nutrient sulphur: A global review of crop requirements, supply, and environmental impact on nutrient balance // Norweg. J. Agr. Sci. — 1994. — **85**. — P. 7—25.
13. *Fridovich I.* Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters // J. Biol. Chem. — 1997. — **272**. — P. 18515—18517.
14. *Heath R.L., Packer L.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. — 1968. — **125**, N 1. — P. 189—198.
15. *Kean E.* A rapid sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of sulfatides // J. Lipid Res. — 1968. — **8**, N 3. — P. 319—329.
16. *Kumar C.N., Knowles N.* Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum* L.) seed-tubers // Plant Physiol. — 1993. — **102**. — P. 115—124.
17. *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.
18. *Schlung E., Haneklaus S.* Significance of interactions between sulfur and nitrogen supply for growth and quality of crop plant // Sulfur Nutrition and Sulfur assimilation in Higher Plants: Mol., Biochem. and Physiol. Aspects. — 2000. — P. 345—347.
19. *Tausz M., Gullner G., Komives T., Grill D.* The role of thiols in plant adaptation to environmental stress // Sulfur in Plants. — Kluwer Acad. Publ., 2003. — P. 221—244.

Отримано 13.07.2009

РЕГУЛЯЦИЯ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ПРОРОСТКОВ СОИ СЕРОЙ В УСЛОВИЯХ СВИНЦОВОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

О.В. Ситар

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

По накоплению продуктов пероксидного окисления липидов, изменению активности антиоксидантных ферментов, содержания свободных и белковых тиолов исследованы особенности адаптивной реакции, возможность ее регуляции серой в фотосинтетических тканях проростков сои обыкновенной под действием ионов свинца. Установлено, что образование неспецифических антистрессовых соединений тиоловой природы обеспечивает эффективную регуляцию серой адаптивных реакций проростков сои при наличии ионов свинца. Под влиянием серы повышается активность как ферментативных (возрастает активность СОД на 6-й час экспозиции), так и неферментативных (увеличивается содержание свободных тиолов на 48-й час экспозиции) антиоксидантных систем. Проростки сои, выращенные на питательной среде с добавлением серы, характеризовались более ранней, продолжительной и стабильной ответной реакцией на действие ионов свинца.

REGULATION OF SOYA PLANT ADAPTIVE REACTIONS BY SULPHUR IN
CONDITIONS OF LEAD POLLUTION

O.V. Sytar

Taras Shevchenko Kyiv National University
64 Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine

Basing on accumulation of lipid peroxidation products, antioxidative enzymes (superoxid dismutase and catalase) activity and free and protein thiol content in soya plant photosynthetic tissues peculiarities of adaptive reaction and the opportunity of its regulation by sulphur at lead ion action were studied. It was established, that sulphur promotes effective regulation of adaptive reactions via formation of nonspecific antistress substances of the thiol nature, that in turn promotes increase in antioxidant activity, as enzymatic (superoxid dismutase activity increases at 6th hour of exposition), so and nonenzymatic systems of protection (the free thiol content increases). Soya plants grown on a nutrient solution with sulphur was characterized by development of stable early reaction to the lead action.

Key words: soya, adaptation, lead, lipid peroxidation, sulphoquinovosyl diacylglycerol, free thiol, protein thiol, superoxid dismutase, catalase.