

ПРОТЕКТОРНАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ© А. Р. Еникеев^{1*}, И. Ю. Усманов¹, З. Ф. Рахманкулова²

¹Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450074 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.
E-mail: enikeev.aleksandr@mail.ru

²Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН
Россия, 127276 г. Москва, ул. Ботаническая, 35.
E-mail: zulfirar@mail.ru

В работе было изучено влияние экзогенной аскорбиновой кислоты на растения пшеницы *Triticum aestivum* L., подвергнутых воздействию повышенной концентрации тяжелых металлов на примере кадмия, который вызывал снижение ростовых параметров, способствовал резкому ухудшению энергетического баланса и развитию окислительного стресса. Аскорбиновая кислота оказывала защитный эффект, который выражался в повышении значений морфометрических показателей, стабилизации энергетического баланса и уменьшении перекисного окисления липидов (ПОЛ). Выявлена положительная корреляция между изменением энергетического и редокс-балансов при токсических концентрациях кадмия и протекторном действии аскорбиновой кислоты. Обсуждается роль аскорбата в регуляции энергетического обмена в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., фотосинтез, дыхание, аскорбиновая кислота, кадмий, окислительный стресс.

Введение

Проблема устойчивости растений занимает важное место в физиологии растений. Избыток тяжелых металлов (ТМ) в почве – распространенный стрессовый фактор, нарушающий рост и развитие растений, повреждающий липидные мембраны, белки и нуклеиновые кислоты в клетках, вызывающий повышенное образование активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, приводящий к окислительному стрессу [1]. Это, в свою очередь, ведет к усилению активности защитных систем у растительного организма [2]. Реакция растений на действие кадмия носит неспецифичный характер и аналогична реакции растений на действие других тяжелых металлов [3].

Кадмий попадает в ткани растений через поглощающую систему корней вместе с ионами, необходимыми для минерального питания [4]. Доказана связь между кадмиевым стрессом у растений и увеличением содержания АФК в клетках, однако известно, что Cd не участвует в окислительно-восстановительных процессах и не способен продуцировать АФК через реакцию Фентона [5]. Изменение редокс-статуса клеток обусловлено негативным воздействием Cd на активность тиолсодержащих ферментов [6], а также на функциональность электротранспортных путей хлоропластов и митохондрий – основных источников АФК [7, 8]. В таких условиях концентрация кислородных радикалов, являющихся побочным продуктом нормального метаболизма, достигает токсических значений.

У растений имеется эффективная антиоксидативная система, регулирующая уровень АФК и препятствующая окислительному разрушению липидных мембран и белковых комплексов. Аскорбат

(Asc), играющий основную роль в ликвидации H₂O₂, возможно, является наиболее важным и мощным антиоксидантом в растениях [9, 10]. Функции этой молекулы являются на данный момент достаточно изученными [11], так выявлено ее участие в регуляции роста и развития, во многих метаболических процессах и антистрессовых механизмах. Показано, что при длительном воздействии Cd содержание Asc в клетке в восстановленной форме уменьшается [12, 13], при этом увеличивается концентрация H₂O₂ и активность ферментов аскорбат-глутатионового цикла [6]. Это указывает на участие Asc в защитных реакциях против металлиндуцированного окислительного стресса. Однако влияние аскорбата на адаптационные механизмы на уровне основных энерготрансформирующих процессов на сегодняшний день остаются малоизученным аспектом.

Целью нашей работы явилось изучение действия экзогенного аскорбата на растения пшеницы, подвергнутых действию повышенных концентраций Cd, выяснение его протекторной и регуляторной роли в установлении энергетического и редокс-балансов в клетках растений.

Материалы и методы

Объектами исследования были растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., сорта Башкирская 26. Растения выращивали в условиях водной культуры в кюветах на светоплощадке: освещенность 15 кЛк, световой период – 16 ч. Средняя температура воздуха составляла 27±2 °С, влажность воздуха 80–90 %.

Для создания условий повышенного содержания металлов в питательную среду добавляли Cd(NO₃)₂, в концентрации в 150 мкМ,

* автор, ответственный за переписку

при которой растения длительное время сохраняют жизнеспособность [14]. Для изучения влияния экзогенного Asc в кюветы добавляли 1 мкМ аскорбиновой кислоты. Растения выращивали на растворе Хогланда–Арнона. Растворы ТМ и Asc вносили на 9-ые сутки от прорастания семян. Исследования проводили на 11-суточных растениях.

В ходе экспериментов регистрировали изменение сырой и сухой массы (ΔW). Сухую массу определяли после высушивания корней и побегов растений при 90 °С в течение 24 ч. Относительную скорость роста (ОСР) рассчитывали по формуле $ОСР = \Delta W/W\Delta t$, где W – исходная сухая масса растения; Δt – время, сут. Интенсивность суммарного дыхания ($D_{сум}$) определяли манометрическим методом на аппарате Варбурга и выражали в мкл O_2 /сут на растение [15]. Истинный фотосинтез ($\Phi_{ист}$) рассчитывали, как сумму $\Delta W_{сух} + D_{сум}$.

Содержание продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [16].

Измерения проводили в 3-кратной биологической и 3-кратной аналитической повторности.

Результаты и обсуждение

Известно, что присутствие избыточных концентраций ТМ в окружающей среде приводит к нарушениям метаболизма в клетках растений и, как

следствие, отражается на их ростовых характеристиках [17]. В наших экспериментах действие Cd также приводило к угнетению роста растений. ОСР (в расчете на сухую биомассу) снижалась в 5 раз (рис. 1). Существенно уменьшалась и сырая биомасса – на 18% (рис. 2), что может быть связано с негативным влиянием ионов Cd^{2+} на поглощение и транспорт воды, а также транспирацию [14]. Снижение сухой массы целых растений на 8%, скорее всего, связано с нарушениями баланса между энерготрансформирующими процессами, вызванными, в свою очередь, воздействием на активность фотосинтетического аппарата и ферментов, участвующих в процессе дыхания.

Сухая масса растений, выращенных на растворе Asc, возросла относительно контроля на 13%. Установлен благотворный эффект Asc на растения, выращенные при повышенной концентрации ТМ. Аскорбиновая кислота способствовала трехкратному возрастанию ОСР в обоих случаях, соответственно (рис. 1).

Очевидно, что стимулирование ростовых процессов у растений в присутствии Asc по сравнению с контролем может свидетельствовать о достижении оптимального баланса между основными энергопроизводящими и энергопотребляющими процессами в клетках за счет уменьшения диссипационных затрат.

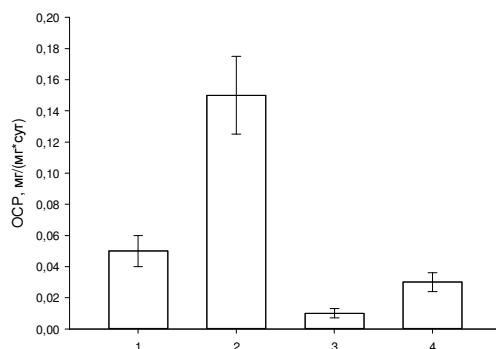


Рис.1. Относительная скорость роста (ОСР) растений пшеницы в контроле (1), при действии Asc (2), Cd (3) и Asc+Cd (4).

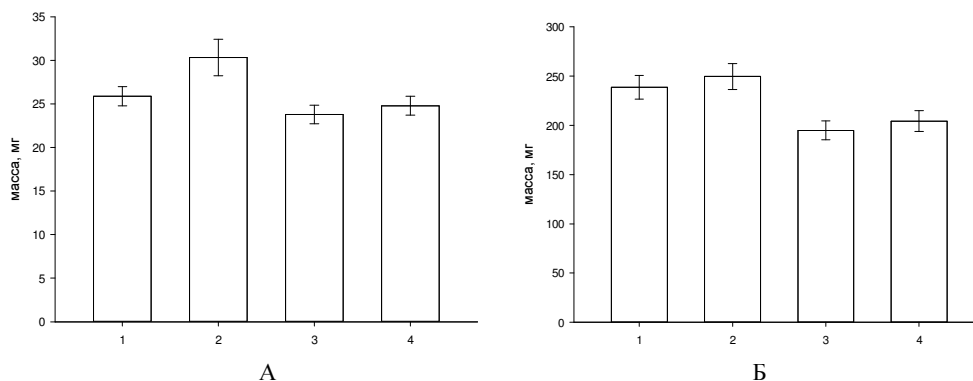


Рис. 2. Изменения в накоплении сухой (А) и сырой (Б) массы растений пшеницы в контроле (1), при действии Asc (2), Cd (3) и Asc+Cd (4).

Кроме того, показано, что Asc оказывает протекторное действие в присутствии Cd, на что указывает повышение значений ОСР у растений, выращенных на растворе содержащем и ТМ и Asc.

В ходе проведенных экспериментов мы исследовали влияние ТМ на отношение суммарного темного дыхания к истинному фотосинтезу ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$). Данный параметр является показателем физиологического состояния и сбалансированности основных физиологических процессов – фотосинтеза, дыхания, транспорта ассимилятов, роста и т.д. в растениях [18]. Известно, что данное соотношение консервативно и видонеспецифично, т.е. стремится к минимальному оптимальному отношению 38–40% [11]. Воздействие стрессовых факторов влечет за собой изменение $D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$, как правило, в сторону увеличения соотношения в результате возникновения дополнительных дыхательных затрат на адаптацию растений, возрастания диссипационных процессов или снижения истинного фотосинтеза [19]. Нами было показано, что воздействие Cd на исследуемые растения приводит к серьезному нарушению энергетического

баланса, которое выражалось в возрастании доли дыхательных затрат от истинного фотосинтеза ($D_{\text{сум}}/\Phi_{\text{ист}}$) в 2.3 раза (рис. 3). Обработка Asc растений, растущих в условиях токсических концентраций ТМ, приводила к стабилизации энергетического баланса до значения равного 40%. Интересно, что у растений, растущих вне условий кадмиевого стресса, Asc вызывал снижение доли суммарных дыхательных затрат.

Ранее было показано, что дополнительные энергетические затраты растений, подвергнутых действию стрессовых факторов, по-видимому, связаны с возрастанием доли участия альтернативного цианидрезистентного пути дыхания [17]. Воздействие Cd ведет к нарушению функций митохондрий, в которых усиливается генерация АФК. Известно, что H_2O_2 индуцирует экспрессию альтернативной оксидазы [20], чья активность ускоряет электронный транспорт через митохондриальную электрон-транспортную цепь (ЭТЦ), что, в свою очередь, способствует снижению образования АФК. Известно также, что скорость накопления АФК контролируется системой антиоксидантов [21].

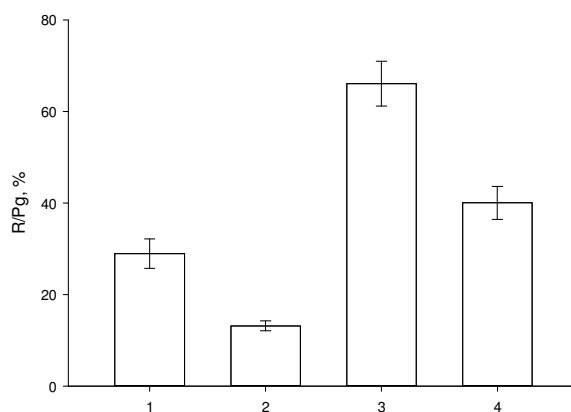


Рис. 3. Доля дыхательных затрат от gross-фотосинтеза ($\Sigma R/Pg$, %) растений пшеницы в контроле (1), при действии Asc (2), Cd (3) и Asc+Cd (4).

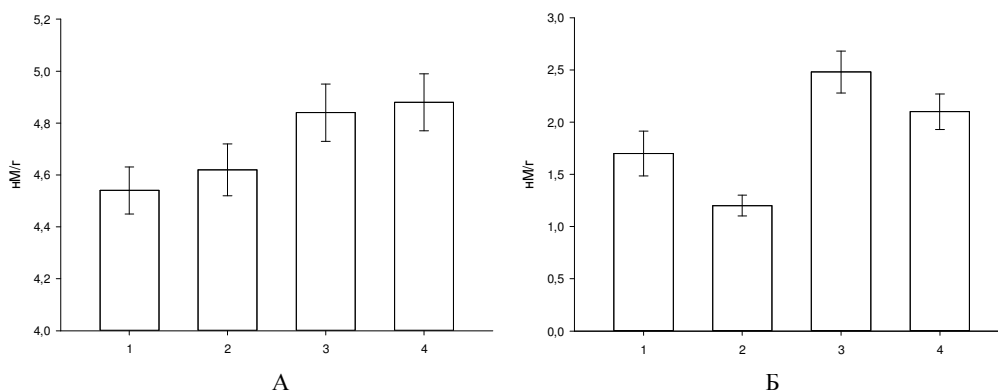


Рис. 4. Содержание малонового диальдегида (МДА, нМ/г сырой массы) в побегах (А) и корнях (Б) растений пшеницы в контроле (1), при действии Asc (2), Cd (3) и Asc+Cd (4).

Чтобы подтвердить связь изменений энергетического баланса с интенсификацией образования АФК, мы исследовали интенсивность ПОЛ, основываясь на содержании МДА в корнях и побегах растений. Являясь относительно стабильным продуктом перекисидации липидов, МДА служит удобным показателем степени окислительного стресса [4]. В присутствии Cd уровень МДА повышался (рис. 4), что указывает на интенсификацию образования АФК и нарушение про/антиоксидантного баланса. Протекторное действие Asc, препятствующее избыточному образованию АФК, наблюдалось в корнях растений, в побегах антиокислительный эффект не выражен.

Итак, показана высокая положительная корреляция между изменениями концентрации МДА в корнях и Дсум/Фист в целых растениях при действии токсических концентраций кадмия и протекторном действии Asc ($r = 0.97$ при $p < 0.05$), т.е. при нарушении энергетического баланса, вызванного действием стрессового фактора, усиливается образование АФК. В таких условиях активизируются процессы, связанные с диссипацией не востребуемой энергии, что, в свою очередь, приводит к возрастанию Дсум и установлению нового равновесия между процессами фотосинтеза и дыхания. Таким образом, подтверждена протекторная и регуляторная роль Asc, которая выражается в нейтрализации АФК и снижении степени окислительного стресса, что, в свою очередь, способствует улучшению энергетического баланса.

ЛИТЕРАТУРА

- Lijuna L., Xuemeia L., Yapinga G., Enbo M. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae) // Environ Toxicol Pharmacol. 2005. V. 20. №3. P. 412–416.
- Foyer C. H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. P. 249–279.
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Pazmiño D. M., Testillano P. S., Risueño M. C., del Río L. A., Sandalio L. M. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium // Plant Physiol. 2009. T. 150. №1. P. 229–243.
- Paradiso A., Berardino R., Pinto M. C., Toppi L. S., Storelli M. M., Tommasi F., Gara L. Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 362.
- Horemans N., Raeymaekers T., Beek K.V., Nowocin A., Blust R., Broos K., Cuypers A., Vangronsveld J., Guisez Y. Dehydroascorbate uptake is impaired in the early response of Arabidopsis plant cell cultures to cadmium // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 4307–4017.
- Paradiso A., Berardino R., Pinto M. C., Toppi L. S., Storelli M. M., Tommasi F., Gara L. Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 362–374.
- Keck R. W. Cadmium alteration of root physiology and potassium ion fluxes // Plant Physiology. 1978. V. 62. №1. P. 94.
- Sandalio L. M., Dalurzo H.C., Gómez M., Romero-Puertas M. C., Río L. A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants // J. Exp. Botany. 2001. V. 52. P. 2115–2126.
- Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants // Current Science. 2002. V. 82. P. 1227–1238.
- Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in Abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. V.48. P. 909–930.
- Blokhina O., Virilainen E., Fagerstedt K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress // Annals of Botany. 2003. V. 91. P.179–194.
- Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Feller U. Cadmium stress in barley: growth, leaf pigment, and protein composition and detoxification of reactive oxygen species // J. Plant Nutrition. 2006. V. 29. P. 451–468.
- Balestrasse K. B., Gardey L., Gallego S. M., Tomaro M. L. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress // Aust. J. Plant Physiol. 2001. V. 28. P. 497–504.
- Балахнина Т. И., Кособрюхов А. А., Иванов А. А., Креславский В. Д. Влияние кадмия на CO₂-газообмен, переменную флуоресценцию хлорофилла и уровень антиоксидантных ферментов в листьях гороха // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 21–27.
- Гавриленко В. Ф., Ладьгина М. Е., Хандобина Л. М. Определение количественных и качественных параметров дыхания // Большой практикум по физиологии растений. М.: Высш шк., 1975. С. 251.
- Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: II. Role of electron transfer // Arch. Biochem Biophys. 1968. V. 125. №3. Pp. 850–857.
- Гильванова И. Р., Еникеев А. Р., Степанов С. Ю., Рахманкулова З.Ф.. Участие салициловой кислоты и оксида азота в защитных реакциях растений пшеницы при действии тяжелых металлов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. №1. С. 103.
- Рахманкулова З. Ф. Энергетический баланс целого растения в норме и при неблагоприятных внешних условиях // Журн. общ. биологии. 2002. Т. 63. №3. С. 239–248.
- Рахманкулова З. Ф. Уровни регуляции энергетического обмена в растениях // Вестник Башкирского университета. 2009. Т. 14. №3(1). С. 1141–1154.
- Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annual Review of Plant Biology. 2004. V. 55. P. 373–399.
- Foyer C. H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses // Plant Cell. 2005. T. 17. №7. P. 1866–1875.

Поступила в редакцию 25.10.2012 г.