

Д.В. Сыщиков

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ ГЛУТАТИОНА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ *POPULUS DELTOIDES* MARSH. В УСЛОВИЯХ ЖЕЛЕЗОРУДНОГО ОТВАЛА

глутатион, отвал, стресс, листья, сезонная динамика

Введение

В формировании антиоксидантного статуса растительного организма наряду с такими известными антиоксидантами, как аскорбиновая кислота и токоферолы, активное участие принимает эндогенный антиоксидант глутатион [1]. Наряду с выполнением ряда функций в растительном организме, таких, как участие в процессах транспорта и метаболизма серы, синтезе белков и ДНК, регуляции активности ферментов, восстановленной форме глутатиона принадлежит важная роль в биохимических процессах защиты клеток от оксидативного стресса, который индуцируется разнообразными абиотическими факторами и является одной из первых реакций организма на действие токсических соединений, в частности, тяжелых металлов [2, 3]. Несмотря на широко описанную в литературе антиоксидантную функцию глутатиона при стрессовом воздействии как физической, так и химической природы [4–6], изучению сезонной динамики его содержания посвящены лишь одиночные работы, а концентрация указанного антиоксиданта при действии стрессовых факторов на протяжении вегетационного периода практически не исследовалась.

Цели и задачи исследований

Целью данной работы является выявление особенностей функционирования антиоксидантной глутатионзависимой системы на основе анализа сезонной динамики содержания восстановленной формы глутатиона в органах ассимиляции тополя дельтовидного, произрастающего в условиях железорудного отвала.

Объекты и методики исследований

Объектами исследований были отличающиеся по степени угнетения ростовых процессов растения *Populus deltoides* Marsh. (тополя дельтовидного), произрастающие на Первомайском отвале Северного горнообогатительного комбината (СевГОК) автомобильной отсыпки. Растения с незначительным угнетением ростовых процессов, произрастающие у подножия отвала в лучших эдафических условиях на зональных почвах, рассматривали в качестве условного контроля. Для определения содержания восстановленной формы глутатиона листья отбирались, начиная с фазы завершения роста и созревания листа с 1–2-летних побегов одинакового яруса и экспозиции.

Концентрация восстановленной формы глутатиона определялась по модифицированному нами методу E. Beutler [7]. Основой метода является способность SH-группы восстановленного глутатиона взаимодействовать с 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислотой (реактив Элмана) с образованием 2-нитро-6-меркаптобензойной кислоты. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию глутатиона в пробе [8].

Для определения восстановленной формы глутатиона использовали 20% гомогенат растительной ткани, приготовленный на 0,3 М калий-фосфатном буфере с pH 7,5 (соотношение ткань / буфер – 1/5). Полученный гомогенат центрифугировали 20 мин при 4000g. К 2 мл супернатанта прибавляли 3 мл осаждающего реактива (содержащего 0,3 М HPO_3 , 7 мМ трилона Б, 5 М NaCl) и проводили повторное центрифугирование на протяжении 10 мин при 4000 g, после чего в кювету с длиной оптического пути 1 см вносили 2 мл 0,3 М

калий-фосфатного буфера, 0,05 мл 1 мМ раствора реактива Элмана, 2 мл полученного супернатанта и проводили измерение оптической плотности при 412 нм на спектрофотометре СФ 2000 (Россия). На основании данных измерения оптической плотности гомогенатов растительной ткани по калибровочной кривой определяли концентрацию восстановленной формы глутатиона. Содержание последнего (G, мМ/г сырого вещества) рассчитывали по формуле:

$$G = c/Mr \times K;$$

где: c – концентрация глутатиона (мг/мл), Mr – относительная молекулярная масса глутатиона (307,3), K – коэффициент перерасчета на грамм сырого вещества (K = 5). Для построения калибровочной кривой использовали стандартные растворы восстановленной формы глутатиона [8, 9].

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась по общепринятым методам параметрической статистики на 95% уровне значимости по Б.А. Доспехову и А.А. Егоршину [10, 11]. Повторность отдельного варианта опыта составляла 5 растений, аналитическая повторность была 3-кратной.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ полученных данных позволил установить, что на начальном этапе исследований (отбор листьев в июле) не было установлено статистически достоверных различий между накоплением восстановленной формы глутатиона в органах ассимиляции различных модельных растений тополя дельтовидного как в контроле (практически неугнетенные деревья около подножия отвала), так и растений на отвале с явно выраженным угнетением ростовых процессов. Так, у первых растений содержание исследуемого трипептида находилось в пределах от 32,5 до 34,5 мМ/г сырого вещества, а у последних – от 46,7 до 48,3 мМ/г сырого вещества (таблица). Однако необходимо отметить, что концентрация антиоксиданта в листьях угнетенных растений была большей на 26–33%, чем у контрольных растений. По нашему мнению, такое преобладание содержания исследуемого трипептида может быть обусловлено с одной стороны большей напряженностью процессов антиоксидантной защиты, что, в свою очередь, приводит к интенсификации функционирования редокс цикла глутатиона с участием соответствующих глутатионзависимых ферментов (глутатион редуктазы и пероксидазы), а также возможным усилением его синтеза *de novo*. Вместе с этим полученные нами значения содержания восстановленной формы глутатиона в органах ассимиляции растений тополя дельтовидного хорошо соотносятся с аналогичными значениями для других видов древесных растений, произрастающих в неблагоприятных экологических условиях [12].

Таблица. Динамика содержания восстановленной формы глутатиона (мМ/г сырого вещества) в листьях растений тополя канадского с различной степенью угнетения ростовых процессов.

Вариант	июль	август	сентябрь	октябрь
Контроль				
Модельное дерево № 1	32,32 ± 1,17	53,85 ± 2,01	48,98 ± 2,0	43,42 ± 0,67
Модельное дерево № 2	34,46 ± 1,47	50,51 ± 1,57	48,06 ± 1,7	44,73 ± 1,21
Модельное дерево № 3	34,01 ± 0,47	53,87 ± 2,27	48,29 ± 2,87	43,68 ± 1,35
Модельное дерево № 4	32,51 ± 0,92	52,46 ± 2,14	49,26 ± 1,88	44,29 ± 1,67
Модельное дерево № 5	33,4 ± 0,3	53,69 ± 2,33	49,41 ± 2,58	44,05 ± 1,44

Окончание таблицы.

Вариант	Июль	август	сентябрь	октябрь
Среднее	33,34 ± 0,42	52,88 ± 0,65	48,8 ± 0,27	44,01 ± 0,23
Угнетенные растения				
Модельное дерево № 1	48,13 ± 2,03	61,32 ± 1,59	31,33 ± 0,81	24,61 ± 0,8
Модельное дерево № 2	46,67 ± 1,6	61,29 ± 1,95	30,89 ± 1,29	25,46 ± 0,92
Модельное дерево № 3	46,77 ± 1,72	62,71 ± 1,85	31,65 ± 1,25	24,75 ± 1,17
Модельное дерево № 4	48,31 ± 1,97	61,18 ± 1,45	31,17 ± 1,46	25,68 ± 1,07
Модельное дерево № 5	46,49 ± 1,33	63,45 ± 1,33	30,72 ± 1,26	24,16 ± 0,95
Среднее	47,27 ± 0,76*	61,99 ± 1,06*	31,15 ± 0,13*	24,93 ± 0,28*

Примечание: * – различия достоверны относительно контроля при $p \leq 0,05$

В процессе вегетации (отбор листьев в августе) наблюдалась аналогичная вышеприведенной тенденция большего содержания антиоксиданта в органах ассимиляции тополя дельтовидного с явно выраженным угнетением ростовых процессов (см. таблицу). Как и на предыдущем этапе исследований, не отмечено статистически достоверных различий в накоплении трипептида в листьях модельных деревьев одного варианта. Необходимо отметить, что напряженность влияния неблагоприятных экологических факторов (температурный стресс, недостаток влаги в грунте и др.) привела к большему возрастанию концентрации восстановленной формы глутатиона в листьях контрольных растений, чем у тополей, произрастающих на отвале, по сравнению с предыдущим этапом исследований. Так, если у первых содержание антиоксиданта увеличилось более чем на 50%, то у последних – лишь на 27–36% и, таким образом, разрыв между накоплением восстановленной формы глутатиона в листьях тополей разных вариантов исследований сократился до 12–20%. Полученные данные с одной стороны могут свидетельствовать о большем уровне образования активных форм кислорода и их метаболитов, образующихся в клетках под действием неблагоприятных факторов окружающей среды, а с другой – о постепенной исчерпаемости пула антиоксиданта в клетках значительно угнетенных растений.

На следующем этапе исследований (отбор листьев в сентябре) в ассимиляционном аппарате растений тополя дельтовидного в обоих вариантах отмечено некоторое снижение содержания восстановленной формы глутатиона. Наряду с этим, интенсивность данного процесса была большей у угнетенных растений (см. таблицу). Так, если в сравнении с предыдущим периодом концентрация антиоксиданта в листьях таких тополей уменьшилась в среднем на 50%, то у контрольных растений не было установлено статистически достоверной разницы. В данном случае резкое снижение содержания исследуемого трипептида у растений, произрастающих на отвале, привело к преобладанию концентрации антиоксиданта на 50–60% в листьях контрольных растений. Полученные данные, скорее всего, свидетельствуют о существенной исчерпаемости пула антиоксиданта на фоне смещения прооксидантно/антиоксидантного равновесия в сторону процессов пероксидации, или об оттоке восстановленной формы глутатиона в другие вегетативные органы для удовлетворения питательных потребностей растения, поскольку, согласно многочисленным литературным данным, глутатион считается главной дальней транспортной формой серы, более подходящей для депонирования и транспорта, чем L-цистеин [13–15]. Также сохраняется тенденция относительно отсутствия статистически достоверной разницы в накоплении восстановленной формы глутатиона в органах ассимиляции растений одного варианта исследований.

С последующим продолжением длительности исследований (отбор листьев в октябре) сохраняется тенденция постепенного уменьшения содержания антиоксиданта с большей интенсивностью данного процесса у растений, произрастающих на железорудном отвале. Так, если в органах ассимиляции контрольных растений тополя дельтовидного концентрация восстановленной формы глутатиона снизилась на 7–12%, то у угнетенных растений аналогичное уменьшение составляло уже 16–25% по сравнению с предыдущим периодом исследований (см. таблицу). Необходимо также отметить, что отмеченное уменьшение содержания антиоксиданта привело к усилению различий в его накоплении между растениями различных вариантов исследований, и в листьях угнетенных растений тополя дельтовидного его содержалось на 70–85% меньше, чем у контрольных растений. Как и в предыдущие этапы исследований, сохраняется закономерность отсутствия статистически достоверных различий в накоплении восстановленной формы глутатиона в листьях модельных деревьев одного варианта исследований. Установленная нами тенденция уменьшения концентрации исследуемого трипептида в осенний период у представителя лиственных пород отличается от результатов исследований E. Taulavuori и R. Schupp, которыми показано, что у представителей хвойных *Pinus sylvestris* L. и *Picea abies* L. Karst. максимальный уровень накопления восстановленной формы глутатиона наблюдается осенью, а резкое падение концентрации антиоксиданта установлено летом [16, 17]. По нашему мнению, такое расхождение в данных может быть объяснено разной интенсивностью и направленностью транспортных потоков веществ в органы ассимиляции растений в осенний период, обусловленной старением и опаданием листьев у лиственных пород деревьев.

Выводы

В результате проведенных исследований можно констатировать, что у растений тополя дельтовидного, произрастающих в различных эдафических условиях, наблюдаются разные тенденции накопления восстановленной формы глутатиона. Для угнетенных растений характерна интенсификация функционирования глутатионзависимой антиоксидантной системы на начальном этапе исследований, однако ее резкая исчерпаемость с увеличением длительности мониторинговых исследований. В свою очередь, для контрольной группы растений характерно достаточно замедленное сезонное снижение концентрации антиоксиданта в органах ассимиляции, что может свидетельствовать об успешности деактивации активных форм кислорода и их метаболитов, образующихся в клетках под действием негативных факторов окружающей среды.

Автор выражает благодарность директору Криворожского ботанического сада НАН Украины к.б.н. А.Е. Мазур за помощь при проведении исследований.

1. **Strohm M., Jouanin L., Kunert K.J.** Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione-synthetase // *The Plant J.* 1995. Vol. 7 (1). P. 414–445.
2. **Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Perekisnoye okisleniye lipidov v biologicheskikh membranakh [Lipids peroxidation in biological membranes]. Moscow: Nauka, 1972. 252 p.
3. **Hippeli S., Elstner E.F.** Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants // *J. Plant Physiol.* 1996. Vol. 148. P. 249–257.
4. **Марченко М.М., Блошко М.М., Костышин С.С.** Действие малых доз γ -облучения на состояние глутатионовой системы кукурузы (*Zea mays* L.) // *Укр. биохим. журнал.* 1996. Т. 68 (2). С. 94–98.
Marchenko M.M., Blosko M.M., Kostyshin S.S. Deystviye malykh doz γ -oblucheniya na sostoyaniye glutathionovoy sistemy kukuruzy (*Zea mays* L.) [Action of small doses of γ -radiation on a condition of glutathione system of maize (*Zea mays* L.)] // *Ukr. biokhim. zhurnal.* 1996. Т. 68 (2). P. 94–98.

5. **Noctor G., Arisi A.C.M., Jouanin L.** Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants // *J. Exp. Botany*. 1998. Vol. 49 (321). P. 623–647.
6. **Kocsy G., Szalai G., Vaguifalvi A.** Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat // *Planta*. 2000. Vol. 210. P. 295–301.
7. **Beutler E., Duran O., Kelly B.U.** The definition of glutathione in blood // *J. Lab. Chim. Med.* 1963. Vol. 61 (5). P. 882–886.
8. **Гришко В.Н., Сыщиков Д.В.** К методике определения содержания тиоловых групп (восстановленной формы глутатиона) в растениях // *Вестник ДНУ Биология. Экология.* – Днепропетровск: ДНУ. 2002. Вып. 10 (1). С. 190–193.
Grishko V.N., Syshchykov D.V. К методике определения содержания тиоловых групп (восстановленной формы глутатиона) в растениях [On the method of thiol groups content determination (glutathione reduced form) in plants] // *Vestnik DNU Biologiya. Ekologiya.* Dnepropetrovsk: DNU. 2002. Vol. 10 (1). P. 190–193.
9. **Гришко В.Н., Сыщиков Д.В.** Метод определения восстановленной формы глутатиона в вегетативных органах растений // *Укр. биохим. журнал*. 2002. Т. 74 (46). С. 123–124.
Grishko V.N., Syshchykov D.V. Metod opredeleniya vosstanovlennoy formi glutationa v vegetativnykh organakh rasteniy [Method of glutathione reduced form definition in vegetative organs of plants] // *Ukr. biokhim. zhurnal*. 2002. Vol. 74 (4b). P. 123–124.
10. **Доспехов Б.А.** Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
Dospikhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy) [Technique of a field experiment: with bases of statistical processing of results of research]. Moscow: Agropromizdat, 1985. 351 p.
11. **Егоршин О.О., Лисовий М.В.** Математичне планування польових дослідів та статистична обробка експериментальних даних. Харків: Вид-во Ін-ту ґрунтознавства та агрохімії ім. О.Н.Соколовського, 2005. 193 с.
Egorshin O.O., Lisovyy M.V. Matematychnе planuvannya pol'ovyykh doslidiv ta statystychna obrobka eksperymentalnykh danykh [Mathematical planning of field experiments and statistical processing of experimental data]. Kharkiv: Vyd-vo In-tu gruntoznavstva ta agrokhimii im. O.N. Sokolovs'kogo, 2005. 193 p.
12. **Сыщиков Д.В., Гришко В.Н.** Физиологическая роль глутатиона, его синтез и деградация у растений // *Вестник ХНАУ. Серия Биология*. 2006. Вып. 1 (8). С. 21–33.
Syshchykov D.V., Grishko V.N. Fiziologicheskaya rol' glutationa, ego sintez i degradatsiya u rasteniy [Physiological role of glutathione, its synthesis and degradation at plants] // *Vestnik KhNAU. Seriya Biologiya*. 2006. Vol. 1 (8). P. 21–33.
13. **Herschbach C.** Sulfur nutrition of conifers and deciduous trees // *Trees – contribution to modern tree physiology*. Eds. H. Rennenberg, W. Eschrich, H. Ziegler. Leiden: Backhuys Publ., 1997. P. 293–311.
14. **Meister A., Tate S.S.** Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization // *Ann. Rev. Biochem.* 1976. Vol. 45. P. 559–604.
15. **Rennenberg H.** Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants // *Phytochemistry*. 1982. Vol. 21 (12). P. 2771–2781.
16. **Taulavuori E., Taulavuori K., Sarjala T.** Polyamines and glutathione metabolism in N fertilized Scots pine seedlings during cold hardening // *J. Plant Physiol.* 1999. Vol. 154. P. 179–184.
17. **Schupp R., Rennenberg H.** Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.) // *Plant Sci.* 1988. Vol. 57. P. 113–117.

УДК 581.1: 582.4 (477.63)

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФОРМЫ ГЛУТАТИОНА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ *POPULUS DELTOIDES* MARSH. В УСЛОВИЯХ ЖЕЛЕЗОРУДНОГО ОТВАЛА

Д.В. Сыщиков

ГУ «Донецкий ботанический сад»

Показаны разные тенденции накопления восстановленной формы глутатиона у растений тополя дельтовидного, произрастающих в различных эдафических условиях, на протяжении вегетационного периода. Установлено более резкое истощение ресурсов данной антиоксидантной системы у угнетенных растений.

Ключевые слова: глутатион, отвал, стресс, листья, сезонная динамика

UDC 581.1:582.4(477.63)

DYNAMICS OF GLUTATHIONE REDUCED FORM MAINTENANCE IN LEAVES OF *POPULUS DELTOIDES* MARSH. PLANTS IN THE CONDITIONS OF THE IRON ORE DUMP

D.V. Syshchykov

Public Institution «Donetsk Botanical Garden»

Different tendencies of glutathione reduced form accumulation in eastern cottonwood plants growing in various edaphic conditions are shown throughout the vegetative period. More distinct exhaustion of resources of this antioxidant system is revealed in oppressed plants.

Key words: glutathione, dump, stress, leaves, seasonal dynamics