

## КООРДИНОВАНА РЕАКЦІЯ ГЛУТАТІОН-ЗАЛЕЖНОЇ СИСТЕМИ НАСІННЯ ДЕРЕВ РОДУ *ACER* НА ХРОНІЧНИЙ ВПЛИВ ПОЛЮТАНТІВ

Н. Хромих

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара  
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна  
e-mail: Khromykh2012@gmail.com

У насінні кленів гостролистого (*Acer platanoides* L.) і псевдоплатанового (*Acer pseudoplatanus* L.) із забруднених фітоценозів визначено вміст відновленого глутатіону (GSH) й активність глутатіон-S-трансферази (GST, EC 2.5.1.18), глутатіон-пероксидази (GPX, EC 1.11.1.9) і глутатіон-редуктази (GR, EC 1.6.4.2). Видоспецифічні та координовані зміни пулу GSH і активності глутатіон-залежних ферментів у насінні вказують на участь циклу глутатіону в реалізації видами роду *Acer* різних стратегій адаптації до хронічного впливу поллютантів.

*Ключові слова:* *Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., насіння, поллютанти, глутатіон, глутатіон-редуктаза, глутатіон-S-трансфераза, глутатіон-пероксидаза.

Різноманітні стресові впливи, яких зазнають материнські деревні рослини внаслідок дії природних і антропогенних чинників, викликають зміни фізіолого-біохімічних процесів у насінні [13], зокрема, індукують відповідні реакції захисних метаболічних систем насіння на вплив поллютантів. Відомо, що ефективний антиоксидантний захист рослин за дії токсикантів різного походження забезпечує глутатіон-залежна система [2], однак особливості її функціонування у клітинах насіння потребують детальнішого вивчення. На сьогодні такі дослідження проведені вибірково, наприклад, за умов антропогенного забруднення показано активацію глутатіон-залежних ферментів у насінні гіркокаштану звичайного [4] та зміни вмісту глутатіону в насінні деяких представників роду *Acer* [1].

Відомо [16], що за толерантністю насіння до висихання під час дозрівання клен гостролистий (*Acer platanoides* L.) належить до найбільш поширеної серед вищих рослин групи з так званим «ортодоксальним» насінням, яке висихає без втрати схожості й добре зберігається у сухому стані. У той же час клен псевдоплатановий (*Acer pseudoplatanus* L.) належить до групи з «рекальцитрантним» насінням, яке за низького вмісту вологи втрачає життєздатність і погано зберігається [8, 12]. Зрозуміло, що рослини з такими контрастними конститутивними властивостями насіння можуть також виявити здатність до реалізації різних стратегій метаболічної адаптації до умов забруднених екотопів, проте на сьогодні не вивчено специфічність функціонування захисних ферментних систем у насінні тих деревних видів, які відрізняються за критерієм толерантності насіння до висихання.

Мета роботи полягала у виявленні особливостей реакції метаболічного циклу глутатіону на хронічний вплив комплексу аерополлютантів у толерантному й нетолерантному до висихання насінні двох представників роду *Acer*.

### Матеріали та методи

Деревні рослини роду *Acer* широко розповсюджені у фітоценозах міста Дніпропетровськ, при цьому *A. platanoides* L. (клен гостролистий) вважається аборигенним видом із нижнім кордоном його ареалу в степовому Придніпров'ї, тоді як *A. pseudoplatanus* L. (клен псевдоплатановий) – інтродукований вид [3]. Стигле насіння відбирали на початку

жовтня з рослин клену гостролистого та клену псевдоплатанового у Ботанічному саду Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара (умовний контроль) та на моніторингових точках із комплексним антропогенним забрудненням середовища: узбіччя проспекту Гагаріна, проспекту Кірова, вулиці Героїв Сталінграду. На кожній ділянці формувалась усереднена проба із насіння від 3–4 дерев одного вікового стану, яке висушували за кімнатної температури до постійної маси. Висушене насіння звільняли від насінневих оболонок і розмелювали за допомогою лабораторного млина.

Для отримання екстрактів із насіння наважки рослинного матеріалу гомогенізували в 0,1 М К-На-фосфатному буфері (рН 8,0), витримували 18–20 год при температурі 4°C, після чого центрифугували 10 хв при 16 000 об./хв. Ферментативну активність в екстрактах визначали при довжині хвилі 340 нм за описаними раніше [4, 5] методиками і виражали у нкатал/г сухої маси. Активність GST визначали за змінами оптичної густини реакційної суміші (1 мл буферу, 0,1 мл 0,02 М розчину GSH, 0,2 мл проби) після інкубування при 30°C та додавання 0,1 мл розчину DNCB. Для визначення активності GR в інкубовану при 30°C реакційну суміш, яка містила 1 мл буферу, 0,1 мл розчину EDTA, 0,3 мл розчину GSSG, 0,2 мл розчину NADPH, додавали 0,2 мл проби і реєстрували зміни оптичної густини. Активність GPX визначали в інкубованій при 37°C суміші (1,2 мл буферу, рН 7,4, 0,2 мл розчину EDTA, 0,2 мл розчину GSH, 0,1 мл розчину NADPH, 0,2 мл проби) після додавання 2,5 мМ розчину H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вміст GSH визначали в отриманій при додаванні 50% розчину трихлороцтової кислоти небілкової фракції екстракту, за попередньо побудованим калібрувальним графіком, вимірюючи при 400 нм оптичну густину реакційної суміші (2 мл 0,4 М трис-буферу, 1 мл проби, 0,05 мл реактиву Елмана) до та після інкубування при 37°C. Дослідження проведені в триразовій аналітичній повторності, результати опрацьовано за допомогою програми Statistica 6.0. Розбіжності між вибірками вважали значущими при  $p \leq 0,05$ .

#### Результати і їхнє обговорення

Установлено, що насіння досліджуваних видів роду *Acer* суттєво відрізнялося за вмістом відновленого глутатіону й активністю глутатіон-залежних ферментів як за контрольних умов зростання, так і за дії аерополітантів. Пул GSH у толерантному до висихання насінні клену гостролистого перевищував відповідний показник для клену псевдоплатанового у 6,9 разу в умовно контрольному фітоценозі та у 2,0–3,1 разу в антропогенно забруднених фітоценозах (табл. 1). Відомо, що толерантність насіння до висихання узгоджується, крім іншого, з високим внутрішньоклітинним рівнем антиоксидантів [7, 10, 14], тому суттєва різниця контрольних рівнів вмісту відновленого глутатіону в насінні може вказувати на важливу роль глутатіон-залежної захисної системи у реалізації двома видами кленів різних екологічних стратегій збереження насіння після дозрівання й опадання з материнських рослин.

Таблиця 1

Вміст відновленого глутатіону (нМоль/г сухої маси) у насінні кленів

Ділянка	Вміст GSH (нМоль/г сухої маси), M±m	p	До контролю, %
<i>Acer platanoides</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	3746,72±23,50	–	–
Проспект Гагаріна	1589,39±23,30	0,0001	42,42
Проспект Кірова	1829,70±32,60	0,0005	48,83
Вулиця Героїв Сталінграду	1271,67±70,90	0,0001	33,94
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	540,20±19,70	–	–
Проспект Гагаріна	518,88±7,90	0,3710	96,05
Проспект Кірова	783,90±11,80	0,0005	145,11
Вулиця Героїв Сталінграду	635,53±19,90	0,0261	117,83

За умов антропогенного забруднення у насінні *A. platanoides* встановлено зниження вмісту відновленого глутатіону до 34–49% від контрольного значення. Враховуючи, що у толерантному насінні при дозріванні відбувається генетично детерміноване уповільнення метаболічних процесів і зниження вмісту метаболітів [7, 16], можна дійти висновку, що вплив поллютантів на материнські рослини клену гостролистого позначився на властивостях насіння таким чином, що викликав посилене зниження вмісту відновленого глутатіону.

У насінні *A. pseudoplatanus* за дії аерополлютантів виявлено збереження контрольного вмісту GSH (ділянка 2) або навіть його зростання на 18–45% (ділянки 3 та 4) щодо контрольного рівня. Оскільки нетолерантне до висихання насіння при дозріванні зберігає високий рівень метаболічної активності [9, 10, 15, 16], та можна припустити, що вплив поллютантів, якого зазнали рослини клену псевдоплатанового, обумовив інтенсифікацію метаболічних процесів, зокрема, збільшення накопичення відновленого глутатіону у насінні. Для більш ґрунтовних висновків щодо результатів хронічної дії поллютантів необхідно врахувати ферментативну активність насіння, оскільки наявний пул відновленого глутатіону визначає інтенсивність функціонування всієї глутатіон-залежної захисної системи.

Зростання внутрішньоклітинного пулу відновленого глутатіону може бути обумовлено індукцією процесу його біосинтезу або посиленням інтенсивності реакцій відновлення молекул окисленого глутатіону за участю глутатіон-редуктази [2, 15]. Встановлено, що за контрольних умов активність глутатіон-редуктази у насінні клену гостролистого в 1,5 рази перевищувала рівень активності ферменту в насінні клену псевдоплатанового (табл. 2), що узгоджується з закономірністю, виявленою для показників вмісту відновленого глутатіону у насінні двох видів.

Таблиця 2

Активність глутатіон-редуктази (нкат/г сухої маси) у насінні кленів

Ділянка	Активність GR (нкат/г сухої маси), M±m	p	До контролю, %
<i>Acer platanoides</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	23,58±1,61	–	–
Проспект Гагаріна	15,00±0,33	0,0064	63,59
Проспект Кірова	18,42±0,98	0,0516	78,13
Вулиця Героїв Сталінграду	11,75±0,97	0,0032	49,84
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	16,21±0,95	–	–
Проспект Гагаріна	23,73±0,32	0,0019	146,36
Проспект Кірова	18,56±1,09	0,1823	114,50
Вулиця Героїв Сталінграду	21,33±0,72	0,0134	131,59

Вплив поллютантів спричинив суттєве зниження активності GR у насінні *A. platanoides* (на 22–50% від контролю), що вказує на уповільнення процесів відновлення молекул окисленого глутатіону і призводить до зниження накопичення пулу відновленого глутатіону в насінні. У насінні *A. pseudoplatanus* за дії аерополлютантів, навпаки, відзначено зростання активності глутатіон-редуктази на 15–47% від контролю, що вказує на індукцію процесів відновлення окисленого глутатіону та забезпечує зростання вмісту GSH у насінні. Отже, за дії поллютантів у насінні *A. pseudoplatanus* індукована активність глутатіон-редуктази перевищувала показники для *A. platanoides* в 1,6–1,9 разу.

Активність глутатіон-пероксидази за контрольних умов у насінні *A. pseudoplatanus* в 2,3 рази перевищувала показник для *A. platanoides* (табл. 3).

У насінні клену гостролистого з усіх забруднених фітоценозів рівень глутатіон-пероксидазної активності достовірно не відрізнявся від контрольного, що вказувало на відсутність змін у перебігу антиоксидантних процесів за участю GPX. У той же час у насінні

клену псевдоплатанового з тих самих фітоценозів виявлено зростання активності глутатіон-пероксидази на 98–179% вище контрольного рівня, що свідчило про потужне зростання інтенсивності процесів антиоксидантного захисту, а саме про посилення знешкодження органічних пероксидів і перекису водню в рослинних клітинах [2].

Таблиця 3

## Активність глутатіон-пероксидази (нкат/г сухої маси) у насінні кленів

Ділянка	Активність GPX (нкат/г сухої маси), M±m	p	До контролю, %
<i>Acer platanoides</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	5,25±0,61	–	–
Проспект Гагаріна	5,16±0,23	0,8929	98,27
Проспект Кірова	5,79±0,31	0,4735	110,29
Вулиця Героїв Сталінграду	5,53±0,05	0,6695	105,33
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	12,28±1,05	–	–
Проспект Гагаріна	24,33±1,72	0,0039	198,08
Проспект Кірова	29,32±2,26	0,0038	238,72
Вулиця Героїв Сталінграду	34,27±3,50	0,0039	279,05

Активність глутатіон-S-трансферази у насінні *A. pseudoplatanus* за контрольних умов у 5,1 разу перевищувала показник для *A. platanoides* (табл. 4).

Таблиця 4

## Активність глутатіон-S-трансферази (нкат/г сухої маси) у насінні кленів

Ділянка	Активність GST (нкат/г сухої маси), M±m	p	До контролю, %
<i>Acer platanoides</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	1,87±0,04	–	–
Проспект Гагаріна	3,23±0,27	0,0071	172,89
Проспект Кірова	3,20±0,09	0,0001	171,23
Вулиця Героїв Сталінграду	3,08±0,18	0,0028	164,76
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.			
Ботсад (умовний контроль)	9,41±0,35	–	–
Проспект Гагаріна	10,41±0,07	0,0502	110,56
Проспект Кірова	18,44±1,41	0,0034	195,91
Вулиця Героїв Сталінграду	17,94±0,30	0,0001	190,53

У насінні обох видів кленів із забруднених фітоценозів активність GST перевищувала контрольний рівень, що вказувало на посилення у рослинних клітинах процесів метаболічної деградації токсикантів шляхом їх кон'югації з відновленим глутатіоном. Індукція активності GST у насінні була обумовлена комплексним складом поллютантів, який визначався викидами автотранспорту (сполуки свинцю, вуглеводні) та промислових підприємств (важкі метали, оксиди азоту, вуглецю, сірки, похідні фенолу тощо) [6], впливу яких насіння деревних рослин зазнає на великих відстанях від джерела забруднення [11].

Перебіг реакцій за участю GPX і GST передбачає витрати пулу GSH, внаслідок чого у насінні *A. platanoides* високий контрольний рівень відновленого глутатіону за дії поллютантів помітно знижувався, як і активність GR. У той же час у насінні *A. pseudoplatanus* з низьким контрольним рівнем GSH за дії поллютантів було активовано процес відновлення окисленого глутатіону за участю GR. Вказані закономірності підтверджує кореляційний аналіз індукованих поллютантами метаболічних змін, який у насінні клену гостролистого виявив високий позитивний зв'язок вмісту GSH з активністю GR ( $r=0,94$ ) та негативну кореляцію з активністю GST ( $r=-0,96$ ) і активністю GPX ( $r=-0,29$ ). У насінні клену псевдоплатанового при несуттєвій кореляції вмісту GSH з активністю GR ( $r=-0,24$ ) установлено високий позитивний зв'язок з активністю GST ( $r=0,88$ ) та GPX ( $r=0,79$ ).

Таким чином, хронічний вплив поллютантів у насінні клену гостролистого посилював генетично детерміновану тенденцію до зниження метаболічної активності під час дозрівання і висихання, тоді як у насінні клену псевдоплатанового викликав зростання генетично обумовленого високого метаболічного статусу під час дозрівання. При цьому для насіння обох видів слід вважати загальною реакцією на дію поллютантів суттєву активацію процесів їх метаболічного знешкодження. Видоспецифічність функціонування метаболічного циклу глутатіону в насінні вказує на залучення глутатіонової захисної системи у реалізацію різних стратегій адаптації *A. platanoides* та *A. pseudoplatanus* до умов комплексного антропогенного забруднення середовища.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Грицай З. В. Динамика содержания аскорбиновой кислоты и глутатиона в семенах и околоплодниках и в условиях промышленных эмиссий // Деп. в ГНТБ Украины, №2112 УК – 95, 1995. 11 с.
2. Гришко В. Н., Сыщиков Д. В. Функционирование глутатионзависимой антиоксидантной системы и устойчивость растений при действии тяжелых металлов и фтора. К.: Наукова думка, 2012. 239 с.
3. Кохно М. А., Пархоменко Л. І., Зарубенко А. І. Дендрофлора України. Дикорослі й культивовані дерева і кущі. Покритонасінні: довідник. Ч. 2. К.: Фітосоціоцентр, 2005. 716 с.
4. Хромих Н. О. Стан глутатіон-залежної системи насіння *Aesculus hippocastanum* за умов антропогенного забруднення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 58. С. 265–270.
5. Хромих Н. О. Функціонування глутатіонового циклу в апікальній меристемі та зоні росту коренів проростків кукурудзи за дії іонів кадмію і високої температури // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 59. С. 301–305.
6. Экологические основы природопользования / Н.П. Грицан, Н.В. Шапарь, Г.Г. Шматков и др. Днепропетровск: ИППЭ НАН Украины, 1998. 409 с.
7. Berjak P., Pammenter N.W. Orthodox and Recalcitrant Seeds. In: Plant Cell Biology Unit. For: School of Life Sciences University of Natal, Durban, South Africa. 2001. Ch. 4. P. 137–147.
8. Berjak P., Pammenter N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective // Annals of Botany. 2008. Vol. 101. P. 213–228.
9. Connor K. F., Bonner F. T. Physiology and Biochemistry of Recalcitrant Guarea *Guidonia* (L.) Sleumer Seeds // Seeds Technology. 1998. Vol. 20. No 1. P. 32–39.
10. Connor K. F., Sowa S. Effects of desiccation on the physiology and biochemistry of *Quercus alba* acorns // Tree Physiology. 2003. Vol. 23. P. 1147–1152.
11. Ganatsas P., Tsakalidimi M., Zachariadis G. Effect of air traffic pollution on seed quality characteristics of *Pinus brutia* // Env. Exp. Botany. 2011. Vol. 74. P. 157–161.
12. Gosling P. Raising trees and shrubs from seed: Practice Guide / In: Forestry Commission. Edinburgh, 2007. P. 1–28.
13. Kranner I., Minibayeva F. V., Beckett R. P., Seal C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science // New Phytologist. 2010. Vol. 188. P. 655–673.
14. Kranner I., Colville L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination // Environ. Exp. Botany. 2011. Vol. 72. P. 93–105.
15. Pukacka S., Ratajczak E. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds // J. Plant Physiol. 2006. Vol. 163. Is. 12. P. 1259–1266.

16. Pukacka S., Ratajczak E. Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer* // Functional Plant Biology. 2007. Vol. 34. P. 601–613.

Стаття: надійшла до редакції 13.12.12

доопрацьована 15.05.13

прийнята до друку 16.05.13

## COORDINATED REACTION OF GLUTATHIONE-DEPENDENT SYSTEM OF ACER SPECIES SEEDS TO POLLUTANTS CHRONIC ACTION

N. Khromykh

*Dnipropetrovsk National University of Oles Honchar*  
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine  
e-mail: Khromykh2012@gmail.com

The content of reduced glutathione (GSH) and glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), glutathione-peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) and glutathione-reductase (GR, EC 1.6.4.2) activity in *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* seeds from contaminated phytocenoses were determined. Species-specific and coordinated changes of GSH pool and glutathione-dependent enzymes activity confirm the participation of glutathione cycle in the implementation of different adaptation strategies of *Acer* species to pollutants chronic action.

*Keywords:* *Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., seeds, pollutants, glutathione, glutathione-reductase, glutathione-S-transferase, glutathione-peroxidase.

## КООРДИНИРОВАННАЯ РЕАКЦИЯ ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ СЕМЯН ДЕРЕВЬЕВ РОДА ACER НА ХРОНИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ПОЛЛЮТАНТОВ

Н. Хромых

*Днепропетровский национальный университет имени Олесь Гончара*  
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина  
e-mail: Khromykh2012@gmail.com

В семенах клена остролистного (*Acer platanoides* L.) и псевдоплатанового (*Acer pseudoplatanus* L.) из загрязненных фитоценозов определено содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность глутатион-S-трансферазы (GST, EC 2.5.1.18), глутатион-пероксидазы (GPX, EC 1.11.1.9) и глутатион-редуктазы (GR, EC 1.6.4.2). Видоспецифичные и координированные изменения пула GSH и активности глутатион-зависимых ферментов в семенах указывают на участие цикла глутатиона в реализации видами рода *Acer* разных стратегий адаптации к хроническому влиянию поллютантов.

*Ключевые слова:* *Acer platanoides* L., *Acer pseudoplatanus* L., семена, поллютанты, глутатион, глутатион-редуктаза, глутатион-S-трансфераза, глутатион-пероксидаза.