

ВПЛИВ ВИСОКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ХЛОРИДУ НАТРІЮ НА ВМІСТ ПІГМЕНТІВ ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ У ЛИСТКАХ ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ

Ю. В. ВАСИЛИК, В. І. ЛУЩАК

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

Досліджено вплив хлориду натрію на загальні морфометричні показники проростків та біохімічні показники у листках проростків кукурудзи. За дії 100 та 200 мМ NaCl сповільнюється ріст стебла та кореня. Інкубація рослин зі 100 і 200 мМ NaCl протягом 24 год збільшує вміст хлорофілів, каротиноїдів та антоціанів, а також тіобарбітурат-активних продуктів. Зниження вмісту карбонільних груп протеїнів спостерігається після експозиції протягом 24 год при концентрації 200 мМ NaCl. Підвищення вмісту загальних та високомолекулярних тіолових груп спостерігається за експозиції 24, 48 та 72 год при концентрації солі 200 мМ. Рівень низькомолекулярних тіолових груп на 20–25% вищий після 48 год при всіх використаних концентраціях NaCl. Активність гваяколпероксидази вище лише у разі 24 год експозиції при концентрації солі 100 і 200 мМ, а каталази – при концентрації 50 мМ NaCl за 48 год експозиції. Після 72 год інкубації активність каталази на 27 і 41% вище у проростків, експонованих із 50 і 200 мМ NaCl відповідно. Таким чином, експозиція рослин до 50–200 мМ солі спричинює оксидативний стрес, який, у свою чергу, призводить до підвищення антиоксидантного потенціалу і потужності систем забезпечення енергією, що дозволяє рослинам надалі адаптуватися до несприятливих умов.

Ключові слова: проростки кукурудзи, сольовий стрес, морфометричні показники, пігменти, показники оксидативного стресу, антиоксидантні ензими.

Засолення ґрунтів є одним з найпоширеніших природних факторів, який істотно знижує врожайність зернових культур, зокрема кукурудзи. Його негативна дія пов'язується з індукцією так званого сольового стресу. Слід зазначити комплексність розвитку сольового стресу, який є сумісним результатом осмотичного та іонного стресів, до яких додається вторинний окислювальний стрес. У відповідь на осмотичний стрес відбувається підвищення експресії генів, продукти яких безпосередньо чи опосередковано забезпечують захист рослин [1]. Адаптація до осмотичного стресу відбувається завдяки підвищенню експресії генів, які кодують біосинтез осмолітів [2], іонні канали, рецептори, компоненти сигнальних шляхів, а також деякі ензими [3]. У захисті рослин від дії стресорних факторів ключову роль відіграють антиоксиданти. У відповідь на стрес у рослин зростає як активність антиоксидантних ензимів, так і концентрація низькомолекулярних антиоксидантів, таких як токоферол [4]. Негативна дія засоленості переважно виявляється в порушенні іонної та осмотичної рівноваги у

клітині, що, у свою чергу, впливає на ріст і розвиток рослин, а в деяких випадках може спричинити загибель організму. Фізіологічна дія сольового стресу пов'язана зі зневодненням, яке зумовлене зниженням водного потенціалу ґрунту, призводячи до ускладнення всмоктування води і поживних речовин. Засоленість індукуює іонний стрес, який виявляється у зміні співвідношення концентрацій Na^+/K^+ , а підвищення вмісту позаклітинного натрію негативно впливає на надходження калію.

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів натрію токсичне для клітин усіх рослинних організмів. Ці іони є причиною перерозподілу іонів у цитоплазмі, порушення клітинного циклу, структури мембран, сповільнення процесу фотосинтезу і стимулювання утворення активних форм кисню (АФК), що призводить до сповільнення росту [5].

Кукурудза є важливою сільськогосподарською культурою і виключно солечутливим злаком, який часто слугує об'єктом у вивченні впливу сольового стресу на організм рослин. Саме тому метою нашої роботи було

дослідити, як підвищення концентрації хлориду натрію впливає на розвиток проростків кукурудзи, концентрацію пігментів, маркерів окисного пошкодження протеїнів та ліпідів, а також активність антиоксидантних ензимів у листках.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували насіння кукурудзи (*Zea mays* L.) гібрида Харківський 195 МВ, реактиви Sigma-Aldrich (Німеччина), Fluka (Німеччина) та вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче чда.

Умови вирощування рослин. Проростки вирощували в лабораторних умовах (26 °С, 16/8 год день/ніч, 15 мкмоль фотонів м² с⁻¹). Насіння замочували на 24 год в дистильованій воді, потім на 4 доби поміщали під вологу серветку. П'ятиденні проростки переносили на середовище Гогланда [6], а далі десятиденні проростки з корінням – на розчини NaCl (0, 50, 100 та 200 мМ) у дистильованій воді. Забір рослинного матеріалу проводили через 24, 48 та 72 год експонування. Для біохімічних аналізів використовували листки проростків.

Пігменти екстрагували з листків проростків шляхом розтирання у фарфоровій ступці в охолоджену 96%-му етанолі у співвідношенні 1 : 10 (маса : об'єм) із додаванням СаСО₃ (для нейтралізації середовища). Гомогенати (1 мл) центрифугували 5 хв при 8000 g (4 °С) на центрифугі ОПН-8 (СРСР). Одержані осадки тричі промивали 1 мл етанолу та центрифугували в попередньому режимі. Екстракти об'єднували і в кінцевому сумарному екстракті спектрофотометрично визначали вміст хлорофілу *a*, хлорофілу *b*, каротиноїдів та антоціанів як описано раніше [4]. Для спектрофотометричного визначення використовували Specol 211 (Carl Zeiss Jena, Німеччина).

Одержання супернатантів для визначення вмісту карбонільних груп протеїнів, тіобарбітуратактивних продуктів (ТБК-активних продуктів), тіолових сполук і протеїну, а також активності антиоксидантних ензимів. Листки гомогенізували в середовищі, яке містило 50 мМ калій-фосфатний буфер (КФБ), рН 7,0 та 0,5 мМ етилендіамінтетраацетат (ЕДТА). Співвідношення тканини до середовища гомогенізації складало 1 : 10 (маса : об'єм). Гомогенат центрифугували 10 хв при температурі 4 °С і 15 000 g. У супернатанті визначали активність ензимів, концентрацію тіолових груп, ТБК-продуктів та карбонільних груп протеїнів.

Визначення вмісту карбонільних груп протеїнів та ТБК-активних продуктів. Супер-

натант змішували 1 : 1 з 40%-ю трихлороцтовою кислотою (ТХО) та центрифугували (13 000 g, 5 хв, 4 °С). Осад використовували для визначення концентрації карбонільних груп протеїнів, а супернатант з ТХО – для визначення вмісту ТБК-активних продуктів. Вміст карбонільних груп протеїнів визначали за реакцією з динітрофенілгідразином, як описано раніше [7]. Інтенсивність пероксидного окислення ліпідів визначали за концентрацією утворених ТБК-активних продуктів [8].

Вміст тіолових сполук. Концентрацію SH-груп визначали за допомогою спектрофотометрії з реактивом Еллмана з 5,5'-дитіобіс (2-нітробензойною кислотою) при довжині хвилі 412 нм [9]. Концентрацію загальних тіолів (сума низько- та високомолекулярних тіолів) визначали як описано раніше [10]. Для визначення концентрації низькомолекулярних тіолів супернатант змішували з ТХО (кінцева концентрація ТХО 10%) та центрифугували 5 хв при 5000 g з метою осадження протеїнів. Для подальшого аналізу використовували супернатант. Вміст високомолекулярних тіолів встановлювали за різницею між концентраціями загальних та низькомолекулярних тіолів.

Визначення активності каталази і гваяколпероксидази. Активність каталази визначали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 240 нм на спектрофотометрі СФ-46 (Ломо, СРСР) у пробі об'ємом 1,5 мл, яка містила (тут і надалі вказані кінцеві концентрації інгредієнтів) 50 мМ КФБ (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 10 мМ пероксиду водню і 10 мкл супернатанта. Для розрахунків використовували коефіцієнт молярного поглинання 39,4 М⁻¹ см⁻¹ для пероксиду водню [11].

Активність гваяколпероксидази визначали спектрофотометрично з використанням гваяколу як субстрату при довжині хвилі 470 нм. Активність ензиму обчислювали, застосовуючи коефіцієнт мілімолярного поглинання тетрагваяколу 26 600 М⁻¹ см⁻¹ [12], і виражали в міжнародних одиницях на 1 мг протеїну (Од/мг протеїну). Суміш для визначення активності цього ензиму містила 50 мМ КФБ (рН 7,0), 20 мМ гваяколу, 8 мМ пероксиду водню і 10 мкл супернатанта. Кінцевий об'єм проби складав 1,5 мл. Абсорбцію вимірювали протягом 2 хв з інтервалом 10 с. Активність обох ензимів виражали в Од/мг протеїну.

Визначення загальної концентрації протеїну. Концентрацію протеїну визначали за методом Бредфорд [13], використовуючи альбумін бичачої сироватки як стандарт.

Статистична обробка результатів. Досліди проводили у трьох біологічних та трьох аналітичних повторах. Експериментальні дані подані як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку результатів здійснювали, використовуючи критерій Даннета [14], який дає можливість порівнювати кілька експериментальних груп проти однієї контрольної групи.

Результати та обговорення

Морфометричні показники. Підвищення концентрації солі в навколишньому середовищі змінює перебіг фізіологічних процесів в організмі рослин, що призводить до інгібування чи зупинки росту, а іноді і до їхньої загибелі [15]. Перенесення проростків кукурудзи в умови сольового стресу, індукованого хлоридом натрію, затримує розвиток проростків, про що свідчать менша довжина та маса пагонів і коренів (рис. 1 і 2). Сповільнення росту стебла на 16 та 12% спостерігали вже після 24 год експозиції до NaCl у концентрації 100 і 200 мМ відповідно (рис. 1, А). Подібна тенденція спостерігається у разі збільшення часу експозиції до 48 і 72 год. На 72-у год різниця між контрольною і дослідними групами рослин, які інкубували у присутності 100 і 200 мМ NaCl, становила 28 та 37% відповідно. Зниження маси стебла залежить від концентрації сольового розчину і часу експозиції – за збільшення концентрації NaCl та часу експозиції збільшується різниця між проростками контрольної і дослідних груп

(рис. 1, Б). Після експозиції протягом 24 год у присутності 200 мМ NaCl ця різниця становить 29%, після 48 год – 36%, а після 72 год – 51%. Сповільнення росту стебел в умовах сольового стресу може бути спричинене багатьма факторами. Наприклад, сповільненням росту і поділу клітин меристеми через інгібування їхнього метаболізму і зміни у структурі клітинної стінки [2, 16].

Ускладнення надходження води у рослину в умовах стресу призводить до змін у функціонуванні систем транспортування іонів Na^+ , H^+ і K^+ , що, у свою чергу, призводить до зниження співвідношення K^+/Na^+ . Важливим фактором, який визначає ріст стебел, є пероксид водню, генерація якого знижується в цих умовах [17].

Сольовий стрес призводить до зниження швидкості росту коренів (рис. 2). Довжина коренів є достовірно меншою за інкубації проростків у присутності NaCl в концентрації 200 мМ (рис. 2, А) протягом усього експерименту. На 24-у год експозиції різниця становить 22%, на 48-у год – 21% і на 72-у год – 15%. Слід зазначити, що інкубація із хлоридом натрію практично не впливає на масу кореня, а вірогідну різницю виявлено лише після 72 год експозиції до 200 мМ NaCl (рис. 2, Б). Механізми сповільнення росту коренів, імовірно, подібні до таких у листках. Проте у коренях не здійснюється фотосинтез, а поживні речовини мають листкове походження. До того ж в умовах засолення корені виконують бар'єрну роль і лімітують надходження

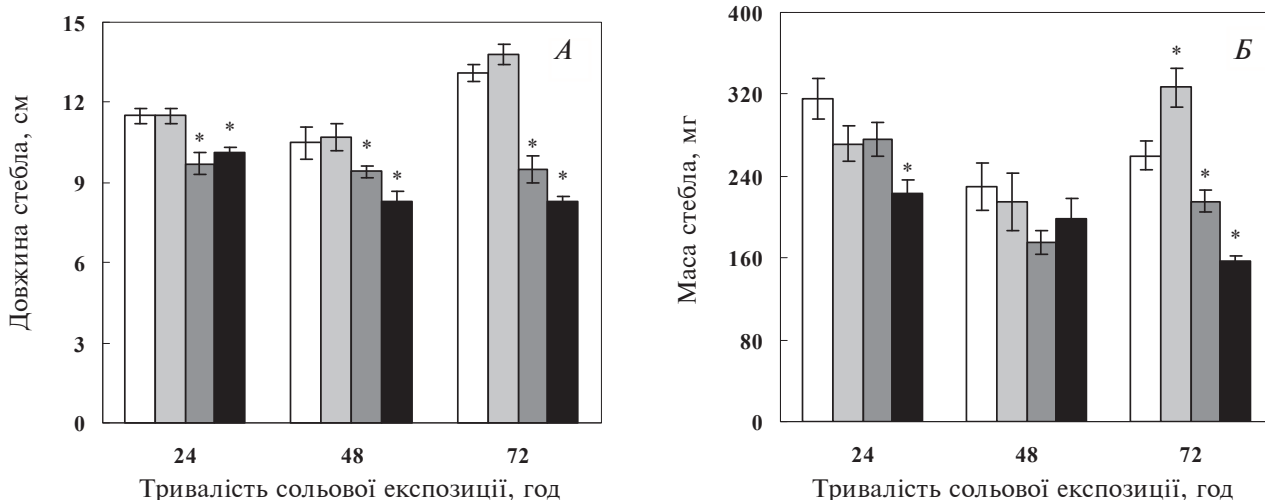


Рис. 1. Довжина (А) та маса (Б) стебла та листків у проростках кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год: □ – К; □ – 50 мМ NaCl; ■ – 100 мМ NaCl; ■ – 200 мМ NaCl. Тут і на рис. 2–5 * вірогідно відмінне від відповідних значень контрольної групи з $P < 0,05$ ($n = 3$)

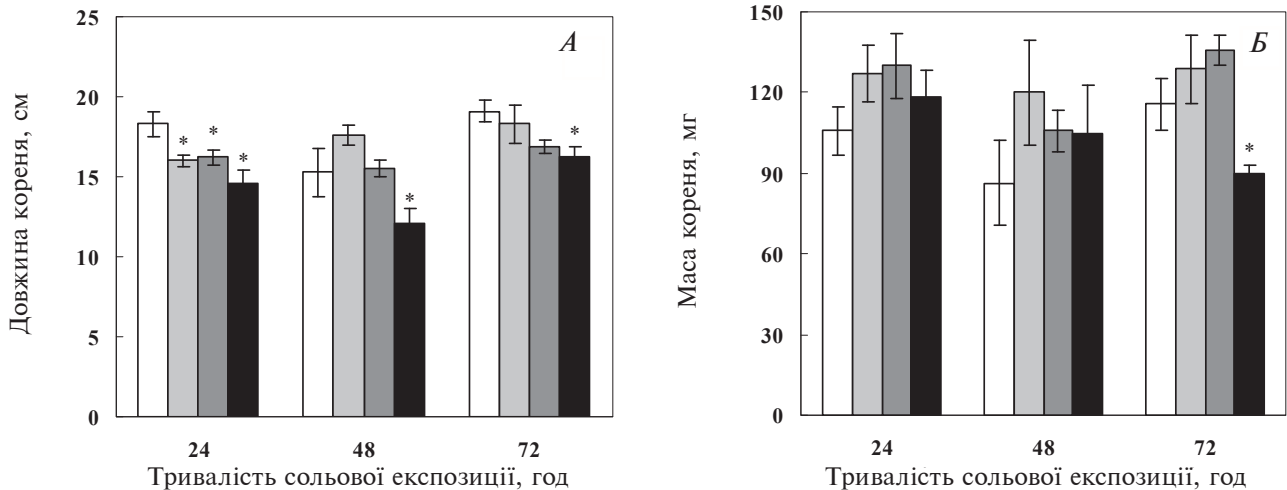


Рис. 2. Довжина (А) та маса (Б) кореня у проростках кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год: □ – К; ■ – 50 мМ NaCl; ■ – 100 мМ NaCl; ■ – 200 мМ NaCl

Таблиця 1. Концентрація хлорофілів, каротиноїдів та антоціанів (мкмоль/г сухої маси) у листках проростків кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год

NaCl, мМ	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Каротиноїди	Антоціани
24 год				
0	2,10 ± 0,08	0,55 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,83 ± 0,03
50	2,24 ± 0,14	0,63 ± 0,04	0,76 ± 0,05	0,85 ± 0,06
100	2,45 ± 0,07*	0,67 ± 0,02*	0,83 ± 0,02*	0,97 ± 0,03*
200	2,59 ± 0,11*	0,70 ± 0,03*	0,87 ± 0,04*	1,03 ± 0,05*
48 год				
0	1,67 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,72 ± 0,02
50	1,79 ± 0,06	0,50 ± 0,01*	0,60 ± 0,03	0,76 ± 0,03
100	1,62 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,73 ± 0,03
200	1,54 ± 0,08	0,42 ± 0,02*	0,55 ± 0,02	0,65 ± 0,03
72 год				
0	2,13 ± 0,09	0,58 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,87 ± 0,03
50	2,29 ± 0,07	0,59 ± 0,03	0,77 ± 0,05	0,87 ± 0,03
100	2,14 ± 0,11	0,65 ± 0,03*	0,77 ± 0,08	0,83 ± 0,05
200	2,02 ± 0,12	0,52 ± 0,01*	0,75 ± 0,02	0,75 ± 0,05*

* Вірогідно відмінне від відповідних контрольних значень з $P < 0,05$

іонів Na^+ і Cl^- [18]. Це також можна пояснити тим, що у разі засолення пригнічується поділ клітин [19].

Пігменти. Надалі ми дослідили вплив сольового стресу на концентрацію пігментів фотосинтетичного апарату – хлорофілів і каротиноїдів – і тих, які виконують захисну функцію – антоціанів. Із табл. 1 видно, що сольовий стрес індукує підвищення вмісту

пігментів у листках проростків кукурудзи. Зокрема, після 24 год експозиції у присутності 100 і 200 мМ NaCl вміст хлорофілу *a* збільшується на 17 і 23% відповідно. За цих самих умов концентрація хлорофілу *b* зростає на 22 і 27%, каротиноїдів – на 15 і 21%, а антоціанів – на 17 і 24%. Зростання вмісту пігментів фотосинтетичного апарату та антоціанів може бути компенсаторною реакцією організму рослин,

адже в умовах стресу знижується ефективність використання сонячної енергії [4].

На 48-у год сольової експозиції вміст всіх пігментів при концентрації 100 мМ відрізняється від контрольного варіанта не істотно, що узгоджується з даними літератури [20]. Проте концентрація хлорофілу *b* є вищою за цієї експозиції зі 50 мМ NaCl і нижчою зі 200 мМ NaCl.

На 72-у год експозиції концентрації більшості пігментів не відрізняються від контрольних значень. Виняток становить концентрація хлорофілу *b* за експозиції зі 100 та 200 мМ NaCl і концентрація антоціанів зі 200 мМ NaCl.

Показники оксидативного стресу. Підвищення стаціонарної концентрації АФК призводить до інтенсифікації окисної модифікації протеїнів, маркером якої є вміст у них карбонільних груп [21]. Сольовий стрес, індукований хлоридом натрію в концентрації 200 мМ, знижує концентрацію карбонільних груп протеїнів після 24 год експозиції (табл. 2). У решті випадків ніяких відмінностей не спостерігається. Одержані дані щодо вмісту карбонільних груп протеїнів свідчать про те, що на 24 год експозиції проростків кукурудзи до найвищої з використаних концентрацій NaCl у рослинах змінюється протікання вільнорадикальних реакцій. Надалі – через 48 і 72 год організм, передусім, пристосовується до нього, що і виявляється як відсутність різниці у вмісті карбонільних груп протеїнів за таких часових експозицій до гіпертонічних розчинів NaCl [22].

Відомо, що сольовий стрес інтенсифікує процеси пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у рослин [23]. Збільшення концентрації продуктів ПОЛ може свідчити як про стимуляцію вільнорадикального окислення ліпідів, так і сповільнення деградації вже окислених молекул. Малоновий діальдегід (продукт окислення ліпідів) взаємодіє з тиобарбітуровою кислотою (ТБК) з утворен-

ням так званих ТБК-активних продуктів [24]. Визначення їхнього вмісту дає змогу частково оцінити інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів.

В умовах підвищення концентрації хлориду натрію в концентраціях від 50 до 200 мМ, спостерігається збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у листках вже на 24 год інкубації порівняно з контролем (рис. 3), що підтверджує дані інших авторів про інтенсифікацію окислення ліпідів за таких умов [25, 26]. Зі збільшенням часу інкубації до 48 і 72 год відбувається зниження вмісту ТБК-активних продуктів як у контрольній, так і в дослідних групах. Так, на 48 год експозиції їхній вміст становить лише 51% порівняно з таким на 24 год, а також 43, 37 і 45% у листках проростків, інкубованих в 50, 100 і 200 мМ NaCl відповідно. Загальне зниження вмісту ТБК-активних продуктів у рослин контрольної та дослідних груп і відсутність різниці між ними можуть бути спричиненими кількома факторами. Для індукції стресу рослини переносили із середовища Гогланда на дистильовану воду, що, у свою чергу, може розглядатись як певний стрес із відповідними наслідками перебудови метаболізму. Не можна виключити і можливості перебудови сигнальних шляхів, що відбувається під час перенесення рослин із поживного середовища у воду [1], а нестача поживних речовин часто призводить до зниження генерації АФК і підвищення стійкості рослин до стресу [27]. І, насамкінець, – тривала інкубація рослин у воді чи у присутності в ній різних концентрацій NaCl може призводити до прискорення катаболізму ТБК-активних продуктів.

Інкубація рослин у присутності хлориду натрію впливає на концентрації загальних тіолових сполук (рис. 4, А) та високомолекулярних тіолових сполук протеїнової природи, які осаджуються трихлороцтовою кислотою (рис. 4, Б) і низькомолекулярних (рис. 4, В), основна частина з яких припадає на глутатіон

Таблиця 2. Концентрація карбонільних груп протеїнів (нмоль/г сухої маси) у листках проростків кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год

NaCl, мМ	24 год	48 год	72 год
0	17,1 ± 0,7	16,1 ± 0,1	18,2 ± 0,8
50	15,8 ± 0,2	18,1 ± 1,2	18,0 ± 1,0
100	18,4 ± 1,0	18,2 ± 1,5	22,0 ± 0,8
200	13,8 ± 0,8*	16,2 ± 1,1	20,0 ± 0,6

* Вірогідно відмінне від відповідних контрольних значень з $P < 0,05$

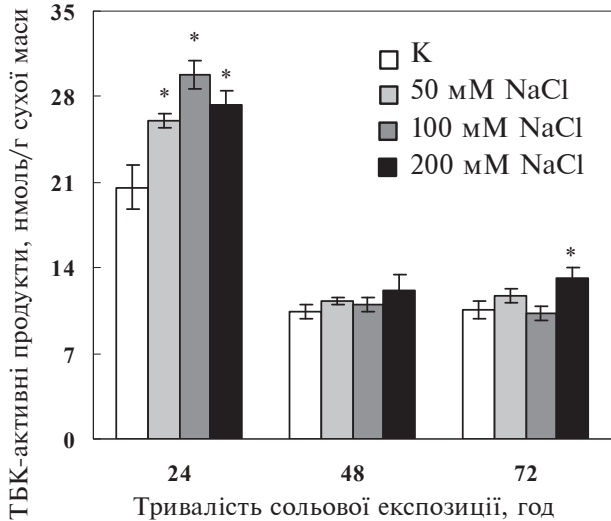


Рис. 3. Концентрація ТБК-активних продуктів у листках проростків кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год

[28]. Підвищення вмісту загальних тіолових груп (ЗТГ) за збільшення концентрації NaCl чітко простежується на 24 год експозиції, тоді як у разі збільшення часу експозиції до 48 і 72 год вірогідно вищу кількість ЗТГ було виявлено лише у рослин, інкубованих з NaCl у концентрації 200 мМ (рис. 4, А).

Експозиція рослин на розчинах хлориду натрію підвищує вміст високомолекулярних тіолових груп (ВТГ), які є бічними залишками амінокислот у протеїнах і часто використовуються як групи, через які відбувається регуляція активності протеїну шляхом окислення [21]. Кількість ВТГ у листках проростків, на варіанті з 200 мМ розчином хлориду натрію, була в 1,21 раза вища порівняно з контрольною групою після 24 год експозиції і в 1,60 або 1,24 після 48 та 72 год відповідно (рис. 4, Б). Така різниця в концентрації ВТГ також може бути зумовлена зміною кількісного і якісного складу протеїнів. Зокрема, було показано, що в умовах сольового стресу відбувається зміна складу протеїнів у хлоропластах проростків кукурудзи [29], а також у рослинах *Arabidopsis thaliana* і *Thellungiella halophila* [30].

Про перебудову метаболізму і перебіг вільнорадикальних процесів за дії сольового стресу свідчить вищий рівень низькомолекулярних тіолових груп (НТГ) у стресованих рослинах. Так, у листках проростків кукурудзи рівень НТГ на 20–25% вище на 48-у год обробки NaCl за всіх використаних концентрацій (рис. 4, В). Ця тенденція найчіткіше виявляється після 48 год експозиції.

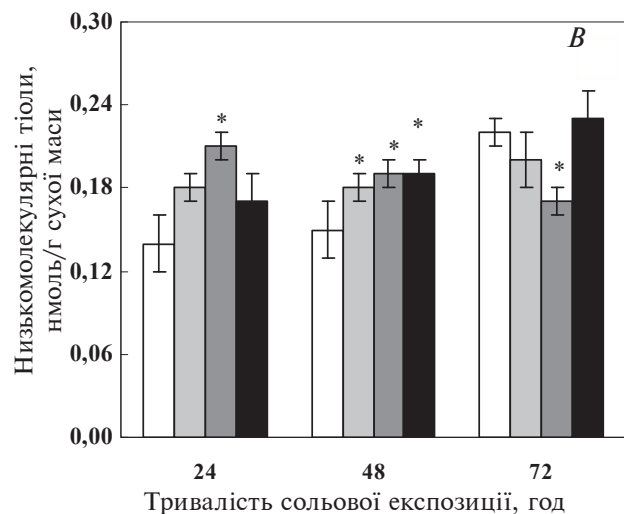
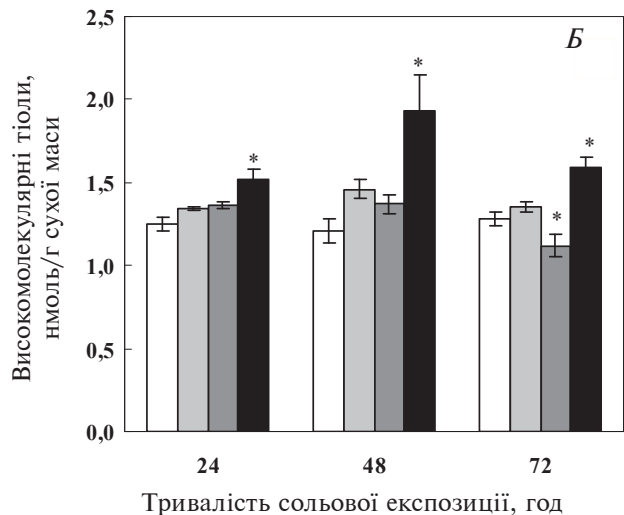
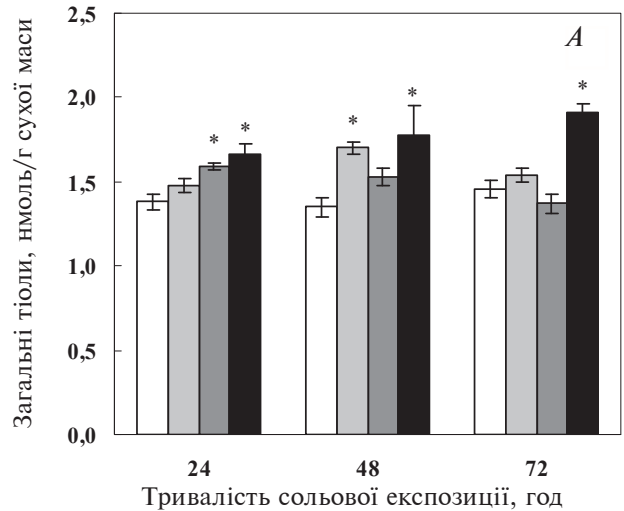


Рис. 4. Концентрація загальних (А), високомолекулярних (Б) та низькомолекулярних (В) тіолів у листках проростків кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год: □ – K; □ – 50 мМ NaCl; ■ – 100 мМ NaCl; ■ – 200 мМ NaCl

Вищий рівень глутатіону може свідчити про інтенсифікацію його синтезу з попередників або його сповільнене використання, чи функціонування ензимів, пов'язаних з обміном глутатіону, таких як глутатіонредуктаза і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа [31].

Активність ензимів, які знешкоджують пероксид водню. Відомо, що пероксид водню є ключовим метаболітом регуляції багатьох клітинних функцій рослин. Тому надалі ми дослідили вплив сольового стресу на активність основних ензимів його деградації – каталази і гваяколпероксидази (ГПР) [32, 33]. Каталаза знешкоджує пероксид водню з утворенням води і молекулярного кисню, а пероксидаза використовує низькомолекулярні субстрати як косубстрати для відновлення пероксиду водню. В умовах сольового стресу активність ГПР достовірно вища у листках проростків, експонованих до NaCl в концентраціях 100 і 200 мМ протягом 24 год (рис. 5, А), що добре узгоджується з даними літератури [4, 34]. За збільшення тривалості обробки вірогідної різниці між активністю ензиму у листках проростків контрольної і дослідних груп не виявили [34]. Активність каталази вища у листках проростків, експонованих з 50 мМ NaCl протягом 48 год (рис. 5, Б). Після 72 год інкубації активність каталази на 27 і 41% вища у листках проростків, інкубованих із 50 і 200 мМ NaCl відповідно [34].

Загальновідомо, що високі концентрації солей уповільнюють ріст рослин [15]. Це

чітко підтверджується в нашій роботі: вже концентрація 50 мМ NaCl сповільнює ріст стебла і коренів (рис. 2, А), а також масу стебла (рис. 1, Б), але маса коренів при цьому не змінюється (рис. 2, Б). Які ж процеси відбуваються у рослинах за дії підвищеного вмісту солі в середовищі? Назагал, в нашій роботі підтвердилося, що розвиток сольового стресу супроводжується оксидативним стресом. Із табл. 1 і рис. 3 та 4 видно, що за дії NaCl протягом 24 год паралельно збільшується вміст пігментів, ТБК-активних продуктів і низькомолекулярних тіолів. Виникає питання – наскільки тісно пов'язані між собою вміст ТБК-активних продуктів, як показника оксидативного стресу, з одного боку, і антиоксидантів, а також хлорофілів, з іншого. На рис. 6, А та Б видно, що, дійсно, існує тісний зв'язок між рівнями ТБК-активних продуктів і каротиноїдів ($R^2 = 0,6625$) та антоціанів ($R^2 = 0,548$). Тому можна припустити, що збільшення вмісту названих антиоксидантів, яке відбувається як відповідь на розвиток оксидативного стресу, носить адаптивний характер. Подібний тісний зв'язок знайдено між вмістом ТБК-активних продуктів і хлорофілів, зокрема із хлорофілом *a* (рис. 6, В) і хлорофілом *b* (рис. 6, Г). Це, у свою чергу, показує, що організм рослин адаптується до підвищеного вмісту солі в середовищі, збільшуючи потенціал фотосинтетичного апарату. Виглядає так, що організм рослин має досить великий резерв для захисту від підвищеного вмісту АФК, про що може

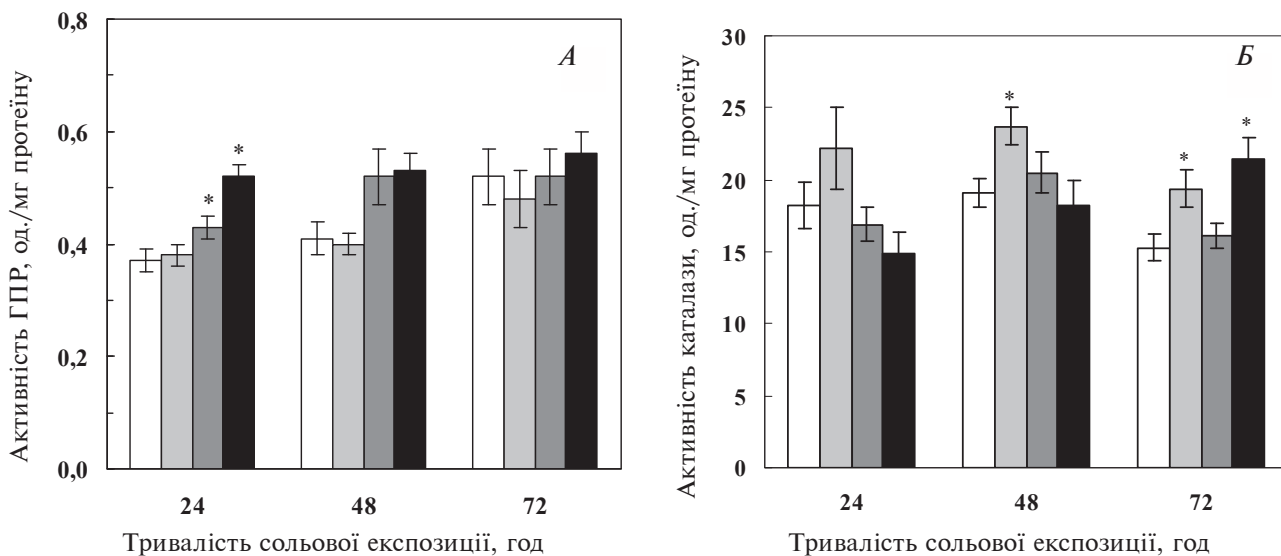


Рис. 5. Активність гваяколпероксидази (А) та каталази (Б) у листках проростків кукурудзи під час сольової експозиції протягом 24, 48 та 72 год: □ – К; ■ – 50 мМ NaCl; ■ – 100 мМ NaCl; ■ – 200 мМ NaCl

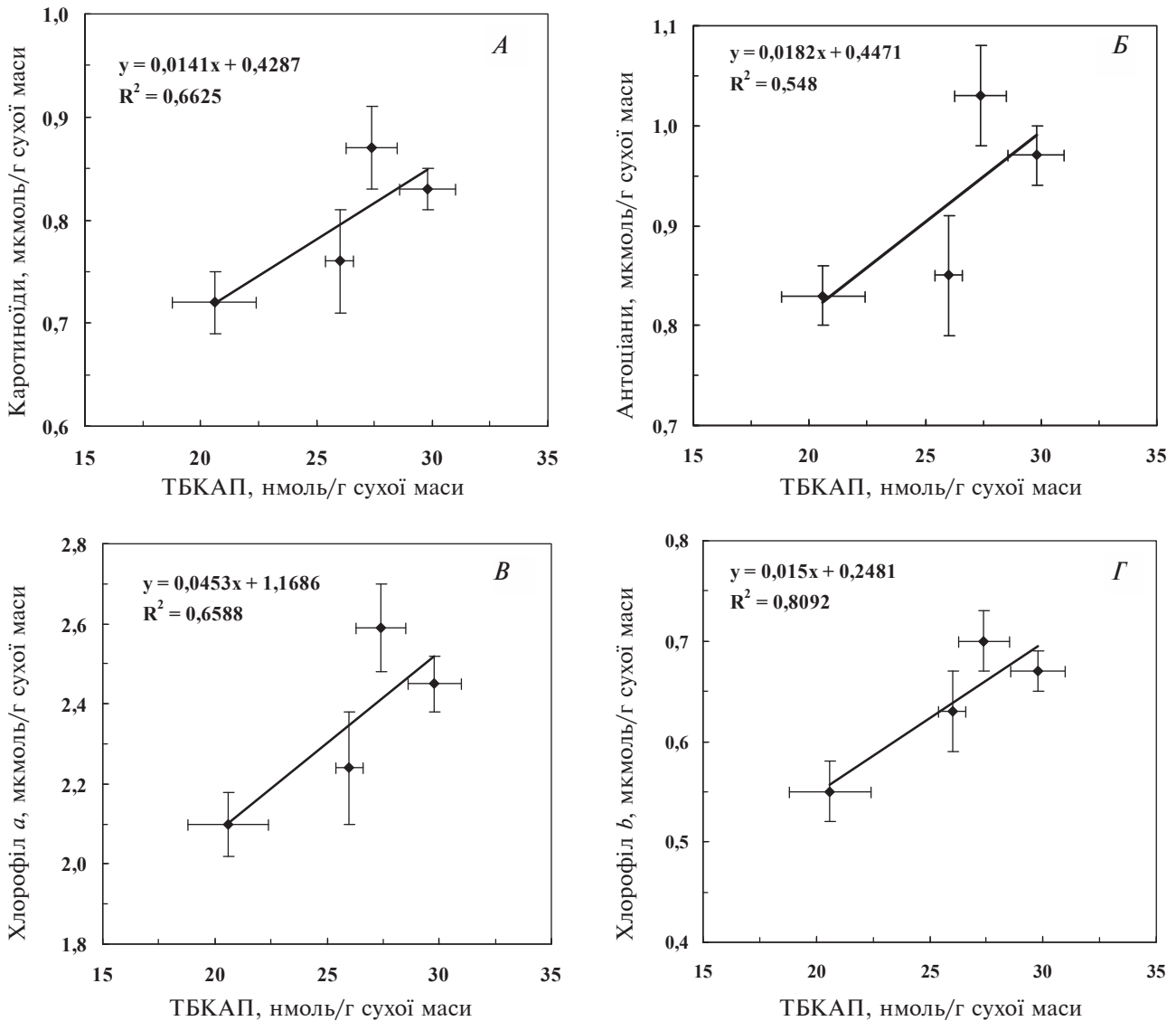


Рис. 6. Взаємозв'язок між вмістом ТБК-активних продуктів (ТБКАП), з одного боку, і таким каротиноїдів (А), антоціанів (Б), хлорофілу a (В) та хлорофілу b (Г) у листках проростків кукурудзи за дії 50–200 мМ NaCl протягом 24 год, з іншого

опосередковано свідчити зростання вмісту низькомолекулярних тіолів (рис. 4, В), серед яких основна доля припадає на глутатіон, а також активності гваяколпероксидази (рис. 5, А). Проте доступність ресурсів для росту зменшується, що і призводить до затримки росту рослин (рис. 1 і 2).

В умовах засоленого середовища у рослин істотно змінюється іонний гомеостаз. Він підтримується складно організованою системою іонних pomp – як первинних, які для функціонування використовують АТФ, так і вторинних, які використовують трансмембранні потенціали іонів. Ці системи вимагають енергії, тому за сольового

стресу потреба в ній зростає. Як наслідок – порушується функціонування енергетичних процесів. Іонний дисбаланс також може порушувати функціонування хлоропластів і мітохондрій. До того ж змінюється гомеостаз кальцію. Внаслідок усіх цих змін збільшується генерація АФК хлоропластами та мітохондріями, а також, можливо, і іншими системами. Дефіцит АТФ може знижувати інтенсивність біосинтезу антоціанів, зокрема, каротиноїдів і глутатіону. Активація кальцієм фосфоліпаз збільшує гідроліз ліпідів, що стимулює їхнє вільнорадикальне окислення. Внаслідок цього в середовищі збільшується стаціонарний рівень АФК, тобто розвивається

оксидативний стрес [35, 36], і, як наслідок, – пошкоджуються клітинні компоненти. Проте у рослин є потужні системи знешкодження АФК, такі як низькомолекулярні речовини – каротиноїди, антоціани, токоферол, глутатіон, високомолекулярні антиоксиданти як то супер-оксиддисмутази, пероксидази, а також такі комплексні системи як аскорбат-глутатіоновий цикл. В цій роботі ми виявили, що за дії високих концентрацій NaCl зростає вміст продуктів вільнорадикального окислення ліпідів, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Проте вже на першу добу експозиції з NaCl у рослинах істотно зростає вміст антиоксидантів каротиноїдів, антоціанів і низькомолекулярних тиолів, а також хлорофілів. Але рівень низькомолекулярних тиолів, основним з яких є глутатіон, залишається незмінним. Отже, рослини розвивають адаптивну відповідь. Разом зі збільшенням вмісту антиоксидантів, зростає потенціал для поглинання і засвоєння енергії світла – вміст основних фотосинтетичних пігментів – хлорофілів. Не виключено, що саме завдяки останньому рослини здатні забезпечувати енергією процеси біосинтезу антиоксидантів – як низькомолекулярної, так і ензиматичної ланок, а також усувати пошкодження, спричинені АФК. У разі тривалої дії солей рослини або мають достатньо потужний захист від АФК, або знижують генерацію останніх, але умови, в яких вони знаходяться є несприятливими, що виражається у сповільненні їхнього росту.

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ
КОНЦЕНТРАЦИЙ ХЛОРИДА НАТРИЯ
НА СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ
И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ
ПРОЦЕССЫ В ЛИСТЬЯХ
ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ**

Ю. В. Васылык, В. И. Лушчак

Прикарпатский национальный университет имени
Васыля Стефаныка, Ивано-Франковск, Украина;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

Исследовано влияние хлорида натрия на общие морфометрические показатели проростков и биохимические показатели в листьях проростков кукурузы. В присутствии 100 и 200 мМ NaCl замедляется рост стебля и корней. При действии 100 и 200 мМ NaCl в течение 24 ч увеличивается содержание хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов, а также тиобарбитуратактивных продуктов. Установлено снижение содержания карбонильных групп

протеинов при 24 ч экспозиции при концентрации 200 мМ NaCl. При действии 200 мМ NaCl в течение 24, 48 и 72 ч наблюдается повышение уровня общих и низькомолекулярных тиольных групп. Содержание низькомолекулярных тиольных групп при 48 ч экспозиции на 20–25% выше при всех использованных концентрациях NaCl. Активность гваяколпероксидазы выше только при 24-часовой экспозиции к 100 и 200 мМ NaCl, а каталазы – при 48-часовом действии 50 мМ NaCl. После 72 ч инкубации активность каталазы была на 27 и 41% выше в листьях проростков, экспонированных с 50 и 200 мМ NaCl соответственно. Таким образом, экспозиция с 50–200 мМ соли сначала вызывает окислительный стресс, что приводит к адаптивному ответу – повышению антиоксидантного потенциала и мощности систем обеспечения энергией, способствующее в дальнейшем адаптации растений к неблагоприятным условиям.

Ключевые слова: проростки кукурузы, солевой стресс, морфометрические параметры, показатели окислительного стресса, антиоксидантные энзимы.

**EFFECT OF HIGH SODIUM CHLORIDE
CONCENTRATIONS ON THE PIGMENT
CONTENT AND FREE-RADICAL
PROCESSES IN CORN SEEDLINGS
LEAVES**

Y. V. Vasylyk, V. I. Lushchak

Vassyl Stefanyk Precarpathian National
University, Ivano-Frankivk, Ukraine;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

S u m m a r y

The effect of sodium chloride on general morphometrical parameters of seedlings, and biochemical parameters in the leaves of corn seedlings was studied. Exposure to 100 and 200 мМ NaCl slowed down the growth of stem and roots, whereas 100 and 200 мМ NaCl during 24 h enhanced the concentration of chlorophylls, carotenoids, anthocyanins, and thiobarbituric acid reactive substances. The decrease in protein carbonyl groups was found at 24-hour exposure to 200 мМ salt. The treatment during 24, 48 and 72 h to 200 мМ salt increased the level of total and high molecular mass thiols, whereas low molecular mass thiol content was by 20–25% higher at 48 h exposure to all used salt concentrations. The activity of guaiacol peroxidase was higher only at 24 h exposure to 100 and 200 мМ salt, and catalase – at 50 мМ

during 48 h. At 72-hour exposure, catalase activity was by 27 and 41% higher in seedlings, exposed to 50 and 200 mM NaCl, respectively. Therefore, it is concluded the plant exposure to 50-200 mM salt initially developed oxidative stress, inducing adaptive response – an increase in antioxidant potential and efficiency of systems of energy production. That results in plant adaptation to unfavourable conditions.

Key words: corn seedlings, salt stress, morphological parameters, oxidative stress, antioxidant enzymes.

1. *Andjelkovic V., Thompson R.* // Plant Cell Rep. – 2006. – **1**. – P. 71–79.
2. *Rodriguez H. G., Roberts J. K. M., Jordan W. R. et al.* // Plant Physiol. – 1997. – **113**. – P. 881–893.
3. *Xiong L., Schumaker K. S., Zhu J.-K.* // Plant Cell. – 2002. – **14**. – P. 165–183, N 5. – P. 384–390.
4. *Semchuk N., Lushchak O. V., Falk J. et al.* // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 3. – С. 48–54.
5. *Davenport R. J., Tester M.* // Plant Physiol. – 2000. – **122**. – P. 823–834
6. *Hoagland D. R., Arnon D. I.* / The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347. – 1950. – P. 32. University of California at Berkeley.
7. *Луцак В. І., Багнюкова Т. В., Луцак О. В.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 3. – С. 136–141.
8. *Heath R. L., Packer L.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – **125**. – P. 180–198.
9. *Ellman G. L.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – **82**. – P. 70–77.
10. *Lushchak V. I., Vagnyukova T. V.* // Comp. Biochem. Physiol. C. – 2006. – **143**. – P. 30–35.
11. *Aebi H.* // Meth. Enzymol. – 1984. – **105**. – P. 121–126.
12. *Ali M. B., Hahn E. J., Paek K. Y.* // Plant Physiol. Biochem. – 2005. – **43**. – P. 213–223.
13. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 289–292.
14. *Brooks S. P. J.* // Bio. Techniques. – 1992. – **13**. – P. 909–911.
15. *Taleisnik E., Rodriguez A. A., Bustos D. et al.* // J. Plant Physiol. – 2009. – **166**, N 11. – P. 1123–1140.
16. *Fan L., Neumann P. M.* // Plant Physiol. – 2004. – **135**. – P. 2291–2300.
17. *Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F. et al.* // Nature. – 2003. – **422**. – P. 442–446.
18. *Munns R., Tester M.* // An. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. – 2008. – **59**. – P. 651–681.
19. *Geilfus C. M., Zörb C., Mühling K. H.* // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – **48**, N 12. – P. 993–998.
20. *Білявська Н. О., Волошина Н. Ю., Тончій Н. М. та ін.* // Вісн. Харк. Нац. Агр. Універ., Сер. Біологія. – 2009. – **3**, № 18. – С. 35–42.
21. *Луцак В. І.* // Біохімія. – 2007. – **72**, № 8. – С. 995–1017.
22. *Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. et al.* // Trends Plant Sci. – 2004. – **9**. – P. 490–496.
23. *Katsuhara M., Otsuka T., Ezaki B.* // Plant Sci. – 2005. – **169**. – P. 369–373.
24. *Dhindsa R. S., Matowe W.* // J. Exp. Bot. – 1981. – **32**. – P. 79–91.
25. *Куриленко І. М., Палладіна Т. О.* // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 56–60.
26. *Shalata A., Mittova V., Volokita M. et al.* // Physiol. Plant. – 2001. – **112**. – P. 487–494.
27. *Kandlbinder A., Finkemeier I., Wormuth D. et al.* // Ibid. – 2004. – **120**, N 1. – P. 63–73.
28. *Tausz M., Sircelj H., Grill D.* // Exp. Bot. – 2004. – **55**, N 404. – P. 1955–62.
29. *Zörb C., Herbst R., Forreiter C., Schubert S.* // Proteomics. – 2009. – **9**, N 17. – P. 4209–4220.
30. *Pang Q., Chen S., Dai S. et al.* // J. Prot. Res. – 2010. – **9**. – P. 2584–2599.
31. *May M. J., Leaver C. J.* // Plant Physiol. – 1993. – **103**. – P. 621–627.
32. *Мерзляк М. Н.* // Соросовский образовательный журн. – 1999. – **9**. – С. 20–26.
33. *Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.* // An. Botany. – 2003. – **91**. – P. 179–194.
34. *Куриленко І. М., Палладіна Т. О.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 6. – С. 86–93.
35. *Палладіна Т. О., Рибченко Ж. І., Контурська О. О.* // Там само. – 2010. – **82**, № 4 (додаток 1). – С. 138–139.
36. *Lushchak V. I.* // Comp. Biochem. Physiol. C. – 2011. – **153**. – P. 175–190.

Отримано 26.10.2010