

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ У РАСТЕНИЙ *MIMULUS GUTTATUS* DC. В ОТВЕТ НА СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ СУЛЬФАТОВ ЦИНКА И НИКЕЛЯ

Е.Б. Башмакова, П.П. Пашковский

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, *elenab_77@mail.ru*, *pashkovskiy.pavel@gmail.com*

Аннотация. Работа посвящена изучению изменений в функциональном состоянии глутатионовой (GR-GSH) системы у растений мимулюса крапчатого (*Mimulus guttatus* Fischer ex DC.) в условиях раздельного и совместного действия солей ZnSO₄ и NiSO₄. Состояние GR-GSH системы оценивали по изменению редокс-статуса глутатиона и активности глутатионредуктазы (GR). Наблюдаемые изменения в функциональном состоянии GR-GSH системы при совместном действии Zn и Ni были направлены на поддержание более восстановленного состояния внутриклеточной среды.

Ключевые слова: *Mimulus guttatus*, совместное действие цинка и никеля, антагонизм, редокс-статус, глутатионовая система

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-118-122

Проблема устойчивости растений к антропогенному загрязнению окружающей среды является одной из приоритетных в современной экспериментальной биологии. Среди большого числа стресс-факторов техногенного происхождения в настоящее время все большую актуальность приобретает токсическое действие тяжелых металлов (ТМ) на растения. Особое место среди ТМ-поллютантов занимают элементы цинк (Zn) и никель (Ni), поскольку их избыточное содержание в почве может быть результатом не только хозяйственной деятельности человека, но и естественных почвообразовательных процессов [Kabata-Pendias, Pendias, 2001; Yadav, 2010].

Zn и Ni являются эссенциальными элементами, которые в небольших количествах необходимы для нормальной жизнедеятельности растений. Известно, что Zn функционирует как кофактор многих ферментов, участвующих в метаболизме азота, фотосинтезе, биосинтезе гормонов, нуклеиновых кислот и белков, тогда как Ni, являясь компонентом некоторых Ni-зависимых ферментов, принимает участие в гораздо меньшем количестве биохимических процессов. При этом в высоких концентрациях Zn и Ni оказывают токсическое действие на клеточный метаболизм, тем самым могут снизить жизнеспособность растений или привести их к гибели [Krämer, Clemens, 2005].

Очевидно, что в природных экосистемах растения часто подвергаются комбинированному токсическому действию данных ТМ, которое может иметь антагонистический или синергический характер влияния на уровне различных физиологических и биохимических процессов [Kabata-Pendias, Pendias, 2001]. Однако в литературе совместному действию Zn и Ni в растении уделено чрезвычайно мало внимания. Например, фрагментарно изучено совместное действие Zn и Ni на клеточный редокс-статус. Это делает крайне важным исследование изменений прооксидантно-антиоксидантного статуса, обусловленных совместным действием Zn и Ni в растении.

Индикатором протекающих в тканях растений процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является уровень малонового диальдегида (МДА) [Yadav, 2010]. Трипептид глутатион (γ -Glu-Cys-Gly) является наиболее значимым тиольным соединением, участвующим в поддержании внутриклеточного редокс-потенциала в растении. При этом основу клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза

определяет соотношение восстановленный/окисленный глутатион (GSH/GSSG) и общее содержание глутатиона (GSHt) [Noctor et al., 2012]. Глутатион также играет важную роль в детоксикации различных активных форм кислорода (АФК) [Anjum et al., 2012]. Известно, что увеличение соотношения GSH/GSSG и уровня GSHt приводит к снижению редокс-потенциала (более восстановленному состоянию внутриклеточной среды), что способствует понижению уровня АФК в клетках и повышению устойчивости растений к окислительному стрессу [Szalai et al., 2009].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли GR-GSH системы в антиоксидантном ответе на совместное действие Zn и Ni, которое было нами впервые проведено в лабораторных условиях на высоко устойчивом исключателе TM из семейства Фримовых (Phrymaceae) *M. guttatus* [Pollard et al., 2002].

Растения выращивали в камере фитотрона при температуре воздуха 23/18 °C (день/ночь), с 12-часовым световым периодом при интенсивности света $140 \pm 20 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{с})$ на модифицированной питательной среде Роризона без $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (pH=6.8 – 6.5). На момент постановки экспериментов ювенильные растения в возрасте 6 нед. имели 3 яруса листьев. Растения подвергали раздельному (50, 100 и 200 мкМ ZnSO_4 ; 20 и 80 мкМ NiSO_4) и совместному (20 мкМ NiSO_4 + 100 мкМ ZnSO_4 , 20 мкМ NiSO_4 + 200 мкМ ZnSO_4 , 80 мкМ NiSO_4 + 50 мкМ ZnSO_4 и 80 мкМ NiSO_4 + 100 мкМ ZnSO_4) воздействию солей TM. Контрольные растения выращивали на питательной среде, концентрация ZnSO_4 в которой составляла 1 мкМ, в отсутствие NiSO_4 . Продолжительность экспериментов составляла 4 нед. [Башмакова и др., 2016].

Содержание металлов анализировали методом атомно-абсорбционной спектроскопии [Башмакова и др., 2016]. Содержание МДА определяли согласно методике Heath и Packer [1968]. GSHt и содержание окисленного глутатиона (GSSG) определяли методом ферментативной рециклизации по модифицированной методике Griffith [1980]. Содержание восстановленного глутатиона (GSH) рассчитывали вычитанием содержания GSSG из GSHt [$\text{GSH} + 2 \text{GSSG}$]. Активность GR определяли спектрофотометрическим методом, согласно методике, предложенной Smith с соавт. [1988].

Установлено, что растения *M. guttatus* способны ограничивать поступление Zn и Ni в надземные органы, аккумулируя их преимущественно в корнях, что не противоречит ранее полученным экспериментальным данным [Pollard et al., 2002]. Обнаружен дозозависимый характер накопления этих металлов как в корнях, так и в листьях растений *M. guttatus* [Башмакова и др., 2016].

Интенсивность ПОЛ в корнях и листьях возрастала с увеличением концентрации солей TM в культуральной среде, причем при действии ZnSO_4 она была значительно выше, чем при действии NiSO_4 . При совместном воздействии 20 мкМ NiSO_4 и 100 (или 200) мкМ ZnSO_4 , а также 80 мкМ NiSO_4 и 50 (или 100) мкМ ZnSO_4 уровни МДА как в корнях, так и в листьях достоверно не различались и были несколько выше, чем при раздельном действии NiSO_4 , но ниже, чем при воздействии 100 (или 200) мкМ ZnSO_4 .

Содержание GSHt в корнях снижалось при увеличении концентрации ZnSO_4 в культуральной среде, в то время как в листьях снижение GSHt было установлено лишь при действии 200 мкМ ZnSO_4 . В ответ на воздействие 20 мкМ NiSO_4 содержание GSHt увеличивалось как в корнях, так и в листьях, а при действии 80 мкМ NiSO_4 возрастало только в корнях. При увеличении концентрации ZnSO_4 в присутствии NiSO_4 уровень GSHt в корнях возрастал, а в листьях снижался и становился немного ниже, чем в контроле.

В корнях и листьях содержание GSSG возрастало при увеличении концентрации ZnSO_4 в культуральной среде, тогда как в присутствии NiSO_4 увеличение уровня GSSG наблюдалось только в корнях при действии 80 мкМ NiSO_4 . С увеличением

концентрации $ZnSO_4$ в присутствии $NiSO_4$ наблюдали возрастание уровня GSSG в корнях, тогда как в листьях была установлена противоположная тенденция.

В корнях и листьях соотношение GSH/GSSG снижалось при увеличении концентрации $ZnSO_4$ в культуральной среде. Так, в корнях при действии 200 мкМ $ZnSO_4$ установлено практически 2-кратное снижение соотношения GSH/GSSG. Однако в присутствии 80 мкМ $NiSO_4$ соотношение GSH/GSSG снижалось незначительно, а при действии 20 мкМ $NiSO_4$ заметно увеличивалось как в корнях, так и в листьях. Обнаружено, что с увеличением концентрации $ZnSO_4$ в присутствии $NiSO_4$ соотношение GSH/GSSG несколько снижалось в корнях, в то время как в листьях увеличивалось. Примечательно, что при совместном действии 20 мкМ $NiSO_4$ и 200 мкМ $ZnSO_4$ соотношение GSH/GSSG в листьях было почти в 2 раза выше, чем в контроле.

С увеличением концентрации $ZnSO_4$ в культуральной среде активность GR в корнях снижалась, а в листьях возрастала. В то же время наблюдалось увеличение активности GR при действии 20 (или 80) мкМ $NiSO_4$ в корнях, а при воздействии 80 мкМ $NiSO_4$ также и в листьях. При увеличении концентрации $ZnSO_4$ в присутствии $NiSO_4$ активность GR в корнях снижалась, а в листьях, напротив, сильно возрастала.

Как следует из полученных данных, у растений *M. guttatus* с увеличением концентрации $ZnSO_4$ в культуральной среде уровень GSSG увеличивался при снижении уровня GSht и соотношения GSH/GSSG. Подобный эффект продемонстрировали Di Baccio с соавт. [2005] у растений рода *Populus*. Напротив, Ni-индуцирующее действие на биосинтез GSH было установлено у растений-гипераккумуляторов Ni из рода *Noccaea* [Freeman et al., 2004], что было также обнаружено и у растений *M. guttatus*.

Считается, что компенсаторными механизмами в функциональном состоянии GR-GSH системы в условиях стресса являются повышение уровня GSht в ответ на аккумуляцию GSSG и увеличение соотношения GSH/GSSG в ответ на снижение уровня GSht [Noctor et al., 2012]. Так, у растений *M. guttatus* при совместном действии $ZnSO_4$ и $NiSO_4$ одновременное увеличение содержания GSht и GSSG явилось причиной незначительного изменения в соотношении GSH/GSSG в корнях, а незначительное понижение уровня GSht на фоне снижения содержания GSSG приводило к увеличению соотношения GSH/GSSG в листьях. Таким образом, мы установили, что у растений *M. guttatus* совместное действие Zn и Ni увеличивает уровень GSht в ответ на аккумуляцию GSSG в корнях и снижает уровень GSSG в ответ на снижение содержания GSht в листьях, что является важной адаптационной реакцией, позволяющей снизить редокс-потенциал в тканях этих органов.

Увеличение активности GR приводит к увеличению соотношения GSH/GSSG, что способствует предотвращению окислительных повреждений в клетке и повышает устойчивость к окислительному стрессу [Митева и др., 2010]. Так, анализ экспериментальных данных показывает, что ответ растений *M. guttatus* на действие Zn и Ni, оцениваемый по активности GR, является дозозависимым, а также металл- и органоспецифическим. Установлено Zn-дозозависимое ингибирующее действие на активность GR в корнях и стимулирующее действие на активность этого фермента в листьях. Максимальная активность GR была установлена в корнях при действии 20 мкМ $NiSO_4$, тогда как в листьях наибольшая активность GR была обнаружена при действии 80 мкМ $NiSO_4$. С увеличением концентрации $ZnSO_4$ в присутствии $NiSO_4$ активность GR в листьях значительно возрастала, в то время как в корнях незначительно снижалась и становилась немного ниже активности GR в контроле. Очевидно, у растений *M. guttatus* синергическое действие Zn и Ni на активность GR в листьях является адаптационным механизмом, направленным на снижение интенсивности окислительного стресса и защиту фотосинтетического аппарата от повреждения АФК.

Таким образом, результаты нашего исследования изменений содержания GSht, GSSG и соотношения GSH/GSSG, а также активности GR свидетельствуют о двойственном (антагонистическом и синергическом) влиянии Zn и Ni на функциональное состояние GR-GSH системы. Было установлено антагонистическое действие Zn и Ni на прооксидантный статус в клетках и его зависимость от изменений функционального состояния GR-GSH системы, направленных на снижение окислительных повреждений. По-видимому, увеличение уровня GSht, а также соотношения GSH/GSSG и активности GR являются важными антиоксидантными механизмами у растений *M. guttatus* в ответ на совместное действие Zn и Ni.

Литература

Башмакова Е.Б., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В. Совместное действие цинка и никеля на состояние глутатионовой системы у растений мимулюса крапчатого // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – С. 668–678.

Митева Л.П.-Е., Иванов С.В., Алексиева В.С. Изменение пула глутатиона и некоторых ферментов его метаболизма в листьях и корнях растений гороха, обработанных гербицидом глифосатом // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 139–145.

Anjum N.A., Ahmad I., Mohmood I., Pacheco M., Duarte A.C., Pereira E., Umarc S., Ahmad A., Khan N.A., Iqbal M., Prasad M.N.V. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids – a review // Environ. Exp. Bot. – 2012. – V. 75. – P. 307–324.

Di Vaccio D., Kopriva S., Sebastiani L., Rennenberg H. Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against zinc excess? // New Phytol. – 2005. – V. 167. – P. 73–80.

Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J., Salt D.E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators // Plant Cell. – 2004. – V. 16. – P. 2176–2191.

Griffith O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine // Anal. Biochem. – 1980. – V. 106. – P. 207–212.

Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – V. 125. – P. 189–198.

Kabata-Pendias A., Pendias H. Trace Elements in Soils and Plants. – Boca Raton, FL.: CRC, 2001. – 331 p.

Krämer U., Clemens S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man, Tamás M.J., Martinoia E. (eds.) – Berlin: Springer-Verlag, 2005. – P. 215–271.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H. Glutathione in plants: an integrated overview // Plant Cell Environ. – 2012. – V. 35. – P. 454–484.

Pollard A.J., Powell K.D., Harper F.A., Smith J.A.C. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants // Crit. Rev. Plant Sci. – 2002. – V. 21. – P. 539–566.

Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) // Anal. Biochem. – 1988. – V. 175. – P. 408–413.

Szalai G., Kellös T., Galiba G., Kocsy G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions // J. Plant Growth Regul. – 2009. – V. 28. – P. 66–80.

Yadav S.K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants // S. Afr. J. Bot. – 2010. – V. 76. – P. 167–179.

**THE CHANGES IN GLUTATHIONE SYSTEM OF ZnSO₄-
WITH NiSO₄-TREATED *MIMULUS GUTTATUS* DC. PLANTS**

E.B. Bashmakova, P.P. Pashkovskiy

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
elenab_77@mail.ru, pashkovskiy.pavel@gmail.com

Abstract. To determine whether the enhanced stress tolerance of ZnSO₄- with NiSO₄-treated *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. plants was associated with the glutathione (GR-GSH) system, we investigated the changes in glutathione redox state and in the enzymatic activity of glutathione reductase (GR). Our studies on the Zn–Ni interactions identified the antagonizing role of Ni in Zn toxicity by the GR-GSH system.

Keywords: *Mimulus guttatus*, zinc–nickel interactions, antagonism, redox state, glutathione system