

АКТИВНІСТЬ ФОСФОЛІПАЗИ D У КОРЕНЯХ ПРОРОСТКІВ ЗА УМОВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ ТА ПЕРЕДПОСІВНОГО ОБРОБЛЕННЯ КУКУРУДЗИ ПРЕПАРАТАМИ АДАПТОГЕННОЇ ДІЇ

О. О. КОНТУРСЬКА, Т. О. ПАЛЛАДІНА

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: konturska@ukr.net

Досліджували вплив ступеня засолення середовища і оброблення насіння кукурудзи адаптогенними препаратами – метіуром та івіном – на активність фосфоліпази D у тканинах коренів та вміст фосфатидної кислоти у плазматичних мембранах. Помірний сольовий стрес зумовлює підвищення як активності ензиму, так і вмісту фосфатидної кислоти. При надмірному сольовому стресі активність фосфоліпази D знижується, тоді як вміст фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані, навпаки, підвищується. Оброблення насіння обома препаратами підвищує активність фосфоліпази D в коренях при сольовій експозиції проростків. Після передпосівного оброблення кукурудзи метіуром значного підвищення вмісту фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані не відбувається, в той час як івіну притаманний протилежний ефект. Обговорюються можливі механізми впливу івіну та метіуру на активність фосфоліпази D.

Ключові слова: кукурудза, фосфоліпаза D, фосфатидна кислота, плазматична мембрана, сольовий стрес.

Фосфоліпаза D (далі ФЛ D, КФ 3.1.4.4) каталізує розщеплення зв'язку в молекулі фосфоліпиду між його полярною голівкою та залишком фосфатидної кислоти. Крім гідролазної, ензим виявляє також трансферазну активність, здійснюючи у присутності низькомолекулярних спиртів перенесення на них фосфатидильного компонента фосфоліпиду [1]. Активність фосфоліпази D у тканинах рослин змінюється упродовж їхнього розвитку, а також під час дії таких стресорних факторів, як низькі температури, ступінь засолення ґрунтів і фітопатогенні організми, що свідчить про участь ензиму у процесах росту та адаптації рослин до несприятливих чинників довкілля [2]. За сприятливих умов їхнього розвитку вміст фосфатидної кислоти у плазматичних мембранах не перевищує 3% загальної кількості фосфоліпідів. Підвищення її рівня є типовою відповіддю організму на дію стресорного фактора [3]. За стресових умов фосфатидна кислота відіграє роль вторинного месенджера в передачі сигналів, а також як іонофор бере участь у транспортуванні іонів Са крізь мембрани [4]. Однак накопичення великої кількості її може призвести до руйнування мембран, зокрема через здатність брати участь в утворенні активних форм кисню [2].

Засолення живильного середовища є одним із найсильніших негативних чинників для росту і розвитку рослин. На сьогодні

дослідження його впливу на сільськогосподарські культури набуло гострої актуальності через глобальне потепління, що прискорює засолення ґрунтів, особливо зрошувальних [5]. Механізм дії засолення на рослинні клітини полягає в порушенні їхнього осмотичного та іонного гомеостазу і виникненні в них стану вторинного оксидативного стресу [6]. Перспективу ширшого використання засолених ґрунтів пов'язують, передусім, із підвищенням солестійкості рослин, причому радикальним способом розв'язання цієї проблеми вважається створення їхніх трансгенних форм. Однак можливий також альтернативний спосіб посилення резистентності рослин до засолення середовища та, вірогідно, і до інших негативних факторів шляхом передпосівного оброблення їх низькотоксичними дешевими сполуками – антидепресантами. У попередніх дослідженнях було висвітлено антистресові властивості препаратів метіур та івін, синтезованих в Інституті біоорганічної хімії НАН України, застосування яких знижує інтенсивність процесів пероксидного окислення у проростках кукурудзи та зменшує гальмування їхнього росту, зумовлене дією NaCl, шляхом активації системи антиоксидантного захисту [7]. У попередній роботі нами було встановлено вплив цих препаратів на активність ліпоксигенази, що бере участь у трансдукції сигналів, та структуру і стан ліпідного бішару мембран [8].

Метою роботи було з'ясувати вплив різних концентрацій NaCl та препаратів адаптогенної дії – івіну і метіуру – на активність фосфоліпази D у тканинах коренів проростків кукурудзи, а також на вміст фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані.

Матеріали та методи

Проростки кукурудзи (*Zea mays* L.) гібрида Колективний 225 MB, оброблених препаратами адаптогенної дії з антистресорними властивостями, вирощували у водній культурі на живильному середовищі Хогленда при 24 °C. Насіння обробляли метіуrom та івіном протягом однієї доби в 10^{-7} M водних розчинах цих препаратів. Сольовий стрес створювали вирощуванням 7-добових проростків кукурудзи на живильному середовищі у присутності 0,05 M NaCl (помірна стресорна концентрація) та 0,1 M NaCl (критична концентрація).

Препарати плазматичної мембрани отримували з мікосомної фракції шляхом розподілу її у градієнті густини сахарози [9]. Ліпіди екстрагували методом Блайя та Дайера [10]. Фосфоліпідний склад аналізували методом двовимірної тонкошарової хроматографії на стандартних силікагелієвих пластинках (10×10) фірми Merck (Німеччина) і з послідовним використанням системи розчинників хлороформ–метанол–бензол–0,25%-й аміак (65 : 30 : 10 : 6) та хлороформ–метанол–бензол–ацетон–оцтова кислота–вода (70 : 30 : 10 : 5 : 4 : 1). Хроматографічні зони фосфоліпідів визначали в парах йоду, а ідентифікацію їх здійснювали за допомогою стандартів фосфоліпідів та якісних реакцій [10]. Вміст фосфоліпідів тестували за кількістю неорганічного фосфору, що утворювався після їхнього озолення [9].

Активність фосфоліпази D аналізували в гомогенатах коренів проростків за рівнем утвореного фосфатидилметанолу, використовуючи як субстрат фосфатидилхолін [1]. Промиті корені подрібнювали в порцеляновій ступці в дистильованій воді (1,5 мл H₂O на 4 г наважки рослинного матеріалу). Гомогенат центрифугували (10 хв, 5000 g) на центрифугі Jouan GR20.22 (Франція). Для проведення реакції в мікропробірці додавали 35 мкл дистильованої води, 25 мкл одержаного супернатанту, 20 мкл метанолу та 40 мкл розчину фосфатидилхоліну в метанолі (10 мг/мл). Після перемішування суміш інкубували 15 хв при кімнатній температурі. Для екстракції фосфатидилхоліну та фосфатидилметанолу у пробірці додавали 340 мкл метанолу, 400 мкл хлороформу та 750 мкл 0,1%-го NaCl. Суміш залишали в холодильнику для розшарування, після чого

верхній водно-метанольний шар відділяли. На пластинки для тонкошарової хроматографії наносили 10 мкл хлороформного екстракту. Розподіл сполук здійснювали в системі розчинників хлороформ–ацетон–метанол–бензол–аміак (50 : 20 : 15 : 5 : 2). Хроматографічні зони фосфоліпідів визначали в парах йоду, ідентифікацію їх здійснювали за допомогою стандартів фосфоліпідів та якісних реакцій [10]. Кількість фосфоліпідів визначали за вмістом фосфору [9].

Повторність дослідів триразова. Одержані результати вважали статистично вірогідними, якщо $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Одержані результати свідчать, що 1- та 10-добова експозиція проростків у присутності 0,05 M NaCl у живильному середовищі підвищують активність фосфоліпази D удвічі порівняно з контрольним варіантом експерименту (рис. 1, а). Подібний ефект спостерігався також у тканинах інших рослин за дії різних стресорних факторів в роботах інших авторів [1,11]. Таке стимулювання активності фосфоліпази D за стресових умов, імовірно, пов'язане як із накопиченням у тканинах H₂O₂ [12], так і підвищенням вмісту абсцизової кислоти [13]. Водночас 1-добова сольова експозиція проростків у присутності 0,05 M NaCl збільшує вміст фосфатидної кислоти у препаратах плазматичної мембрани порівняно з контролем. Ця тенденція зберігається і в разі подовження тривалості сольової експозиції кукурудзи до 10 діб (рис. 2, б). Певна кореляція між підвищенням активності фосфоліпази D та накопиченням фосфатидної кислоти у рослинах свідчить, що саме цей ензим відіграє, очевидно, ключову роль в її утворенні за помірного засолення середовища.

Коротко- та довготривала сольова експозиція проростків за наявності в середовищі 0,1 M NaCl призводить порівняно з контролем до значного зниження у тканинах коренів активності фосфоліпази D (удвічі). Однак зменшення вмісту фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані при цьому не спостерігається, а, навпаки, відбувається збільшення її кількості залежно від тривалості дії (від 1-ї до 10-ї доби експерименту) на рослин сольового стресу (на 5,4 та 7,8% відповідно). Аналогічну тенденцію у зміні активності ензиму було виявлено у тканинах рослин тютюну [11] і водорості *Chlamydomonas* під час гіперосмотичного стресу [3]. Автори останньої публікації пояснюють накопичення фосфатидної кислоти за таких

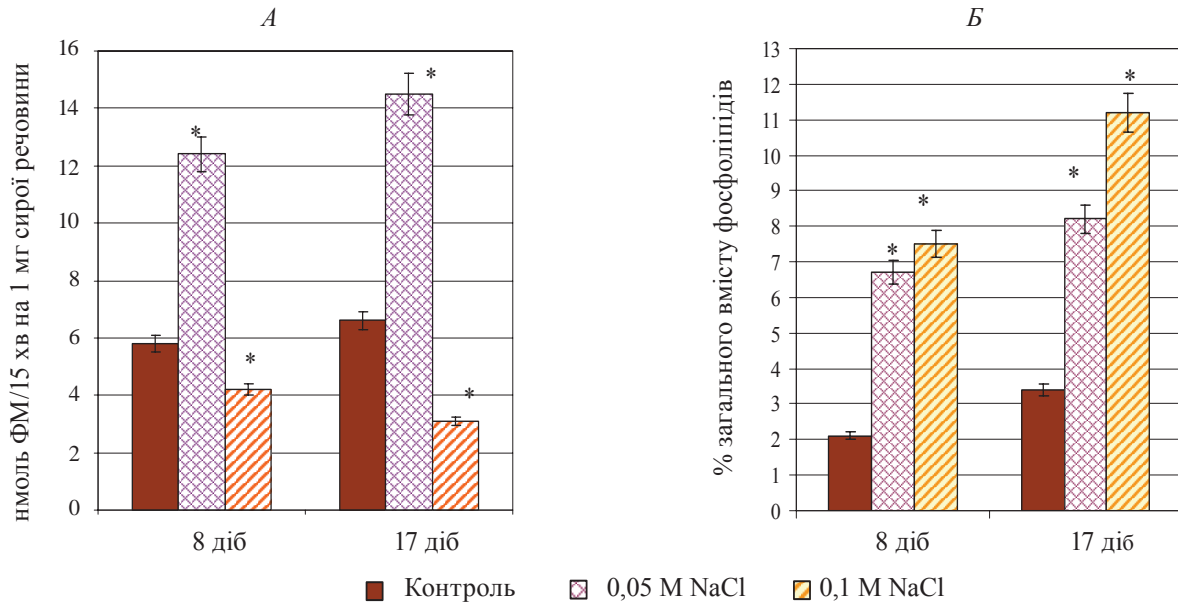


Рис. 1. Вплив рівня засолення середовища на активність фосфоліпази D (А) у тканинах коренів кукурудзи та вмісту фосфатидної кислоти (Б) у плазматичній мембрані.

Примітка. Тут і на рис. 2 та 3: * дані порівняно з контролем вірогідні, $P \leq 0,05$; ФМ – фосфатидил-метанол ($M \pm m$, $n = 6$)

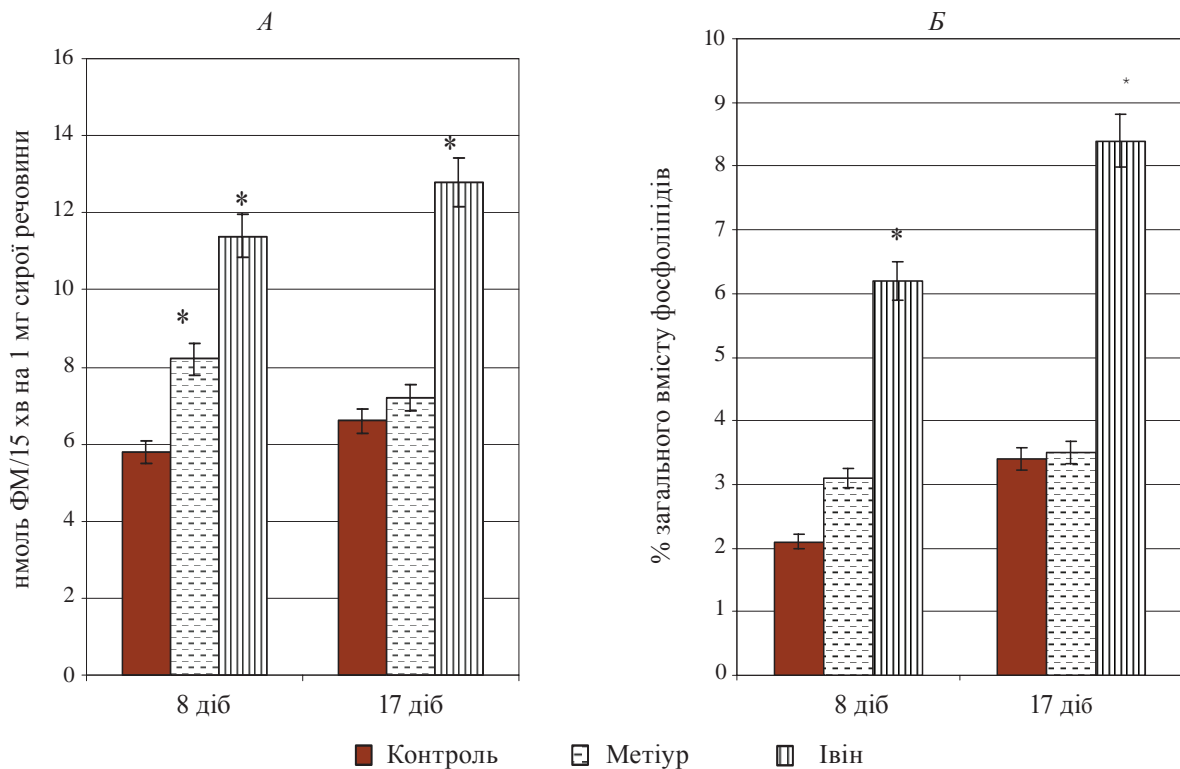


Рис. 2. Вплив передпосівного оброблення кукурудзи метіуром та івіном на активність фосфоліпази D у тканинах коренів кукурудзи (А) та вміст фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані (Б)

умов активацією DAG-кінази, яка каталізує реакцію фосфорилювання діацилгліцеролу з утворенням фосфатидної кислоти. Водночас діацилгліцерол утворюється з фосфатиділінозиту за участю фосфоліпази С, на активність якої впливають також стресорні чинники [3].

Порівняння впливу оброблення насіння кукурудзи метіуром та івіном на зазначені показники на контрольному середовищі (без засолення) свідчить про неоднакову дію адаптогенних препаратів на накопичення фосфоліпідів у коренях. Так, оброблення насіння метіуром істотно посилює у 8-добових проростків активність фосфоліпази D (в 1,5 раза) на тлі незначного підвищення рівня фосфатидної кислоти. У 17-добових проростків вірогідних змін активності фосфоліпази D та вмісту фосфатидної кислоти відносно контролю не виявлено (рис. 2). Оброблення насіння івіном стимулює активність ензиму удвічі як у 8-, так і 17-добових проростків водночас зі збільшенням вмісту фосфатидної кислоти – у 2,0 та 2,5 раза відповідно (рис. 2).

У 8-добових проростків з обробленого метіуром насіння сольовий стрес (1-денна експозиція), зумовлений 0,1 М NaCl, приводить до збільшення відносно контролю активності

фосфоліпази D удвічі, в той час як у 17-добових (10-денна експозиція) – у 2,5 раза, яке супроводжується зниженням вмісту фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані (рис. 3). 1-Добова сольова експозиція проростків з обробленого івіном насіння спричинює порівняно з контролем підвищення активності фосфоліпази D в 2,5 раза, а 10-добова – в 4,5 раза, причому за таких умов підтримується високий вміст фосфатидної кислоти у плазматичній мембрані (рис. 3).

Посилення трансферазної активності фосфоліпази D після передпосівного оброблення кукурудзи метіуром пояснюється, вірогідно, його здатністю збільшувати накопичення у тканинах абсцизової кислоти [14], яка, у свою чергу, здатна активувати цей ензим [13]. Окрім того, зміни активності фосфоліпази D можна пов'язати зі здатністю метіуру впливати на синтез білка *de novo*. Так, встановлено, що в рослинах квасолі з обробленого метіуром насіння було ідентифіковано невідомий раніше білок [15]. Зменшення вмісту фосфатидної кислоти в наших експериментах, проведених раніше, можна пояснити вірогідним впливом цього адаптогенного препарату на метаболізм фосфоліпідів, зокрема збільшенням вмісту

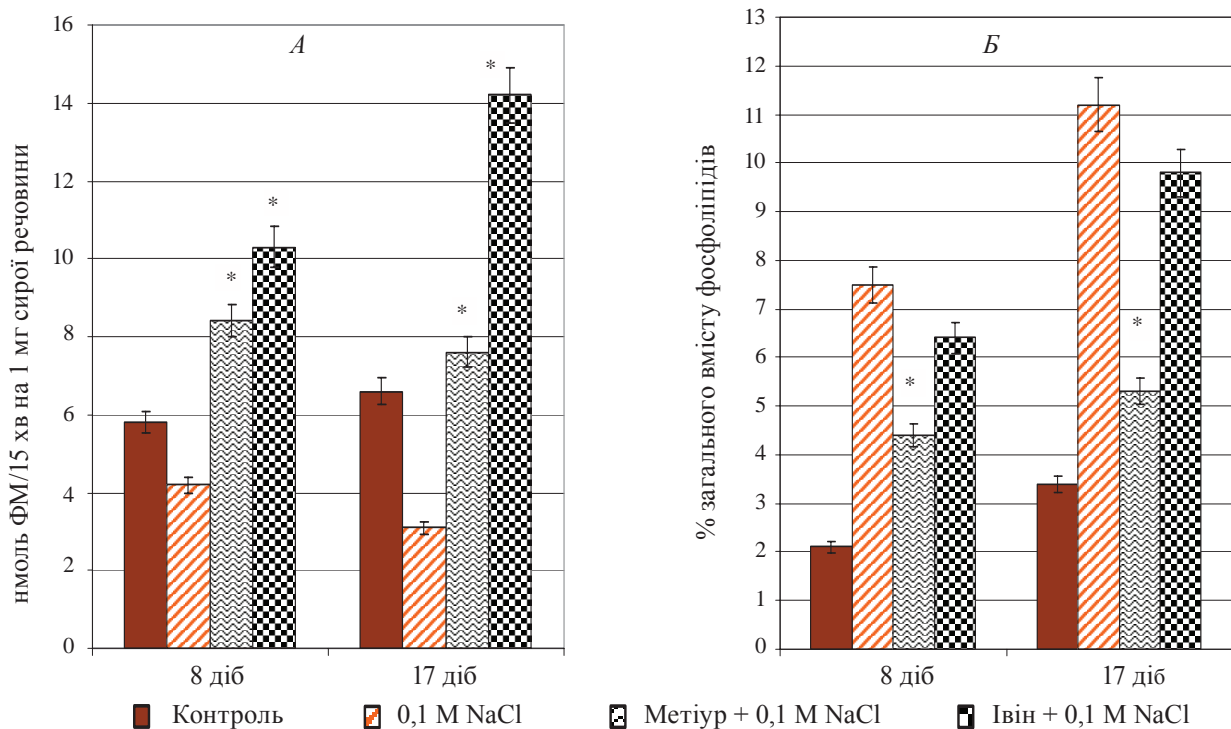


Рис. 3. Вплив передпосівного оброблення кукурудзи метіуром та івіном на активність фосфоліпази D (А) у тканинах коренів проростків та вміст фосфатидної кислоти (Б) у плазматичній мембрані за дії на кукурудзу сольового стресу

фосфатидилхоліну у плазматичній мембрані коренів проростків кукурудзи [16]. Це свідчить про посилення процесів синтезу фосфатидилхоліну, в яких фосфатидна кислота є молекуло-прекурсором для його утворення.

Підвищений вміст фосфатидної кислоти у проростках після оброблення насіння івіном підтверджує уявлення про те, що саме з дією фосфоліпази D пов'язаний значний внесок у її накопичення. Підвищений рівень фосфатидної кислоти за сольового стресу та оброблення насіння івіном свідчать про послаблення процесів синтезу фосфоліпідів, що, врешті-решт, призводить до руйнування мембран і гальмування розвитку рослин. Проте в раніше опублікованій роботі за дії сольового стресу на рослин, передпосівно оброблених препаратами адаптогенної дії, не виявлено гальмування росту коренів порівняно з контролем [18]. Отже, можна припустити, що фосфатидна кислота не тільки утворюється різними шляхами, а й виконує неоднакові функції, впливаючи на різні процеси. У рослин *Arabidopsis* ідентифіковано 12 ізоформ фосфоліпази D, які специфічні до жирнокислотних залишків певних фосфоліпідів. Автори дослідження вважають, що ці ізоензими мають різну активність і утворюють молекули фосфатидної кислоти з неоднаковим вмістом жирних кислот у положеннях 1 та 2 [2]. Підвищення активності фосфоліпази D у тканинах після оброблення насіння івіном можна пояснити його здатністю, на відміну від метиуру, стимулювати синтез загального білка [17].

Таким чином, нами було встановлено залежність активності фосфоліпази D у коренях проростків кукурудзи від концентрації NaCl у живильному середовищі, тривалості сольової експозиції та дії на насіння метиуру і івіну. Пе-

редпосівне оброблення рослин обома препаратами впливає на активність фосфоліпази D в коренях проростків кукурудзи, що сприяє їхній адаптації до засолення середовища. Однак механізм дії цих синтетичних препаратів на рослини неоднаковий.

АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПАЗЫ D В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА И ПРЕПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ КУКУРУЗЫ ПРЕПАРАТАМИ АДАПТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

О. А. Контурская, Т. А. Палладина

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев;
e-mail: konturska@ukr.net

Исследовали влияние различного уровня засоления среды и обработки семян кукурузы адаптогенными препаратами — метиуром и ивином — на активность фосфолипазы D в тканях корней и содержание фосфатидной кислоты в плазматической мембране. Умеренный солевой стресс повышает как активность энзима, так и содержание фосфатидной кислоты. При чрезмерном солевом стрессе активность фосфолипазы D снижается на фоне дальнейшего повышения уровня фосфатидной кислоты. При предпосевной обработке кукурузы метиуром значительного повышения содержания фосфатидной кислоты не происходит, в то время как ивину свойственен противоположный эффект.

Ключевые слова: кукуруза, фосфолипаза D, фосфатидная кислота, плазматическая мембрана, солевой стресс.

**PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY
IN MAIZE ROOTS BY SALT STRESS
AND PRESOWING TREATMENT
OF SEEDLINGS PREPARATIONS
OF ADAPTOGENIC ACTION**

O. O. Konturska, T. O. Palladina

Kholodny Institute of Botany, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: konturska@ukr.net

S u m m a r y

The effect of different salinity level and synthetic compounds treatment on phospholipase D activity in the root tissue of maize seedlings and the content of phosphatidic acid in plasmatic membrane has been investigated. The salt exposition to 0.05 M NaCl raised the activity of phospholipase D and the content of phosphatidic acid in the plasma membrane. The salt exposition to 0.1 M NaCl lowered the activity of phospholipase D, but raised the content of phosphatidic acid in the plasma membrane. The synthetic compounds treatment increased the activity of phospholipase D. It was shown that methyure treatment decreased the content of phosphatidic acid in the plasma membrane. The ivin treatment had the opposite effect.

Key words: *Zea mays* L, phospholipase D, phosphatidic acid, plasma membrane, salinity stress.

1. Котельникова И. М., Некрасов Э. В., Крылов А. В. // Физиол. растений. – 2004. – № 1. – С. 73–79.
2. Wang X. // Plant Physiol. – 2005. – **139**. – P. 566–573.
3. Munnik T., Mijer H. J. G., Riet B. // Plant J. – 2000. – N 22. – P. 147–154.
4. Медведев С. С., Танкелюн О. В., Батов А. Ю. и др. // Физиол. растений. – 2006. – № 1. – С. 45–53.
5. Wang W., Vinocur B., Altman A. // Planta. – 2003. – **218**, N 1. – P. 1–14.
6. Zhu J-K. // Trends in Plant Sci. – 2001. – **6**, N 2. – P. 66–71.
7. Куриленко І. М., Палладіна Т. О. // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. – 2005. – Вип. 2(7). – С. 50–54.
8. Контурська О. О., Палладіна Т. О. // Доп. НАНУ. – 2006. – № 11. – С. 184–187.
9. Биологические мембраны. Методы. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
10. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М.: Мир, 1975. – 332 с.
11. Zonia L., Munnik T. // Plant Physiol. – 2004. – **134**. – P. 813–823.
12. Zhang W., Wang C., Qin C. // Plant Cell. – 2003. – **15**. – P. 2285–2295.
13. Richie S., Gilroy S. // Plant Physiol. – 2000. – **124**. – С. 693–702.
14. Палладіна Т. О., Куриленко І. М., Ключко С. В. та ін. // Допов. НАН України. – 2001. – № 6. – С. 177–180.
15. Tsygankova V. A., Zayets V. N., Galkina L. A. // Biopolymers and Cell. – 1998. – **13**, N 5. – P. 438–448.
16. Контурська О. О., Палладіна Т. О. // Вісн. Харк. нац. аграрн. ун-ту. – 2007. – 2(11). – С. 64–68.
17. Беляева Н. В., Насырова Г. Ф., Симчук Е. Е., Пономаренко С. П. // Физиол. растений. – 1996. – **43**, № 1. – С. 94–100.
18. Куриленко І. М., Палладіна Т. О. // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 56–60.

Отримано 21.11.2007