

УДК 581.192

РОЛЬ НАКОПЛЕНИЯ ПРОЛИНА И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ОТВЕТ НА ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ZNO-НАНО У HORDEUM SATIVUM DISTICHUM**М.С. Волошина, Е.М. Вечканов, Т.М. Минкина, А.А. Плотников, С.С. Манджиева,***Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия*

Введение. В оптимальных условиях роста активные формы кислорода (АФК), включая перекись водорода (H_2O_2), супероксид (O_2) и гидроксильный радикал (ОН), постоянно производятся на низких уровнях, главным образом, в хлоропластах, пероксисомах и митохондриях растительных клеток. Баланс между выделением и удалением АФК строго контролируется антиоксидантными системами (Ape1 and Hirt, 2004). Однако в условиях экологического стресса происходит окислительное повреждение биологических важных соединений клетки, таких как, хлорофилл, мембранные липиды, белки и ДНК, что в конечном итоге приведет к гибели клеток (Bowler et al., 1992; Dat et al., 2000; Molassiotis et al., 2006). Одной из общих реакций многих видов растений, подвергающихся различным абиотическим стрессам, является накопление ферментов, таких как пролин, глицин, бетаин, холин и О – сульфат (Rhodes and Hanson, 1993; Serraj and Sinclair, 2002). Пролин – это аминокислота, которая хорошо растворима, нетоксична и имеет низкий молекулярный вес (Ashraf and Fooland, 2007). Она защищает растения, действуя как клеточный осмотический регулятор между цитоплазмой и вакуолью. Пролин действует путём детоксикации АФК, таким образом, защищая целостность мембраны и стабилизируя антиоксидантные ферменты (Sharp et al., 1990; Bandurska, 1993; Bohnert and Jensen, 1996). Механизм накопления пролина в растениях или его частях, подвергшихся стрессу, до сих пор полностью не изучен. Предполагается, что это происходит из-за снижения активности системы транспорта электронов (Venekemp, 1989; Sawhney et al., 1990; Alia et al., 1993), что приводит к накоплению $NaDH$ и H^+ . Накопление пролина, предположительно за счет синтеза из глутаминовой кислоты, может быть адаптивным механизмом для снижения уровня накопленного НАДН и кислотности ($2НАДН + 2H^+$).

Накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), в том числе и малонового диальдегида (МДА), являются следствием разрушения мембранных структур. Продукты ПОЛ могут вызывать денатурацию белков и нуклеиновых кислот (Gill, Tuteja, 2010). Вследствие этого накапливаются токсичные для клетки продукты окисления, такие, как оксипипины и окисленные пептиды (Chmielowska-Bak et al., 2015). По некоторым предположениям, накопление МДА наряду с усиленной генерацией пероксида водорода является одним из важных механизмов процесса старения у растений (Sung, Jeng, 1994). Содержание МДА отражает выраженность протекания окислительного стресса (Dhindsa et al., 1981).

Ионы цинка (Zn^{2+}) оказывают положительное, так и токсическое действие на клетки растений. Zn^{2+} активируют многие ферменты, такие как РНК-полимераза, супероксиддисмутаза, алкогольдегидрогеназа и карбоангидраза; также они участвуют в белковом синтезе и метаболизме углеводов, липидов и нуклеиновых кислот. Ионы цинка также являются частью факторов транскрипции, известных как «цинковые пальцы», которые контролируют пролиферацию и дифференцировку клеток (Palmer and Guerinot, 2009). Помимо этих функций, цинк играет важную роль в функционировании хлоропластов и некоторых их функций, таких как процесс восстановления фотосистемы II путем «рециклирования» белка D1, поврежденного световым излучением или активностью пептидазы SPP (Hansch R, Mendel R.R., 2009).

Принцип токсичности избыточных ионов цинка для растений основан на том факте, что эти ионы в клетках «конкурируют» за сайты связывания, предназначенные для других биологически активных ионов (Hansch., 2009). Одни из типичных симптомов избытка Zn, является хлороз молодых листьев, а также снижение биомассы растений и ингибирование роста корней (Broadley M.R., 2007).

Наиболее распространённым соединением Zn является его оксид (ZnO). Его обычно добавляют в пластик, стекло, керамику, цемент и резину, а также в пигменты, краски, пищевые добавки, батареи и негорючие материалы. По оценкам, ежегодно около 550 тонн наноформы ZnO производится во всем мире (Piccinno., 2012). Однако несмотря на объёмы производства, исследований, связанных с изучением токсического действия ZnO -нано на растения, всё ещё ограниченное количество.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались семена *H.sativum districum* сорта Травник, широко культивируемого на территории Ростовкой Области. Семена, визуально проверенные на отсутствие морфологических повреждений, в количестве 25 штук, размещали на равном расстоянии на фильтровальной бумаге в чашках Петри. В дальнейшем семена проращивали при 28 градусах при добавлении 5 мл дистиллированной воды на чашку Петри. После успешного прорастания проростки переносили в пластиковые сосуды (размер) в количестве 10 штук и добавляли 50 мл. раствора нано-ZnO из расчета 300 мг/кг и 2000 мг/кг (1 и 2 группа). Образцы ячменя выращивали в течение 9 дней в условиях гидропоники при постоянном перемешивании. Проводился отбор корней и листьев, которые промывали дистиллированной водой и хранили при температуре -70 °C

Определение содержания малонового диальдегида производилось с использованием тиобарбитуровой кислоты. 500 мг каллусной ткани растирали с 1,5 мл 20 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Полученный супернатант использовался для определения МДА при длине волны 535 нм и 600 нм.

Содержание пролина определяли модифицированным методом Bates et al. (1973). 100мг каллусной ткани растерли с 4 мл дистиллированной воды. Полученный супернатант использовали для определения пролина с помощью нингидриновой реакции, в ходе которой образуется сине-фиолетовой окраски пурпура Рузмана. Количество пролина определяется по интенсивности окраски раствора на спектрофотометре, при длине волны 520 нм.

Результаты и обсуждения. Было отмечено подавление роста корней, возможно связанное с закупоркой корневых волосков нано-ZnO в первой группе на 26,7 % и 43,1 % в сравнении с контролем.

Концентрация МДА была значительно снижены в листьях с более высоким содержанием пролина (на 7,2 % ZnO-нано во 2 группе (при концентрации 2000 мг/кг) и на 2 % в 1 группе (при концентрации 300мг/кг) в растворе относительно контроля (рис. 1). Это может быть вызвано с увеличением количества низкомолекулярных антиоксидантов и антиоксидантных ферментов, таких как пероксидаза, супероксиддисмутаза (SOD) или каталаза (CAT), что снижает количество малонового диальдегида в растениях (Слепцов, 2016). Также данная тенденция связана с действием пролина на ферментную активность растений. По литературным источникам, снижение МДА указывает на отсутствие окислительного стресса в частях корня и побегов *H. sativum distichum* под действием разных концентраций ZnO-нано. Таким образом, понижение содержание МДА в корнях и побегах опытных растений в исследовании, вероятно, связано с повышением концентрации пролина, что является способом адаптации растения к неблагоприятным условиям произрастания.

В 1 и 2 группе растений было отмечено увеличение пролина в листьях на 49,5 % относительно контроля в 1 группе и 9 % относительно контроля во 2 группе. В корнях наблюдалась обратная тенденция при этом количество пролина в первой группе уменьшалось на 39,4 %, а во второй группе на 46,6 % относительно контроля (рис. 2). Возможно, это связано с тем, что высокая концентрация ZnO-нано истощила запасы пролина, израсходованного на нейтрализование активных форм кислорода.

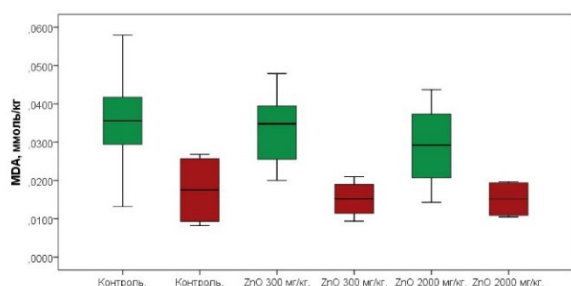


Рис. 1. Зависимость изменения малонового диальдегида в листьях и корнях ячменя от концентрации ZnO нано в растворе, ммоль/кг.

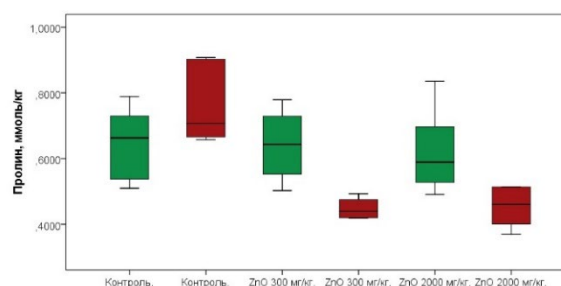


Рис. 2. Зависимость изменения эндогенного пролина в листьях и корнях ячменя от концентрации ZnO-нано в растворе ммоль/кг.

Заключение. Модельный эксперимент продемонстрировал, что наночастицы ZnO могут воздействовать на маркеры солевого стресса, тем самым нивелируя воздействие окислительного стресса. Обработка образцов ZnO-нано вызывала увеличение эндогенного пролина в растениях *H. Sativum distichum*, но снизило концентрацию малонового диальдегида.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № 0852–2020–0029

Литература

- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant* 85, 235–241.
- Ashraf, M., Fooland, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216.
- Bandurska, H., 1993. In vitro and in vivo effect of proline on nitrate reductase activity under osmotic stress in barley. *Acta Physiol. Plant* 15, 83–88.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39, 205–207.
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14, 89–97.
- Bowler, C.M., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brait JF (2002) Metal ion activated oxidative stress and its control. In: Inze D, Montagu MV (eds) *Oxidative stress in plants*. Taylor and Francis, New York, pp 171–189
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., I. Zelko, A. Lux, Zinc in plants, *New Phytol.*, 173 (2007) 677–702
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 779–795.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32, 93–101.
- Ehsanpour, A.A., Fatahian, N., 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73, 53–56.
- Garcia-Gomez C., et al., Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions, *Sci. Total Environ.*, 589 (2017) 11–24.
- Hansch R, Mendel R.R., Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12 (2009) 259–266.
- Hideg, E., 1997. Free radical production in photosynthesis under stress conditions. In: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Decker, New York, pp. 911–930.
- Latef A., Abu Alhmad M.F., Abdelfattah K.E., The Possible Roles of Priming with ZnO Nanoparticles in Mitigation of Salinity Stress in Lupine (*Lupinus termis*) Plants, *J. Plant Growth Regul.*, 36 (2017) 60–70.
- Lin, J.N., Kao, C.H., 1998. Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39, 161–165.
- Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781–1787.
- Matysik, J., Bhalu, A.B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under water stress in plants. *Curr. Sci.* 82, 525–532.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I., 2006. Boron-induced oxidative damage, antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environ. Exp. Bot.* 56, 54–62.
- Palmer C.M., Guerinet M.L., Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Nat. Chem. Biol.*, 5 (2009) 333–340.
- Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B., Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world, *J. Nanopart. Res.*, 14 (2012) 1–11.
- Rhodes, D., Hanson, A.D., 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 357–384.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25, 333–341.
- Sharp, R.E., Hsiao, T.C., Silk, W.K., 1990. Growth of maize primary root at low water potential's. *Plant Physiol.* 93, 1337–1346.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol Med* 18:321–336
- Subbaiah L.V., Prasad T., Krishna T.G., Sudhakar P., Reddy B.R., Pradeep T., Novel Effects of Nanoparticulate Delivery of Zinc on Growth, Productivity, and Zinc Biofortification in Maize (*Zea mays* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 64 (2016) 3778–3788.
- Woodward, A.J., Bennett, Ian. J., 2005. The effect of salt stress and abscisic on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 82, 189–200.
- Wu, J.T., 1998. Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (chlorophyceae) cells. *J. Phycol.* 34, 113–117.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.* 167, 527–533.
- Слепцов И.В., Журавская А.Н. Динамика накопления флавоноидов в листьях *Amaranthus retroflexus*, *Agastache rugosa* и *Thlaspi arvense*, собранных в Центральной Якутии // *Химия растительного сырья*. – 2016. – № 3. – С. 67–72.