

ORIGINAL ARTICLE

The influence of high Cd²⁺ concentration on antioxidant system of wheat etiolated shoots with different length

Kolesnichenko V.V.^{1,2}, Kolesnichenko A.V.^{3,4}

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

² Baikal Museum, Siberian Division RAS, Listvyanka, Irkutsk region, Russia

³ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division RAS, Irkutsk, Russia

⁴ Baikal Research Center, Irkutsk, Russia

*E-Mail: akol2005@mail.ru

Received July 8, 2011

The influence of high CdCl₂ concentrations on antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.) etiolated shoots with different length was studied. It is shown that wheat etiolated shoots with different length differs in reaction of their antioxidant system on Cd²⁺ influence. The rate of lipid peroxidation was the highest in Cd²⁺ treated shoots with minimal length. Between Cd²⁺ treated shoots, shoots with maximal length had the highest catalase but not peroxidase activity.

Key words: antioxidant enzymes / Triticum aestivum L / catalase / peroxidase / Lipid peroxidation / Cd stress

ORIGINAL ARTICLE

Изучение влияния высокой концентрации кадмия на функционирование антиоксидантных систем этиолированных проростков пшеницы разной длины

Колесниченко В.В.^{1,2}, Колесниченко А.В.^{3,4}

¹ Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии Наук, Москва, Россия

² Байкальский Музей СО РАН, пос. Листвянка, Иркутская область, Россия

³ Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений СО РАН, Иркутск, Россия

⁴ Байкальский Исследовательский Центр, Иркутск, Россия

*E-Mail: akol2005@mail.ru

Поступила в редакцию 8 июля 2011 г.

Изучено влияние высоких концентраций CdCl₂ на функционирование антиоксидантных систем этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L) различной длины. Установлено, что проростки разной длины отличаются по реакции своей антиоксидантной системы на воздействие кадмия. Наиболее высокий уровень интенсивности процессов перекисного окисления липидов был зафиксирован в проростках минимальной длины. Среди обработанных кадмием проростков у максимальной длины был зафиксирован наиболее высокий уровень активности каталазы, но не пероксидазы.

Key words: antioxidant enzymes / Triticum aestivum L / catalase / peroxidase / Lipid peroxidation / Cd stress

В настоящее время все большее значение приобретают вопросы антропогенного загрязнения окружающей среды, связанные, в условиях современного роста городов, промышленного строительства и развития автотранспорта, в первую очередь, с загрязнением тяжелыми металлами, которые являются крайне токсичными для организмов растений и животных уже в концентрации 10⁻⁵ М

и выше (Кузнецов, Дмитриева, 2005). Высокая опасность загрязнения тяжелыми металлами как для экосистем, так и для здоровья человека была неоднократно показана во многих работах (Stolt et al, 2006 House et al, 2003, Lars, 2003). Одним из наиболее токсичных антропогенных загрязнителей является кадмий, широко использующийся, в числе прочего, в антикоррозионных покрытиях и при

производстве аккумуляторов и при этом относящийся к металлам второго класса опасности.

К настоящему времени установлено, что кадмий снижает поглощение кислорода корнями и изолированными клетками растений, ингибирует транспорт электронов и протонов в митохондриях, вследствие чего нарушается функционирование электронно-транспортной цепи. Кадмий ингибирует активность ключевых ферментов гликолиза и пентозофосфатного окислительного пути, нарушает водный статус и рост растения (Belimov et al, 2003; Ahmad et al, 2009; Farouk et al, 2011).

Токсическое воздействие тяжелых металлов вызывает в растительной клетке образование активных форм кислорода – состояние окислительного стресса – и, следовательно, денатурацию белков, повреждение нуклеиновых кислот и интенсификацию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и вследствие этого накопление такого продукта ПОЛ, как малоновый диальдегид (МДА) (Mediouni et al, 2006, Jin et al, 2008, Kolesnichenko, 2009, Kirichenko et al, 2011). Механизмы, защищающие растительную клетку от активных форм кислорода, достаточно универсальны для всех типов стресса и включают в себя такие ферменты как пероксидазу, каталазу, глутатионпероксидазу, супероксиддисмутазу и др. (Grant et al, 1997; Ratheesh Chandra et al, 2010).

Ранее, при изучении влияния высоких концентраций кадмия на рост и развитие озимой пшеницы (*Triticum aestivum L.*, сорт «Московская 69») было установлено, что ее устойчивость к действию данного токсиканта выше, чем рапса (Колесниченко, 2009) и близка к таковой ячменя и представителей семейства Poaceae, определенной Титовым с соавторами (Титов и

др., 2008). При этом была отмечена более высокая активность пероксидазы по сравнению с двудольными (рапсом) при значительном ингибировании активности каталазы. В то же время изучение интенсивности процессов ПОЛ показало, что рост интенсивности процессов ПОЛ у пшеницы по сравнению с рапсом был незначителен (Kolesnichenko, 2009). В то же время в ходе экспериментов было отмечено, что общий пул проростков при прорастании расщепляется на несколько популяций, различающихся по длине, вследствие индивидуальной внутрисортовой изменчивости.

Индивидуальная изменчивость ответа организма на действие стрессовых факторов среды относительно мало изучена (Гончаров, Гончаров, 1993) — обычно в ходе таких исследований изучают генотипические различия и стараются в максимальной степени усреднить реакцию организма (Ahmad et al, 2009; Ci et al, 2010). В связи с этим интерес представляло выяснить в лабораторных условиях особенности внутрисортовой изменчивости роста и функционирования антиоксидантных систем проростков озимой пшеницы под действием высокой концентрации Cd^{2+} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение растительного материала

В работе были использованы этиолированные проростки и пшеницы (*Triticum aestivum L.*, сорт «Московская 69»). Для получения этиолированных проростков семена пшеницы тщательно промывали в мыльном растворе, обрабатывали в слабом растворе марганцовки и оставляли для набухания при комнатной температуре в течение 1 — 2 часа. Затем семена раскладывали в кюветы на влажную фильтровальную бумагу и проращивали в термостате при 26 °C от 3 до 10 дня.

Для изучения влияния солей кадмия на рост растений, уровень перекисного окисления липидов, активности каталазы и пероксидазы в разложенные на фильтровальной бумаге в кюветах семена пшеницы добавляли раствор $CdCl_2$ в концентрации 5 мМ.

Определение активности ПОЛ по содержанию МДА

Об изменении интенсивности ПОЛ судили по содержанию вторичного продукта ПОЛ — МДА с помощью метода Costa с соавторами (2002). Метод основан на том, что при высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с 2-ТБК, образуя розовый триметилловый комплекс с максимум поглощения при 535 нм (Costa et al, 2002).

Для проведения эксперимента брали 250 мг этилированных проростков пшеницы и гомогенизировали с 4 мл 20% трихлоруксусной кислотой (ТХУ), с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об/мин. Затем к 1 мл реакционной смеси добавляли 4 мл 0.5% ТБК, приготовленной в 20% ТХУ, и в течение 30 мин кипятили при 95°C на водяной бане, с последующим охлаждением. После охлаждения исследуемые пробы центрифугировали в течение 12 мин при 8000 об/мин. Измерение оптической плотности (E) проб проводили на фотоколориметре «КФК — 2» при длине волны 532 нм и 600 нм. Затем рассчитывали содержание МДА:

$$E_{\text{МДА}} = E_{532} - E_{600}; C = E_{\text{МДА}} / E \cdot L,$$

где C — концентрация МДА; $E_{\text{МДА}}$ — оптическая плотность; L — длина луча (для КФК — 2 = 1 см); E — коэффициент молярной экстинкции МДА ($155 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Определение активности каталазы

При определении активности каталазы исследуемых растений использовали метод

Королюк, основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс (Королюк и др., 1988).

Для этого реакцию запускали добавлением 0,1 мл растительного гомогената к 2 мл 0,03% раствора перекиси водорода. В качестве контрольной пробы использовали 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 4% молибдата аммония. Затем измеряли интенсивность окраски на фотоколориметре «КФК — 2» при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которой вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды. Расчет измерений проводили следующим образом:

$$E = (A_k - A_d) \cdot V \cdot t \cdot k \cdot \rho \text{ (мкат/л)},$$

где E — активность каталазы в мкат/л; A — оптическая плотность контрольной и опытной проб; V — объем вносимой пробы, 0,1 мл; t — время инкубации, 600 сек; k — коэффициент миллимолярной экстинкции перекиси водорода, равный $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. За единицу активности каталазы принимали то количество фермента, которое участвует в превращении 1 мкат перекиси водорода за 1 сек при заданных условиях.

Определение активности пероксидазы

Определение пероксидазной активности проводили с помощью метода H.U. Bergmeyer (1974). Измерение проводили на фотоколориметре «КФК — 2» при длине волны 436 нм. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Регистрирование скорости увеличения активности в пробах проводили, используя линейную пропорцию кривой после первоначальной лаг фазы.

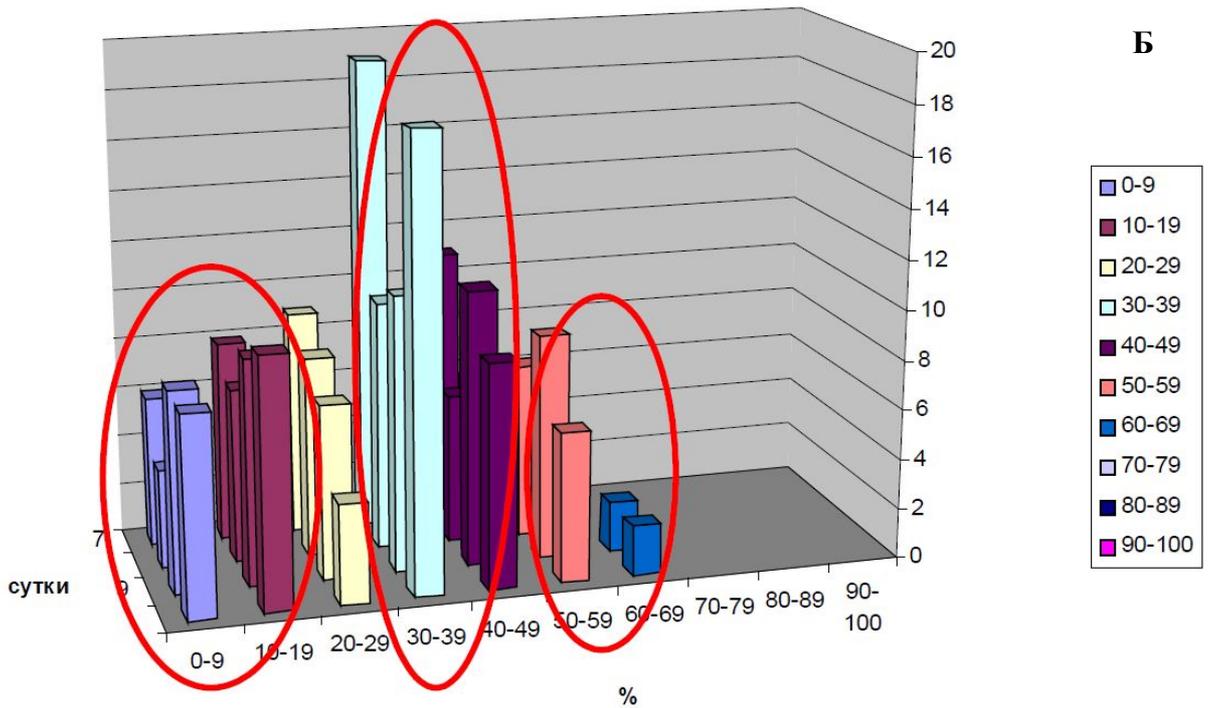
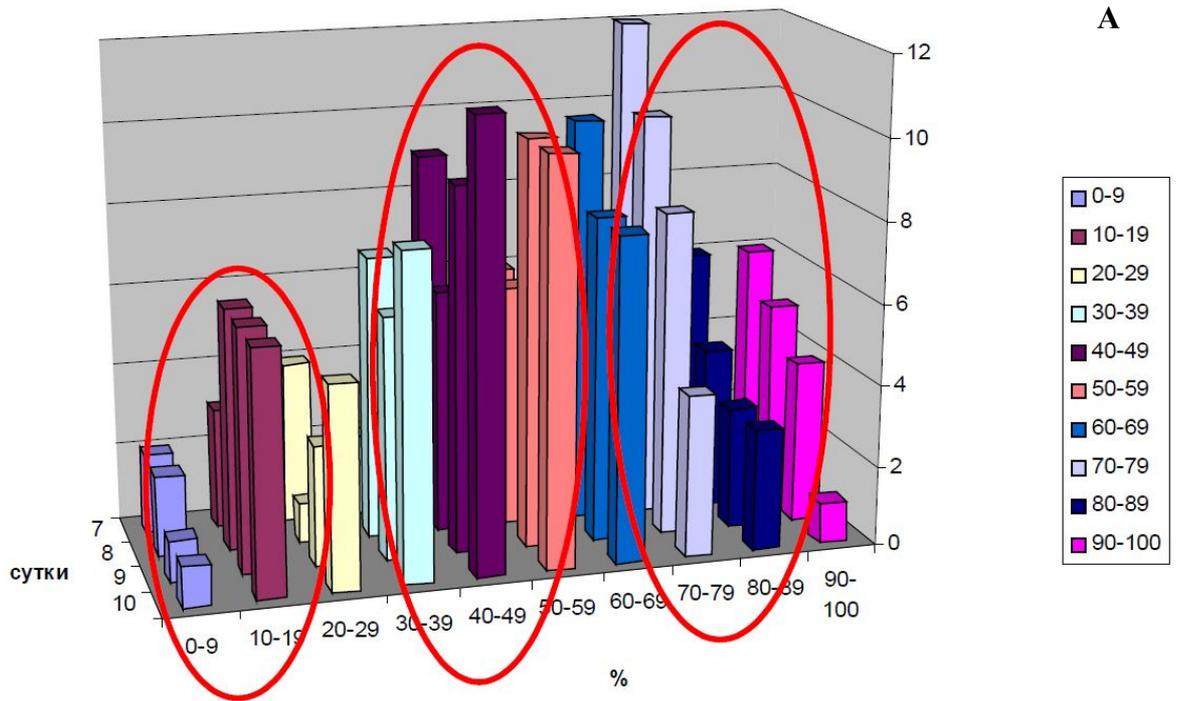


Рисунок 1. А. Вариант «Контроль». Б. Вариант «Кадмий 5 мМ». Седьмые – десятые сутки выращивания проростков. По оси ординат — среднее число проростков в соответствующем дециле.

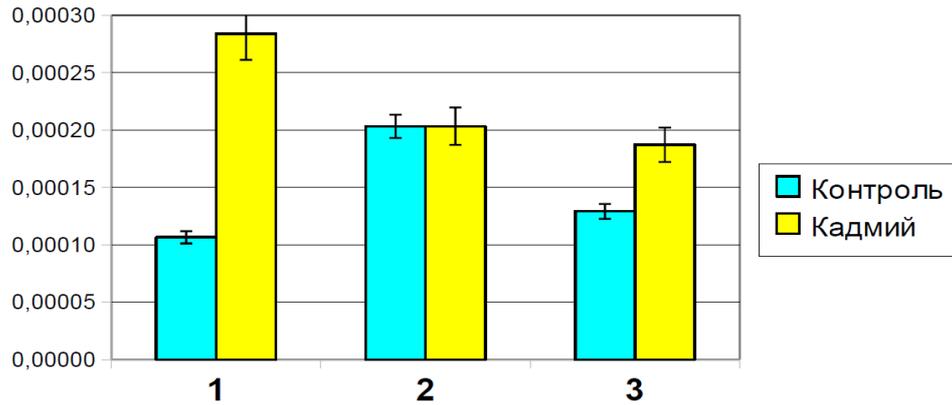


Рисунок 2. Влияние кадмия на интенсивность процессов ПОЛ по накоплению МДА.

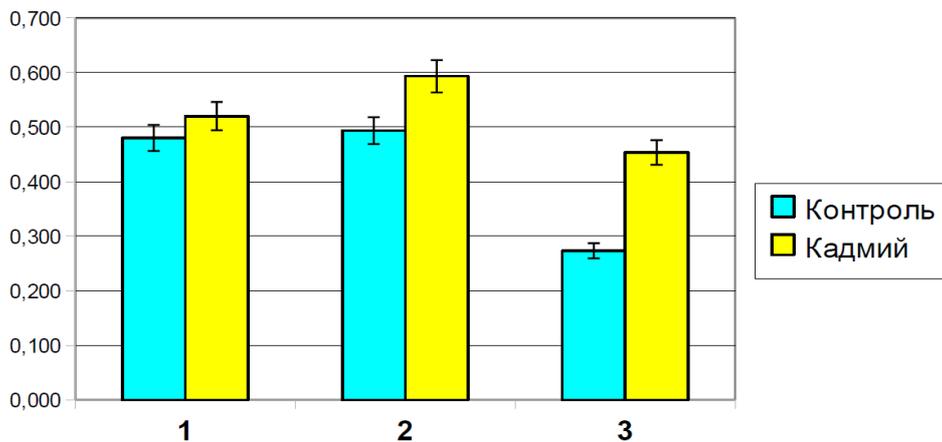


Рисунок 3. Влияние кадмия на активность пероксидазы у групп проростков с разной длиной. По оси ординат — активность пероксидазы в у.е.

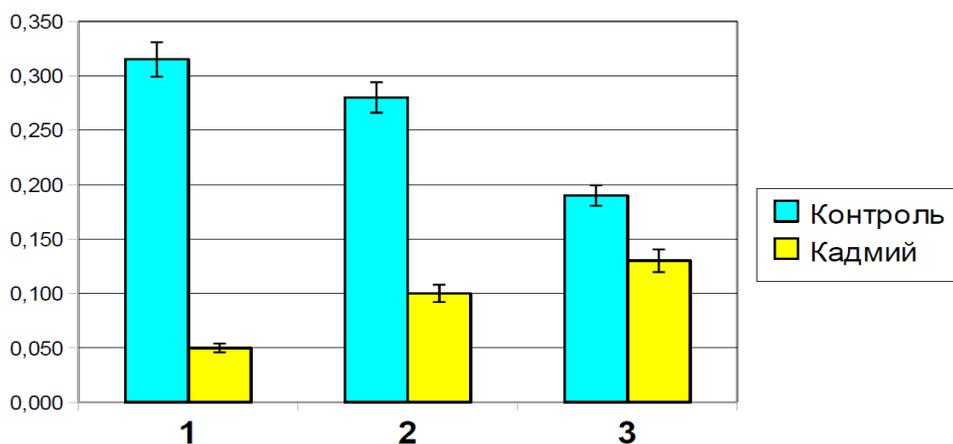


Рисунок 4. Влияние кадмия на активность каталазы у групп проростков с разной длиной. По оси ординат - активность каталазы в мкат/л

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов у этиолированных проростков озимой пшеницы от 3 до 10 суток

при прорастании также наблюдалась разная длина проростков.

Из рисунка 1а видно, что в целом,

распределение по длине у контрольных проростков соответствует нормальному, но позволяет выделить три группы проростков — 0-30% максимальной длины (21% проростков), 30-60% максимальной длины (51% проростков) и 60-100% максимальной длины проростков (28% проростков), причем за 100% длины проростков для каждого дня бралась длина наиболее длинного проростка.

Под действием кадмия максимальная длина проростков значительно снижалась (до 60-70% от максимальной длины контрольных проростков на соответствующие сутки, что, в целом, совпадает с данными Liu с соавторами (2007)), однако здесь также можно было выделить по длине три группы проростков — 0-30% (38% проростков), 30-50% (47% проростков) и 50-70% (14% проростков) от максимальной длины контрольных проростков.

Таким образом, для проведения анализа и контрольные, и стрессированные кадмием проростки были разбиты на три группы: 1 – проростки наименьшей длины; 2 – проростки средней длины; 3 – проростки максимальной длины.

У всех групп проростков проводилось определение интенсивности процессов перекисного окисления липидов, а также определение активности антиоксидантных ферментов — каталазы и пероксидазы.

Отбор проб для измерения интенсивности процессов перекисного окисления липидов по накоплению МДА проводили на 10-е сутки выращивания. В ходе эксперимента установлено, что у контрольных проростков минимальной длины (группа проростков 1) накопление МДА составляет около 0.0001 мкМ, а у основной массы проростков средней длины (группа проростков 2) накопление МДА в два раза выше- 0.0002 мкМ. У проростков максимальной

длины (группа проростков 3) накопление МДА было промежуточным между первой и второй группами и составляло приблизительно 0.00016 мкМ. Под действием кадмия картина в значительной степени изменялась. Если накопление МДА у второй группы проростков оставалась практически на том же уровне, что и у контрольных проростков, то, в отличие от контрольного варианта, максимальное накопление МДА и, следовательно, уровень ПОЛ, отмечались у первой группы проростков (минимальной длины). При этом уровень накопления МДА у данной группы проростков был практически в 3 раза выше по сравнению с соответствующей группой контрольных проростков. У проростков максимальной длины накопление МДА также было выше, чем у соответствующей группы контрольных проростков и практически достигало уровня накопления МДА в проростках средней длины. Таким образом, действие кадмия интенсифицировало процессы ПОЛ как у проростков с наименьшей длиной, так и у проростков с наибольшей длиной.

При изучении влияния кадмия на активность пероксидазы у проростков пшеницы на десятые сутки выращивания были получены следующие результаты.

У контрольных проростков 1 и 2 групп активность пероксидазы была практически одинаковой. В то же время активность пероксидазы у проростков максимальной длины была приблизительно в 2 раза ниже, чем у этих групп. Воздействие кадмия практически не оказало воздействия на активность пероксидазы у проростков 1 группы. У проростков 2 группы воздействие кадмия вызвало незначительный рост активности пероксидазы. В то же время активность пероксидазы у 3 группы проростков под действием кадмия возросла почти в два раза

по сравнению с контрольными проростками и почти достигла уровня активности у 1 и 2 групп контрольных проростков.

Активность же каталазы у контрольных проростков, в отличие от активности пероксидазы, монотонно снижалась с увеличением длины проростков. Наибольшей активностью каталазы была у проростков минимальной длины, несколько меньше — у проростков средней длины и более чем на треть меньше — у проростков максимальной длины. В то же время под действием кадмия картина изменялась на противоположную. Самой низкой активностью каталазы была у проростков минимальной длины (1 группа), при этом она составляла менее, чем одну шестую от соответствующей активности у контрольных проростков той же группы. Активность каталазы у проростков средней длины (2 группа) была выше в два раза, чем у проростков минимальной длины, но при этом она была почти в три раза ниже, чем у соответствующей группы контрольных проростков. У проростков максимальной длины (3 группа) активность каталазы была выше, чем у проростков средней длины, почти на треть, и была всего на треть ниже, чем у соответствующей группы контрольных проростков.

Таким образом, полученные данные по накоплению МДА можно интерпретировать следующим образом: более низкий уровень накопления продуктов ПОЛ у контрольных проростков первой группы по сравнению со второй группой объясняется, по-видимому, более низким общим уровнем метаболизма проростков данной группы. В то же время резкое возрастание интенсивности накопления МДА у проростков первой группы под действием кадмия можно объяснить тем, что их антиоксидантные системы не справляются с

блокированием развивающегося состояния окислительного стресса. Это предположение подтверждается также неизменностью активности пероксидазы и сильным ингибированием активности каталазы у проростков первой группы (минимальной длины). При этом надо отметить значительное увеличение доли проростков минимальной длины под действием кадмия, что вносит значительный вклад в общую картину.

У проростков второй группы (средней длины) интенсивность процессов накопления МДА под действием кадмия не менялась, при этом отмечено некоторое увеличение активности пероксидазы и значительное снижение активности каталазы.

У проростков третьей группы (максимальной длины), характеризующиеся в контроле более низким уровнем процесса накопления МДА по сравнению со второй группой проростков на фоне более низких активностей пероксидазы и каталазы, под действием кадмия накопление МДА интенсифицировалось, однако, по-видимому, за счет меньшего падения активности пероксидазы и относительного увеличения активности каталазы, по сравнению со стрессированными проростками второй группы у них менее ингибировался рост.

В целом, интересно отметить две особенности действия кадмия на активность антиоксидантных систем пшеницы у проростков разной длины:

- 1) активность пероксидазы у проростков третьей группы, как контрольных, так и стрессированных, была ниже, чем у первой и второй группы;
- 2) активность каталазы у контрольных проростков от первой группы с минимальной длиной к третьей группе с максимальной длиной

монотонно снижалась, в то время как у стрессированных — монотонно возрастала.

Таким образом, можно предположить особую важность высокой активности каталазы для сохранения роста при токсическом действии кадмия на проростки пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

- Васин А.Е. (2007) Токсичность некоторых тяжелых металлов для инфузорий рода *Paramecium*. *Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия*. №8 (58). 286-293
- Гончаров П.Л., Гончаров Н.П. Методические основы селекции растений. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та. 1993. 312 с.
- Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. (1988) Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. №1. 16–19.
- Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. (2005) Физиология растений. Москва, «Высшая школа», 736 с.
- Титов А.Ф., Казнина Н.М., Шалыго Н.В., Радюк М.С., Будакова Е.А., Лайдинен Г.Ф., Таланова В.В., Таланов А.В., Венжик Ю.В., Батова Ю.В. (2008) Устойчивость растений семейства POACEAE к кадмию. // *Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: Материалы всеросс. конф. (22–27 сентября 2008 г.)*. Часть 6: Экологическая физиология и биохимия растений. Интродукция растений. Петрозаводск: КарНЦ РАН 129-131.
- Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. (2001) Экологическая физиология растений. Москва, «Логос», 224
- Храпова Н.Г. (1982) О взаимодействии природных и синтетических антиоксидантов. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., С. 59-73.
- Ahmad I., Naeem M., Khan N.A., Samiullah (2009) Effects of cadmium stress upon activities of antioxidative enzymes, photosynthetic rate, and production of phytochelatins in leaves and chloroplasts of wheat cultivars differing in yield potential. *Photosynthetica* **47(1)**, 146-151
- Belimov, A.A, Safronova, V.I., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Kozhemyakov, A.P., Stepanok, V.V., Martenson, A.M., Gianinazzi-Pearson, V., Tikhonovich, I.A. (2003) Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* **131(1)**, Pages 25-35
- Bergmeyer H.U. (1974) Reagents for enzymatic analysis. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol I. (Eds: Bergmeyer HU, Gawehn K) *Verlag Chemie*, Weinheim 494-495.
- Ci D., Jiang D., Wollenweber B., Dai T., Jing Q., Cao W. (2010) Genetic Variance in Cadmium Tolerance and Accumulation in Wheat Materials Differing in Ploidy and Genome at Seedling Stage. *Journal of Agronomy and Crop Science* **196(4)**, 302–310
- Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. (2002) Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Science* **162(6)**, 939-945
- Farouk S., Mosa A.A., Taha A.A., Ibrahim Heba M., EL-Gahmery A.M. (2011) Protective Effect of Humic acid and Chitosan on Radish (*Raphanus sativus*, L. var. *sativus*) Plants Subjected to Cadmium Stress. *Journal of*

- Stress Physiology & Biochemistry*, **7(2)**, 99-116
- Grant Ch. M., MacIver F.H., Dawes I.W. (1997) Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **410**, 219-222.
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. (2006) Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *Biometals*. **20(2)** 185-195
- House WA, Hart JJ, Norvell WA, Welch RM (2003). Cadmium absorption and retention by rats fed durum wheat (*Triticum turgidum* L var durum) grain. *Br. J. Nutr.* **89**, 499-509.
- Jin X., Yang X., Islam E., Liu D., Mahmood Q. (2008) Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Hazardous Materials* **156(1-3)**, 387-397
- Kirichenko K.A., Pobezhimova T.P., Sokolova N.A., Dudareva L.V., Voinikov V.K. (2011) The influence of cadmium chloride on fatty acid composition of high aquatic plants from Angara river. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **7(1)**, 79-87.
- Kolesnichenko V.V. (2009) The influence of high Cd concentrations on winter wheat (*Triticum aestivum* L.) And canola (*Brassica napus* L.) etiolated shoots. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **5(1-2)**, 16-31.
- Lars J. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. **68(1)**, 167-182.
- Lindberg S, Landberg T, Greger M. (2007) Cadmium uptake and interaction with phytochelatins in wheat protoplasts. *Plant Physiol Biochem*. **45(1)**, 47-53.
- Liu Ming-Jiu¹, Liu Yan-Xia (2007) Effect to Seed Germination of Wheat in Different Density of the Cd(2+). *Seed*. **26(9)**, 31-32
- Mediouni C., Benzarti O, Tray B., Ghorbel M.H., Jemal F. (2006) Cadmium and copper toxicity for tomato seedlings. *Agronomy for Sustainable Development* **26(4)**, 227-232
- Ratheesh Chandra P., Abdussalam A.K., Salim Nabeesa, Puthur Jos T. (2010) Distribution of Bio-accumulated Cd and Cr in two Vigna species and the Associated Histological Variations. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **6(1)**, 4-12
- Stolt P., Asp H., Hultin S. (2006) Genetic variation in wheat cadmium accumulation on soils with different cadmium concentrations. *J. Agron. Crop Sci.*, **192**, 201-208.
- Webb M. (1979) The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium. *North-Holland Biomedical Press*. Elsevier. 141-173.