

УДК 581.151

В. П. Бессонова, О. Є. Іванченко

Дніпропетровський державний аграрний університет

**ЗМІНА АКТИВНОСТІ ГЛУТАМАТДЕГІДРОГЕНАЗИ
В ОРГАНАХ ДЕКОРАТИВНИХ КВІТКОВИХ РОСЛИН
ЗА ДІЇ НАДЛИШКУ Fe^{2+} ТА Cr^{3+}**

Вивчено вплив надлишку Fe^{2+} та Cr^{3+} на активність глутаматдегідрогенази в органах декоративних квіткових рослин. Встановлено підвищення активності ферменту в листках і коренях *Tagetes patula* L. протягом усього експерименту, а у *Lathyrus odoratus* L. цей показник збільшувався до 30-ї доби, після чого знижувався щодо контролю.

V. P. Bessonova, O. Y. Ivanchenko

Dnipropetrovsk State Agricultural University

**CHANGE OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY
IN THE ORGANS OF ORNAMENTAL FLOWERING PLANTS
UNDER THE INFLUENCE OF Fe^{2+} AND Cr^{3+} EXCESS**

The influence of Fe^{2+} and Cr^{3+} excess on glutamate dehydrogenase activity in the organs of ornamental flowering plants has been studied. The increase of enzymatic activity in leaves and roots of *Tagetes patula* L. was ascertained during all experiment. This index in *Lathyrus odoratus* L. had enlarged to the 30th day, whereupon went down in relation to a control.

Вступ

Аміак, що утворився в рослинах при відновленні нітратів, надалі засвоюється шляхом синтезу первинних амінокислот і амідів. Одним із можливих способів асиміляції амонію є відновне амінування α -кетоглутарату, внаслідок чого утворюється глутамат. Ця реакція каталізується ферментом глутаматдегідрогеназою (ГДГ) (К.Ф. 1.4.1.3). Певний час було прийнято вважати ГДГ головним ферментом, який забезпечує процес асиміляції аміачного азоту [8]. Із часом було відкрито ефективніший шлях здійснення цього процесу – за участю глутамінсинтетази та глутаматсинтази (ГС і ГТС), а ГДГ відводила роль участі в асиміляції азоту тільки у виняткових випадках [3]. Проте про її значення в асиміляції NH_4^+ у вищих рослин свідчать результати ряду досліджень [8]. Деякі автори вважають, що виділити серед механізмів асиміляції амонійного азоту основний важко, оскільки всі вони необхідні для забезпечення нормальної життєдіяльності рослин [13; 14]. На їх думку, роль ГДГ у процесі асиміляції амонію у тканинах рослин не можна вважати обмеженою. Мета роботи – встановити характер впливу надлишку Fe^{2+} і Cr^{3+} на активність ГДГ у листках і коренях декоративних квіткових рослин.

Матеріал і методи досліджень

Рослини чини запашної (*Lathyrus odoratus* L.) та чорнобривців розлогих (*Tagetes patula* L.) вирощували у гравійній культурі протягом 30 діб. Як джерело по-

живних елементів використовували розчин Кнопа, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1:4 із додаванням мікроелементів за Хогландом [7]. Поступово його розбавлення зменшували до 1:3, 1:2, 1:1 і не розводили. Рослини місячного віку розділяли на чотири варіанти: 1) контроль – розчин Кнопа; 2) розчин Кнопа + Fe^{2+} 1,0 мМ; 3) розчин Кнопа + Cr^{3+} 0,4 мМ; 4) розчин Кнопа + Fe^{2+} 0,1 мМ + Cr^{3+} 0,4 мМ. Як джерело Cr^{3+} використовували $CrCl_3 \cdot 6H_2O$, Fe^{2+} – $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Для підтримання необхідної концентрації мінеральних речовин і фітотоксикантів у живильному розчині останній замінювали кожні 5 діб. Активність ГДГ визначали за прописом Т. Г. Ткемаладзе [11], концентрацію білка – за Лоурі [9].

Результати та їх обговорення

У листках рослин *T. patula* та *L. odoratus*, які зростали у живильному середовищі з додаванням надлишку Cr^{3+} , змін активності ГДГ щодо контролю на 2-у добу експерименту не відбувалося (табл.). На 7-у добу активність ферменту збільшувалася відносно контролю. Рівень зростання цього показника в листках обох видів близький за значеннями.

Таблиця

Вплив надлишку Fe^{2+} та Cr^{3+} на активність глутаматдегідрогенази в органах *Tagetes patula* та *Lathyrus odoratus* (нмоль НАДН окиснен. · мг білка⁻¹ · 10 хв.⁻¹)

Доба	Контроль	Cr^{3+} 0,4 мМ	<i>t</i>	Fe^{2+} 1,0 мМ	<i>t</i>	$Fe^{2+} + Cr^{3+}$	<i>t</i>
<i>Tagetes patula</i>							
Листки							
2	0,26±0,02	0,27±0,03	0,27*	0,28±0,01	0,90*	0,25±0,02	0,35*
7	0,24±0,01	0,30±0,01	4,28	0,32±0,02	3,63	0,31±0,01	5,00
12	0,28±0,03	0,50±0,02	6,11	0,61±0,03	7,85	0,41±0,03	3,09
17	0,33±0,02	0,53±0,03	5,55	0,56±0,02	8,21	0,45±0,02	4,28
30	0,22±0,01	0,29±0,01	5,00	0,32±0,006	9,09	0,25±0,08	0,37*
Корені							
2	0,64±0,02	0,75±0,02	3,92	0,72±0,01	3,63	0,76±0,02	4,28
7	0,60±0,02	0,80±0,02	7,14	0,84±0,02	8,57	0,73±0,02	4,64
12	0,62±0,01	0,84±0,03	7,09	1,03±0,03	13,22	0,75±0,03	4,19
17	0,55±0,02	0,70±0,01	6,81	0,72±0,03	4,72	0,65±0,01	4,54
30	0,46±0,01	0,39±0,01	5,00	0,38±0,02	3,63	0,34±0,02	5,45
<i>Lathyrus odoratus</i>							
Листки							
2	0,29±0,01	0,31±0,02	0,90*	0,30±0,03	0,32*	0,32±0,02	1,36*
7	0,31±0,02	0,38±0,01	3,18	0,39±0,01	3,63	0,37±0,01	2,72
12	0,34±0,01	0,48±0,02	6,36	0,55±0,03	6,77	0,44±0,02	4,54
17	0,36±0,02	0,48±0,03	3,33	0,53±0,02	6,07	0,28±0,01	4,00
30	0,26±0,01	0,22±0,01	2,85	0,21±0,01	3,57	0,18±0,01	5,71
Корені							
2	0,82±0,02	1,01±0,02	6,78	0,98±0,02	5,71	0,99±0,03	4,72
7	0,86±0,03	1,09±0,02	6,38	1,21±0,03	8,33	1,08±0,02	6,11
12	0,93±0,01	1,03±0,01	7,14	1,13±0,02	9,09	1,00±0,02	3,18
17	0,74±0,02	0,64±0,02	3,57	0,60±0,01	6,36	0,56±0,01	8,18
30	0,62±0,01	0,45±0,02	7,72	0,43±0,01	13,57	0,35±0,01	19,28

Примітка: * – різниця між контролем і дослідом недостовірна на 5 % рівні значущості.

У наступні періоди росту дія Cr^{3+} викликала подальше підвищення активності ензиму, але ступінь змін цього показника відрізнялася у *L. odoratus* і *T. patula*. В останнього активація ферменту виражена суттєвіше і на 12-у та 17-у добу експерименту перевищувала контрольні значення на 78,5 і 60,6 %, а у *L. odoratus* – на 41,1 та 33,3 % відповідно. На 30-у добу у листках *T. patula* за дії Cr^{3+} також встановлено зро-

стання активності ГДГ щодо контролю, але менше, ніж на 17-у добу. У листках *L. odoratus* через 30 діб дії на рослини надлишку Cr^{3+} відбувалося гальмування активності ГДГ відносно норми.

При вивченні впливу надлишку Fe^{2+} на активність ГДГ у листках рослин спостерігалася така ж закономірність, як і за дії Cr^{3+} (див. табл.), проте підвищення активності ферменту відносно контролю відбувалося суттєвіше. Найістотніше збільшення активності ГДГ у дослідних видів відносно контролю спостерігалось на 12-у добу експерименту: у *T. patula* – 217,8 %, а у *L. odoratus* – 161,7 % до контролю. На 30-у добу стимуляція активності ензиму у листках *T. patula* була меншою, ніж у попередні строки досліду. У *L. odoratus* у цей період ферментативна активність пригнічувалася відносно контролю. Співставлення одержаних результатів свідчить, що величини гальмування активності ГДГ у листках обох видів у досліді, де на рослини діє надлишок або Fe^{2+} або тільки Cr^{3+} , близькі.

За спільної дії важкі метали спричиняли підвищення активності ензиму у листках *T. patula*, за винятком 2-ї та 30-ї доби експерименту, коли різниця між контролем і дослідом не суттєва. У *L. odoratus* цей показник достовірно зростав лише на 7-у та 12-у добу, після чого знижувався відносно контролю. Спільне внесення важких металів не викликало суттєвих змін активності ГДГ у листках *T. patula* на 2-у і 7-у добу експерименту порівняно з варіантами, де на рослини впливає будь-який із фітотоксикантів. Проте на наступних етапах експерименту при спільній дії надлишку металів встановлена значно менший ступінь активації ферменту, ніж за їх окремого впливу. Це ж стосується і напрямку зміни ензиматичної активності у листках *L. odoratus* до 12-ї доби включно. На 17-у добу вирощування цих рослин у розчині з присутністю обох забруднювачів виявлено пригнічення активності ГДГ щодо контролю, у той час як будь-який із них активує її.

Слід відзначити, що ферментативна активність у коренях рослин контрольного варіанта вища, ніж у листках. За дії на рослини важких металів підвищення активності ГДГ відносно контролю спостерігалось вже на 2-у добу досліду. На 7-у добу експерименту цей показник у коренях *T. patula* за дії надлишку Fe^{2+} дорівнював 140,0 %, Cr^{3+} – 133,3 %; *L. odoratus* – 140,6 і 126,7 %, відповідно. У коренях *T. patula* на 12-у добу перевищення активності ГДГ над контрольними значеннями у варіанті з Cr^{3+} залишалось таким самим, як і на 7-у, а у досліді з Fe^{2+} – зростало. На 17-у добу рівень активації ферменту важкими металами у цього виду знижувався порівняно з попереднім строком, а у *L. odoratus* падав щодо норми. За тривалого впливу на корені або Fe^{2+} або Cr^{3+} (30-а доба) спостерігалось інгібування активності ГДГ у коренях рослинних об'єктів порівняно з контролем.

За умов одночасного впливу фітотоксикантів у коренях *T. patula* підвищення активності ГДГ відбувалося вже на 2-у добу досліду і тривало до 17-ї доби включно. Активація ензиму виражена менш суттєво, ніж у варіантах, де у живильне середовище вносили будь-який з металів. На 30-у добу експерименту спостерігалось зниження показника на 26,1 %. У коренях *L. odoratus* активність ГДГ зростала з 2-ї по 12-у добу (на 120,7, 125,6 і 107,5 %, відповідно), після чого спостерігалось послаблення активності ферменту відносно контролю. Одночасна дія металів у коренях *L. odoratus* викликала практично такі ж зміни активності ГДГ, як і під впливом Cr^{3+} .

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у коренях за нетривалої дії нефізіологічних концентрацій Fe^{2+} і Cr^{3+} відбувається підвищення активності ферменту, хоча збільшення терміну росту рослин на живильному середовищі з важкими металами веде до інгібування його активності, причому у *L. odoratus* раніше – з 17-ї доби, а у *T. patula* – на 30-у добу.

Розглянемо можливі причини зміни активності ГДГ у вегетативних органах декоративних квіткових рослин за дії важких металів. У літературі є відомості, що за дії несприятливих чинників відбувається індукція і/або посилення синтезу ГДГ під впливом ендогенного амонію, відповідального за збільшення активності ензиму. Це спостерігається в процесі старіння і темнового стресу у зрізаних листках паростків гарбуза (*Cucurbita pepo* L.) [17], за дії гербіциду 2,4-Д у гороху посівного (*Pisum sativum* L.) і кукурудзи (*Zea mays* L.) [11]. Показано значну стимуляцію ГДГ активності у листках озимої пшениці *in vitro* при додаванні Cu^{2+} і Cd^{2+} [6]. Проте у сім'ядолях гарбуза показано інгібуючу дію Zn^{2+} на активність ГДГ [12]. Але слід відзначити, що у цьому випадку Zn^{2+} додавався безпосередньо до інкубаційного середовища з ферментом, а не надходив до клітин інтактної рослини при її вирощуванні у середовищі з надлишком металу. В. І. Бабенко і Ф. Д. Нарійчук [1] також вказують на зниження активності ГДГ у ізольованих хлоропластах пшениці за дії негативних температур при загартовуванні. В. Пахліч [15] спостерігав підвищення активності ГДГ рослин після їх окурювання SO_2 . Таким чином, ряд стресових чинників викликає підвищення активності ГДГ.

В. Л. Кретович із співавторами [8] вважає, що ГДГ рослин може ефективно брати участь в асиміляції амонію тільки за умов високої його концентрації, коли синтез глутамату та активність ГС пригнічені. За результатами наших експериментів надлишкові концентрації Fe^{2+} та Cr^{3+} у середовищі призводять до збільшення вмісту NH_4^+ у тканинах вегетативних органів [4]. Це супроводжується інгибуванням активності ГС – ферменту, який поряд з ГТС є провідним у первинній асиміляції амонію [5]. Отже, активізація ГДГ у листках і коренях квіткових рослин за дії на них фітотоксичних концентрацій Fe^{2+} і Cr^{3+} , можливо, пов'язана зі збільшенням кількості амонію у тканинах.

Важкі метали інгібують активність ферментів завдяки заміні ними первинного металу, що зменшує або зовсім пригнічує їх каталітичну активність [16]. Метал у складі ГДГ не виявлено [8]. Можливою причиною пригнічення активності ферментів є коагуляція білків [16] або окиснення *SH*-груп унаслідок ініціації вільнорадикальних процесів важкими металами [2]. Проте у літературі є відомості про велику стійкість деяких ГДГ до денатуруючих чинників. Л. П. Лосева та ін. [10] пояснює стійкість ГДГ до концентрованого розчину сечовини наявністю великого гідрофобного ядра, що стабілізує її олігомерну структуру.

Отже, на активність ГДГ діють два різноспрямованих чинники: опосередковано – підвищення вмісту амонійного азоту у вегетативних органах рослин за умов дії на них надлишку Fe^{2+} і Cr^{3+} , у той час як безпосередньо важкі метали на фермент впливають негативно. Ступінь зміни активності ферменту залежить від співвідношення сили дії цих чинників та стійкості ензиму. Зростання активності ГДГ за умов дії на рослини надлишку заліза та хрому має суттєве позитивне значення з погляду адаптаціогенезу рослин. Підвищення активності цього ферменту якоюсь мірою компенсує зниження активності інших ферментів асиміляції амонію.

Висновки

Надлишок Fe^{2+} та Cr^{3+} спричиняв піднесення активності ГДГ в органах декоративних квіткових рослин. У листках відносно стійкого за морфологічними ознаками виду *T. patula* вища ферментативна активність зберігалася протягом усього експерименту, а у *L. odoratus* вона знижувалася щодо контролю на 30-у добу експерименту.

У коренях *T. patula* перевищення активності ГДГ над контролем визначено протягом усього досліду (за винятком 30-ї доби), у *L. odoratus* – протягом 12 діб, після чого активність ферменту знижувалася.

У зв'язку зі значною та однотипною реакцією ГДГ на надлишкові концентрації Fe^{2+} та Cr^{3+} у листках *T. patula* динаміку змін активності ензиму можна використовувати у моніторингових дослідженнях як маркер стану довкілля, забрудненого металами. Для з'ясування повнішої картини доцільності застосування активності ГДГ у фітоіндикації важливо вивчити характер змін цього показника в органах рослин у польових умовах за градієнтом концентрації важких металів.

Бібліографічні посилання

1. **Бабенко В. И.** Влияние пониженной температуры на малат- и глутаматдегидрогеназу хлоропластов озимой пшеницы / В. И. Бабенко, Ф. Д. Нарийчук // Доклады АН СССР. – 1976. – Т. 228, № 5. – С. 1252–1255.
2. **Бессонова В. П.** Цитофизиологические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. – Запорожье: ЗДУ, 1999. – 208 с.
3. **Измайлов С. Ф.** Азотный обмен в растениях. – М.: Наука, 1986. – 320 с.
4. **Иванченко О. Є.** Вплив надлишку заліза та хрому на накопичення аміачного азоту в вегетативних органах *Lathyrus odoratus* // Питання біоіндикації та екології. – 2002. – Вип. 7, № 2–3. – С. 63–71.
5. **Иванченко О. Є.** Зміна активності глутамінсинтетази в листках і коренях *Lathyrus odoratus* при дії надлишку заліза (II) та хрому (III) у живильному середовищі // Питання біоіндикації та екології. – 2004. – Вип. 9, № 1. – С. 89–95.
6. **Иванюк Г. В.** Вплив фітохром, двовалентних катіонів і регуляторів їх мембранної проникності на активність НАДН-глутаматдегідрогенази озимої пшениці // Физиология и биохимия культурных растений. – 1997. – Т. 29, № 5. – С. 333–337.
7. **Клейн Р. М.** Методы исследования растений / Р. М. Клейн, Д. Т. Клейн. – М.: Колос, 1974. – 526 с.
8. **Кретович В. Л.** Обмен азота в растениях. – М.: Наука, 1972. – 527 с.
9. **Плешков Б. П.** Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, 1976. – 225 с.
10. **Структурные особенности конstitutивной ГАД(Ф)-глутаматдегидрогеназы *Chlorella pyrenoidosa* 82 Т** // Л. П. Лосева, В. Р. Шатилов, Т. А. Валуева, В. Л. Кретович // Доклады АН СССР. – 1981. – Т. 257, № 6. – С. 1483–1487.
11. **Ткемаладзе Г. Ш.** Влияние 2,4-Д на активность глутамат- и малатдегидрогеназы в проростках гороха и кукурузы // Физиология растений. – 1981. – Т. 28, № 5. – С. 1013–1021.
12. **Chou K. H.** Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons: characterization and isoenzymes / K. H. Chou, W. E. Splittstoesser // Plant Physiol. – 1972. – Vol. 49, N 4. – P. 550–554.
13. **Dark starvation and plant metabolism. IV. The alteration of enzyme activities** // G. Jacobi, B. Klemme, G. Krapf, C. Postius // Biochem. und Physiol. Pflanz. – 1975. – Bd. 168, N 1/4. – S. 247–256.
14. **Loyola Vargas V. M.** Differential roles of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize-tissue / V. M. Loyola Vargas, E. S. Jimenes // Plant Physiol. – 1984. – Vol. 76, N 5. – P. 536–540.
15. **Pachlich E.** Effect of SO_2 on activities of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase from pea seedlings / E. Pachlich, H. J. Jäger, L. Steubing // Gegev. Bot. – 1972. – Vol. 46, N 4. – P. 183–197.
16. **Williams J. P.** Heavy metals in biological systems // Endeavour. – 1967. – Vol. 26. – P. 96–100.

Надійшла до редколегії 22.03.2007