



УДК 581.198

## Вплив $\text{Cu}^{2+}$ та кислотності середовища на вміст цитоплазматичного кальцію та перекисне окиснення ліпідів у коренях озимої пшениці

М.Є. Рязанова, Т.І. Маковейчук, В.В. Швартау

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна*

Досліджено вплив іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на внутрішньоклітинний гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  та перекисне окиснення ліпідів в умовах різної кислотності середовища. Показано, що зниження рН середовища зумовлює підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  і може бути відгуком клітин кореня на кислотний стрес. Додавання міді до середовища для пророщування насіння ймовірно підвищує неселективну проникність мембрани та спричинює її деполаризацію. Це може активувати Са-канали, що активуються за умов деполаризації та відповідають за надходження кальцію до цитоплазми з апопласту. Підвищення рівня МДА свідчить про наявність окисного стресу, який може активувати гіперполяризаційні Са-канали, що також впливають на  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Таким чином, зміни інтенсивності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних метаболічних процесів (регуляція поділу клітин та ріст кореня) можуть бути наслідком токсичного впливу іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на рослини озимої пшениці.

*Ключові слова:* токсичність міді;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ; кислотність середовища; малоновий діальдегід; Fluo-3 AM; Са-канали

## Effect of $\text{Cu}^{2+}$ and pH on intracellular calcium content and lipid peroxidation in winter wheat roots

M.E. Riazanova, T.I. Makoveychuk, V.V. Schwartau

*Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine*

The study investigates the effect of copper ions and pH of external solution on intracellular calcium homeostasis and lipid peroxidation in winter wheat roots. Experiment was carried out with winter wheat. Sterile seeds were germinated in Petri dishes on the filter paper soaked with acetic buffer (pH 4.7 and 6.2) at 20 °C in the dark for 48 hours. Copper was added as  $\text{CuSO}_4$ . It's concentrations varied from 0 to 50  $\mu\text{M}$ . The  $\text{Ca}^{2+}$ -fluorescent dye Fluo-3/AM ester was loaded on 60 hour. Root fluorescence with Fluo-3 loading was detected using X-Cite Series 120 Q unit attached to microscope Olympus BX53 with camera Olympus DP72. Imaging of root cells was achieved after exciting with 488 nm laser and collection of emission signals above 512 nm. Preliminary analysis of the images was performed using software LabSens; brightness (fluorescence intensity) analysis was carried out by means of ImageJ. Peroxidation of lipids was determined according to Kumar and Knowles method. It was found that pH of solution had effect on release of calcium from intracellular stores. Low pH provokes an increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  which may be reaction of roots to acidic medium. Copper induces increase in non-selective permeability of plasma membrane and leads to its faster depolarization. This probably initiates Ca-dependent depolarization channels which are responsible for the influx of calcium from apoplast into the cell. Changing of the membrane permeability may occur due to interaction between  $\text{Cu}^{2+}$  ions and Ca-binding sites on plasma membrane or may be due to binding of copper with sulfhydryl groups and increasing of POL. Copper may also damage lipid bilayer and change the activity of some non-selective channels and transporters. Reactive oxygen species which are formed under some types of stress factors, especially the effect of heavy metals, can be activators of Ca-channels.  $\text{Cu}^{2+}$  ions rise MDA content and promote the oxidative stress. Low medium pH also induces its development. Oxidative stress apparently enhances activity of hyperpolarization of Ca-channels and leads to increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . These Ca-channels may also be stimulated by calcium, which influxes into the cell, so Ca-signal can be self-enhanced one. Prolonged retention of high calcium concentration may be the evidence of copper toxicity to root cells and the consequence of deactivation of Ca-ATPases which promote Ca efflux from cell. The increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  may elicit changes in some metabolic processes.

*Keywords:* copper toxicity;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ; pH; malondialdehyde; Fluo-3 AM; Ca-channels

## Вступ

Кислотність середовища має домінуючий вплив на розчинність і, як наслідок, на доступність і потенціал фітотоксичності іонів (Rengel, 2011). У лужному середовищі спостерігається зниження доступності P, Zn, Fe та Cu, у кислому зростає токсичний вплив Al та Mn. Вважається, що оптимальний рівень pH для засвоєння елементів живлення озимою пшеницею становить 6,0–7,5 (Zynchenko et al., 2001).

Мідь – один із найважливіших мікроелементів для рослин. Нормальний ріст і розвиток потребує оптимальної кількості  $\text{Cu}^{2+}$ . У той же час діапазон концентрацій  $\text{Cu}^{2+}$ , які не чинять негативного ефекту на рослини, достатньо вузький. Незважаючи на можливі негативні ефекти, обробка рослин Cu-фунгіцидами залишається одним із поширених підходів до культивування широкого спектра культур (Barker and Pilbeam, 2006; US EPA, 2008). Серед можливих пояснень токсичного впливу іонів міді на рослинні клітини у літературі найчастіше зустрічається посилення перекисного окиснення мембранних ліпідів, зміна їх складу та підвищення неспецифічної проникності мембран (Berglund et al., 2002; Kanoun-Boulé et al., 2008; Hong et al., 2012), але механізм дії залишається не з'ясованим.

Іони кальцію володіють унікальними властивостями й універсальною здатністю щодо проведення різних сигналів, які здійснюють первинну дію (гормони, патогени, світло, гравітація тощо) (Medvedev, 2005). У кожній із відомих у рослин систем сигнальної трансдукції велике значення як вторинний посередник мають іони  $\text{Ca}^{2+}$ . Кальцій – ефективний регулятор метаболічних процесів у всіх клітинах, де існують системи, які реагують на невеликі зміни його концентрації. Основні внутрішньоклітинні мішені для іонів кальцію – різноманітні Ca-зв'язувальні білки, одні з яких самі змінюють свою активність (Lewit-Bentley and Rety, 2000), а інші (наприклад, кальмодулін) опосередковують ефект цього катіона на різноманітні клітинні мішені (Roberts and Harmon, 1992). Мета даної статті – виявити вплив іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на внутрішньоклітинний гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  та перекисне окиснення ліпідів за різної кислотності середовища.

## Матеріал і методи досліджень

Стерилізоване (опромінювач бактерицидний ОБН-35м) насіння озимої пшениці сорту Смуглянка (*Triticum aestivum* L.) пророщували у чашках Петрі на двошаровому фільтрувальному папері, змоченому стерильним середовищем із pH 4,7 та 6,2 (5 мМ ацетатний буфер) у темряві, за +20 °C протягом 48 год (хладотермостат ХТ 3/70-2). На 48-му годину проводили обробку  $\text{CuSO}_4$  (50 мкМ). Завантаження коренів флуоресцентним індикатором Fluo-3AM (Sigma) робили за методикою, описаною Zhang et al. (1998). Інтактні корені довжиною 0,5 см інкубували за +4 °C упродовж двох годин у темряві. Розчин для інкубації містив 20 мкМ Fluo-3AM, 0,2 мМ  $\text{CaCl}_2$  та 50 мМ сорбітолу. Розчин Fluo-3 AM додано з вихідного розчину 1 мМ Fluo-3AM у ДМСО. Фінальна концентрація ДМСО в інкубаційному розчині

складала <1%. Після інкубування корені змивали буферним розчином протягом 15 хв. Флуоресценцію коренів, пофарбованих Fluo-3 AM, досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX53 із люмінесцентним блоком X-Cite Series 120 Q і камерою-детектором Olympus DP72 за довжини хвилі збудження 488 нм, хвилі емісії – 512 нм (зелений світлофільтр). Контролем слугувала дистильована вода. Повторність проведення досліду – чотириразова, аналітична семиразова.

Рівень ПОЛ визначали за накопиченням малонового дільдегіду (МДА) методом Kumar and Knowles (1993) із деякими модифікаціями. 200 мг коренів гомогенізували з невеликою кількістю Tris-NaCl буфера (pH 7,6), об'єм екстракту доводили до 3 мл. До отриманого гомогенату додавали 1 мл 0,5% розчину тіобарбітурової кислоти (ТБК) та 2 мл 20% трихлороцтової кислоти (ТХО). Пробірки з гомогенатом витримували 30 хв на киплячій водяній бані з наступним центрифугуванням за 3 000 об./хв протягом 10 хв. Визначення проводили за довжини хвилі 533 нм на спектрофотометрі UV-1800 (Shimadzu).

Сушу біомасу визначали відповідно до ГОСТ 16932-93.

Попередній аналіз отриманих зображень проводили за допомогою програмного забезпечення LabSens, аналіз яскравості (інтенсивності флуоресценції) – ImageJ.

Статистичну обробку даних робили за допомогою програми Statistica 6.0.

## Результати та їх обговорення

У стані спокою вміст іонізованого кальцію у цитоплазмі рослинних клітин надзвичайно малий і варіює від 100 до 200 нМ (Medvedev, 2005; Schwartau et al., 2014). Підвищення цитозольного вмісту кальцію діє як сигнал, що викликає зміни фізіологічних та біохімічних процесів (Webb et al., 1996; Pandey et al., 2000). Кислотність середовища впливає на концентрацію  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . За pH 4,7 спостерігається підвищення концентрації  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  у 1,5 раза порівняно з оптимальним рівнем pH (рис. 1). Це можна пояснити відгуком кальцієвої сигнальної системи на кислотний стрес (Vodnecv et al., 2007). Додавання іонів  $\text{Cu}^{2+}$  до розчину для пророщування насіння викликає підвищення внутрішньоклітинного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в обох варіантах досліду. У праці Demidchik et al. (1997) показано, що 10 мкМ  $\text{Cu}^{2+}$  зумовлює швидке підвищення неселективної проникності мембрани та її деполаризацію. Це може ініціювати  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, що активуються за умов деполаризації та відповідають за надходження кальцію до цитоплазми з апопласту (Thion et al., 1998). На плазмалемі існує багато сайтів впливу іонів  $\text{Cu}^{2+}$ . Одними з них є канали іонного відтоку, зміна активності яких може бути наслідком перебудови ліпідного бішару або інших неселективних каналів і переносників. Зміна проникності мембрани може відбуватись внаслідок взаємодії між іонами  $\text{Cu}^{2+}$  та Ca-зв'язувальними сайтами на плазмалемі (Murphy et al., 1999), або бути результатом взаємодії  $\text{Cu}^{2+}$  із сульфгідрильними групами мембранних білків та підвищенням ПОЛ. Цілісність ліпідного бішару може пошкоджуватись унаслідок витискання фізіологічно важливих катіонів з їх центрів зв'язування на поверхні мембрани, загального динамічного пошкодження та підвищення кількості ко-

роткотривалих пор (Demidchik et al., 1997, 2001). Активні форми кисню (АФК), які формуються за деяких типів стресових чинників (наприклад, вплив важких металів), можуть також виступати як активатори Са-проникних каналів. Окисний стрес спричинює підвищення рівня  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  у тваринних (Klyubin et al., 1996), а також рослинних клітинах (Zhang et al., 1998; Cessna and Low, 2001). У корневих волосках АФК, імовірно, стимулюють канали, які активуються за умов гіперполяризації (Pei et

al., 2000; Lecourieux et al., 2002). Останні додатково можуть стимулюватися кальцієм, що надходить у клітину, тобто Са-сигнал здатен до самопосилення (Demidchik, 2012). Підтримання високої концентрації  $Ca^{2+}$  протягом тривалого часу може свідчити про токсичний вплив іонів міді на клітини коренів і проявлятися в інактивації Са-каналів тонопласту, які сприяють завантаженню  $Ca^{2+}$  назад до вакуолі, а також деактивації Са-АТФаз, що сприяють відтоку  $Ca^{2+}$  з клітини.

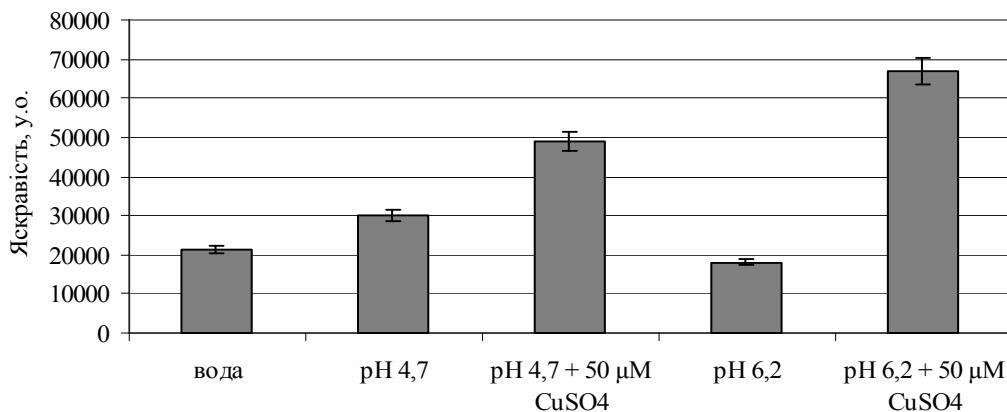


Рис. 1. Вплив сульфату міді на вміст внутрішньоклітинного кальцію у корнях озимої пшениці залежно від рН середовища

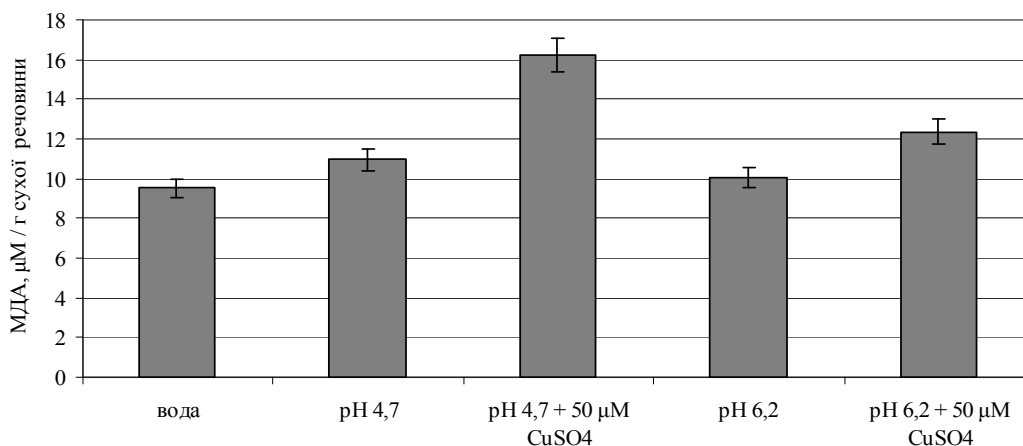


Рис. 2. Вплив сульфату міді на вміст МДА у корнях озимої пшениці залежно від рН середовища

Для перевірки наявності окисного стресу провели аналіз накопичення продукту ПОЛ – малонового діальдегіду. На рисунку 2 видно, що підвищення концентрації  $Cu^{2+}$  викликало зростання концентрації МДА за рН 4,7 на 47%, а за рН 6,2 – на 23%, відповідно. Слід зазначити, що зниження рН середовища для пророщування підвищує токсичний вплив  $Cu^{2+}$ , що узгоджується з літературними даними (Mortvedt et al., 1991).

### Висновки

Вплив іонів  $Cu^{2+}$  стимулює підвищення  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  у корнях озимої пшениці, що може проявлятися у зміні інтенсивності  $Ca^{2+}$ -залежних метаболічних процесів (регуляція поділу клітин та ріст кореня) та є наслідком токсичного впливу іонів  $Cu^{2+}$  на рослини озимої пшениці. Зростання кількості МДА свідчить про наявність окис-

ного стресу, який розвивається з підвищенням концентрації іонів  $Cu^{2+}$  і посилюється за умов збільшення кількості іонів водню у середовищі.

### Бібліографічні посилання

- Barker, A.V., Pilbeam, D.J., 2006. Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, Boca Raton.
- Berglund, A.H., Quartacci, M.F., Calucci, L., Navari-Izzo, F., Pinzino, C., Liljenberg, C., 2002. Alterations of wheat root Plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles. Bioch. Biophys. Acta. Biomembranes 1564(2), 466–472.
- Cessna, S.G., Low, P.S., 2001. Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent release of  $Ca^{2+}$  from internal stores. Planta 214, 126–134.

- Demidchik, V., Sokolik, A., Yurin, V., 2001. Characteristics of non-specific permeability and H-ATPase inhibition induces in plasma membrane of *Nitella flexilis* by excessive  $\text{Cu}^{2+}$ . *Planta* 212, 583–590.
- Demidchik, V.V., 2012. Membrannyye mehanizmy regulyatsii aktivnosti ionov kal'ciya v citoplazme kletok vysshih rasteniy [Membrane mechanisms of regulation ion calcium activity in cell cytoplasm of higher plants]. *Trudy BGU* 7(1), 99–105 (in Russian).
- GOST 16932-93 Cellulose. Opređenje sodержaniya suhogo veshhestva [Determination of dry matter content]. State standard of Ukraine.
- Hong, R., Kang, T.Y., Michels, C.A., Gadura, N., 2012. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(6), 1776–1784.
- Kanoun-Boulé, M., De Albuquerque, M.B., Nabais, C., Freitas, H., 2008. Copper as an environmental contaminant and essential nutrient: Consequences to plant and human health. In M.N.V. Prasad (Ed.), *Trace elements as contaminants and nutrients: Consequences in ecosystems and human health*. Wiley and Sons Inc, Hoboken, New Jersey. P. 653–678.
- Klyubin, I., Kiprichnikova, K.M., Gamaley, I.A., 1996. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur. J. Cell Biol.* 70, 347–351.
- Kumar, G.N.M., Knowles, N.R., 1993. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol.* 102, 115–124.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., Pugin, A., 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell.* 14, 2627–2641.
- Lewit-Bentley, A., Rety, S., 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Op. Struct. Biol.* 10, 637–643.
- Medvedev, S.S., 2005. Kal'ciyevaya signal'naya sistema rasteniy [Calcium signalling system of plants]. *Fiziologiya Rasteniy* 52(1), 1–24 (in Russian).
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., Welch, R.M., 1991. *Micronutrients in agriculture*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Murphy, A.S., Eisinger, W.R., Shaff, J.E., Kochian, L.V., Taiz, L., 1999. Early copper-induced leakage of  $\text{K}^+$  from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol.* 121, 1375–1382.
- Pandey, S., Tiwari, S.B., Upadhyaya, K.C., Sopory, S.K., 2000. Calcium signaling: Linking environmental signals to cellular functions. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19, 291–318.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I., 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734.
- Rengel, Z., 2011. Soil pH, soil health and climate change. In: B.P. Singh, A.L. Cowie, K.Y. Chan (Eds.), *Soil health and climate change*. Springer-Verlag. 69–85.
- Rengel, Z., Zhang, W.-H., 2003. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol.* 159, 295–314.
- Roberts, D.M., Harmon, A.C., 1992. Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 697–725.
- Schwartz, V.V., Virych, P.A., Makoveychuk, T.I., Artemenko, A.U., 2014. Kal'ciy v rastitel'nykh kletkakh [Calcium in Plant Cells]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 22(1), 19–32 (in Russian).
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Copper facts. 2008. United States Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs.
- Vodenev, V., Pyatygin, S., Opritov, V.A., 2007. Reversible change of extracellular pH at the generation of mechano-induced electrical reaction in a stem of *Cucurbita pepo*. *Plant Signal Behav.* 4, 267–268.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Taylor, J.E., Hetherington, A.M., 1996. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 22, 45–96.
- Zhang, W.-H., Rehgel, Z., Kuo, J., 1998. Determination of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cells of intact wheat roots: Loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature. *Plant J.* 15(1), 147–151.
- Zynchenko, O.I., Saldatenko, V.N., Bilonozhko, M.A., 2001. *Roslynnyctvo*. [Plant Growing]. Agrarna Osvita, Kyiv (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 28.06.2015