

УДК 581.13

## **ЗМІНИ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЗЕРНА ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ ТА ДИМЕТЕНАМІДУ**

© 2007 р. **О. М. Вінниченко, Л. В. Шупранова, В. М. Глубока**

*Науково-дослідний інститут біології  
Дніпропетровського національного університету  
(Дніпропетровськ, Україна)*

Вивчено вплив іонів кадмію, ґрунтового гербіциду диметенаміду та їх комбінації на процес деградації спиртоторозчинних білків в ендоспермі проростаючого зерна кукурудзи різних генотипів. Показана специфіка змін у витрачанні зеїнів та активності протеолітичних ферментів з кислим оптимумом рН під впливом хімічного стресу. Встановлено, що загальною закономірністю у дії ксенобіотиків на досліджувані гібриди кукурудзи є збільшення активності протеаз на більш пізніх етапах проростання, що може бути пов'язано із активацією захисних механізмів рослинних клітин за дії токсикантів.

**Ключові слова:** *Zea mays L., ендосперм, проламіни, протеолітична активність, диметенамід, кадмій*

Актуальною проблемою сучасної екологічної фізіології і біохімії є розробка критеріїв діагностики стану рослинних організмів в умовах антропогенного навантаження [6-8]. Особливо складні, різноспрямовані процеси індукуються в рослинних клітинах комбінованим впливом факторів різної природи, до яких належать широко розповсюджені фони важких металів та гербіцидні препарати, які є інгібіторами різних обмінних процесів [2, 3, 9]. Стійкість рослин до дії різних екзогенних факторів визначається різноманітними механізмами [4], при цьому важливу роль у процесах біосинтезу та деградації клітинних структур відіграють протеолітичні ферменти. Вони здатні викликати модифікацію і інактивацію макромолекул, брати участь у таких процесах, як ріст і поділ клітин, дозрівання і проростання насіння рослин тощо [11].

Деградація запасних білків посідає особливе місце під час проростання насіння, адже саме в результаті цього процесу утворюються

азотні речовини, необхідні на ранніх стадіях формування проростка. В наших попередніх роботах з вивчення післядії гербіцидної обробки посівів кукурудзи на процес деградації проламінів у проростаючому зерні наступного покоління показано, що використання гербіцидів викликає зміни швидкості розпаду як сумарної фракції, так і окремих класів зеїну, ступінь якого визначався механізмом дії ксенобіотика [13]. Дослідження впливу свинцю і гербіциду харнес (діюча речовина – ацетохлор) на процес гідролізу проламінів у проростаючому зерні кукурудзи показало, що зміни у витрачанні запасних білків при проростанні зерна пов'язані з порушеннями в системі протеолітичних ферментів, які відповідають за деградацію зеїнів, що визначалося як змінами в загальній активності кислих протеаз, так і в співвідношенні певних ізопротеаз [1]. Враховуючи фрагментарність вивчення катаболічних процесів за комбінованого впливу ксенобіотиків, ми поставили за мету дослідити процес деградації проламінів та активність кислих протеаз на ранніх стадіях проростання зерна кукурудзи різних генотипів за сумісного впливу іонів кадмію і гербіциду хлорацетанлідної групи.

---

*Адреса для кореспонденції:* Шупранова Лариса Володимирівна, НДІ біології Дніпропетровського національного університету, вул. Наукова, 13, м. Дніпропетровськ, 49050, Україна;  
e-mail: larchyk@rambler.ru

МЕТОДИКА

Об'єктом досліджень були зернівки проростків двох гібридів кукурудзи (*Zea mays* L.) Дніпровський 310 МВ (середньостиглий) та Кадр 267 МВ (середньоранній).

Для постановки модельного експерименту відібране неушкоджене насіння кукурудзи пророщували протягом восьми діб на дослідних середовищах з гербіцидом фронт'єр (діюча речовина - диметенамід (ДМА)) в концентрації 5 мг/л, нітратом кадмію -  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л, а також за їх сумісної присутності у зазначених концентраціях. Відбір рослин проводили на третю, шосту, восьму добу вирощування. Відібране насіння вивільняли від оболонки та зародку. Для виділення зеїнів подрібненій ендосперм екстрагували 70% етанолом, що містив 2%-ний меркаптоетанол протягом 16 год за кімнатної температури. Після екстракції зразки центрифугували 15 хв за 3000 об/хв. Супернатанти аналізували на вміст білка за методом Bradford [14], використовуючи альбумін сироватки бика як стандарт.

Ферменти екстрагували із ендосперма проростаючого зерна кукурудзи протягом години при +4°C шестикратним об'ємом 0,2 М ацетатного буферу, рН 3,8. Активність кислих протеїназ визначали за швидкістю гідролізу 5% желатину, як описано у Segundo [15] і виражали в мікромолях тирозину, що виділився з ензим-субстратної суміші протягом одностодінної інкубації.

Біологічна повторність дослідів триразова, одержані експериментальні дані статистично

опрацьовані [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У гібрида Дніпровський 310 МВ в усіх дослідних варіантах протягом проростання зафіксовано витрачання запасних білків, що відповідає нормальному перебігу фізіологічних процесів (рис. 1). Однак, залежно від використаного в експерименті ксенобіотика, рівень витрачання проламінів був різним. Так, гербіцид ДМА у досліджуваній концентрації послаблював розщеплення запасних білків на всіх етапах проростання рослин, тоді як іони кадмію, починаючи з четвертої доби, впливали на даний показник протилежним чином. Якщо на третю добу розвитку показник вмісту проламінів був на рівні контролю, то до восьмої доби розпад зеїнів був знижений майже у два рази (рис. 1, а). При комбінуванні ксенобіотиків рівень розщеплення проламінів на перших двох етапах проростання був нижчим від контрольного зразка, а також дослідних з ДМА та кадмієм на 10%. На восьму добу проростання цей показник також був нижчим від контролю та варіанта з ДМА, однак дещо перевищував значення варіанта з іонами важкого металу.

Для гібрида кукурудзи Кадр 267 МВ характерним було більш значне витрачання запасного білка на I етапі проростання (з 0 до 3 дня) порівняно з гібридом Дніпровський 310 МВ. На II та III етапах спостерігалися подібні тенденції змін процесу витрачання проламінів у варіантах з гербіцидом та важким металом порівняно з контролем (рис. 1, б). За сумісного внесення в середовище іонів кадмію та ДМА простежува-

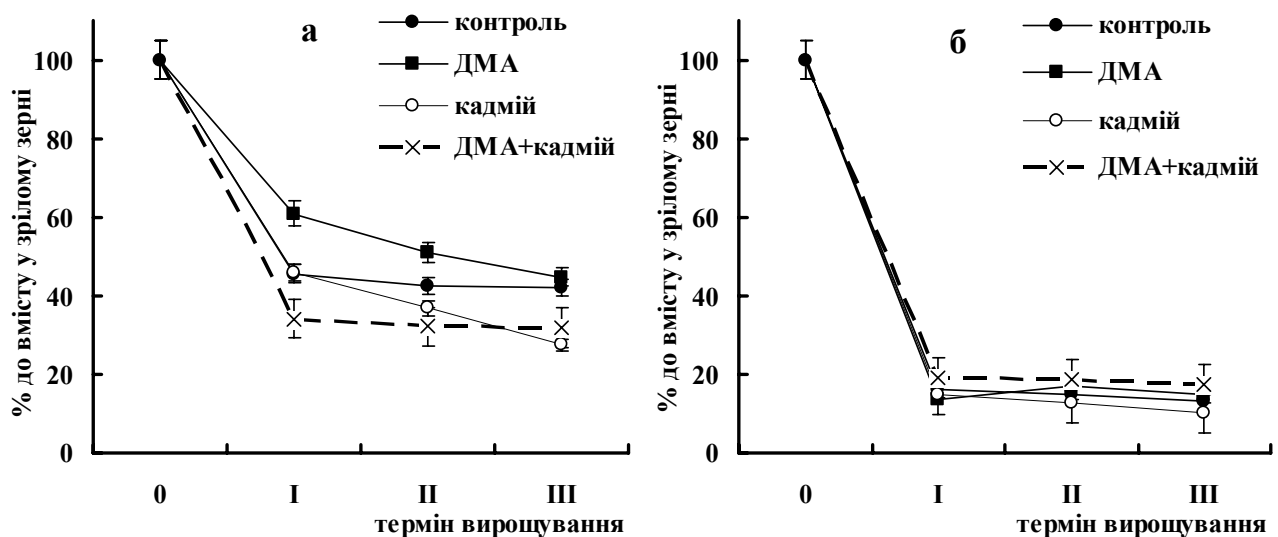
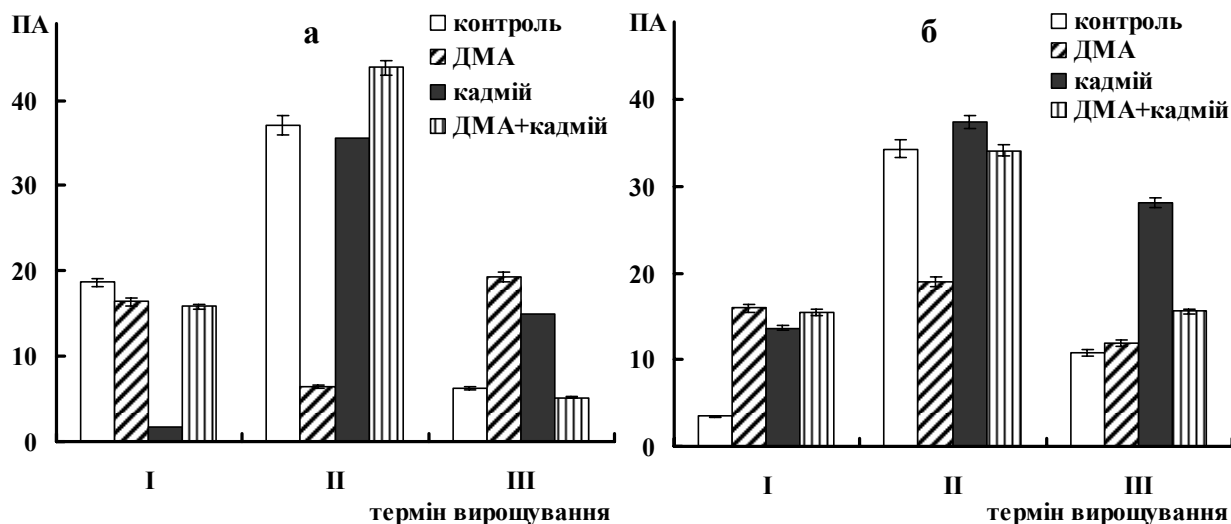


Рис. 1. Зміни вмісту проламінів у насінні гібридів кукурудзи протягом проростання за дії ксенобіотиків. Тут і на рис. 2.: а - Дніпровський 310 МВ, б - Кадр 267 МВ; I - 1-3 доба; II - 3-6 доба; III - 6-8 доба.

## ЗМІНИ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ



**Рис. 2.** Питома активність протеаз у зерні кукурудзи різних генотипів за дії ксенобіотиків. Позначення, як на рис. 1.

лася незначна тенденція до уповільнення витрати запасного білка (рис. 1, б). Факт відновлення синтезу запасних білків було встановлено в роботі А.М. Соболева і співавторів при проростанні насіння рицини [10]. У цілому, реакція системи запасних білків залежала від використаного в досліді типу ксенобіотика, а також генотипу рослини. Посилення процесів деградації зеїнів за дії стресорів можна розглядати як компенсаторну реакцію на їх ушкоджуючий вплив. Сенс таких реакцій може полягати у тому, що при розщепленні білків утворюються вільні амінокислоти, зокрема, пролін, які здатні виконувати захисні функції за дії важких металів та інших ксенобіотиків [7].

Аналіз протеолітичної активності проростаючого зерна гібрида кукурудзи Дніпровський 310 МВ показав, що контрольний варіант, зразки з обробкою нітратом кадмію і сумішшю  $Cd^{2+}$  + DMA мали пік ензиматичної активності на шосту добу (рис. 2, а). У той же час у варіанті з обробкою DMA максимум ферментативної активності припадав на восьму добу проростання. Дослідні зразки суттєво відрізнялися від контролю за інтенсивністю перебігу процесів гідролізу. Так, на третю добу найменша активність ензимів відзначалася для зразків насіння, що проростали на середовищі з іонами кадмію (1,78 мкмоль/мг білка). На шосту добу проростання у варіанті з обробкою DMA активність була знижена в шість, а з кадмієм в 1,2 раза. А за комбінованої дії суміші  $Cd^{2+}$  + DMA активність протеаз на шосту добу була підвищена на 21%. Різний рівень активності ензимів досліджених зразків спостерігався і на восьму добу проростання. Найнижчу активність

(6,22 та 5,14 мкмоль/мг) мали контрольний варіант і зразок, оброблений сумішшю ксенобіотиків. Зразки варіантів, що проростали на середовищі з нітратом кадмію і DMA, мали досить значний рівень активності протеаз порівняно з контролем.

Дослідження динаміки протеолізу в проростаючому зерні гібрида кукурудзи Кадр 267 МВ представлені на рис. 2, б. Отримані результати показують, що максимум активності протеїназ припадав на шосту добу проростання в усіх досліджених зразках. На третю добу проростання для всіх дослідних варіантів характерним було достовірне підвищення активності протеаз порівняно з контролем на 10-12%. Приблизно однаковий рівень активності зареєстровано на шосту добу проростання у контрольному зразку, варіантах з обробкою нітратом кадмію і сумішшю токсикантів. У дослідних зразках, пророщених на середовищі з DMA, виявлялася менша здатність до протеолізу запасних білків порівняно з іншими варіантами. Різний рівень активності кислих протеаз у вивчених зразках зафіксовано на восьму добу проростання. Так, у контролі виявлено найменшу активність ензимів, а дослідні зразки зерна (особливо варіант з кадмієм) показали вищий рівень ферментативної активності.

Таким чином, як свідчать результати досліджень, до восьмої доби пророщування насіння кукурудзи відзначалося посилення гідролітичних процесів за участю кислих протеаз за окремої дії іонів важкого металу та гербіциду. Ця тенденція не в усіх випадках фіксувалась за сумісного впливу ксенобіотиків. Залежно від генотипу кукурудзи процеси гідролізу запасних білків проходили з різною швидкістю та інтенсивністю.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. *Вінниченко О.М., Шупранова Л.В., Сокол Н.П., Пелипенко Л.К.* Вплив іонів свинцю і гербіцида харнес на процес деградації та фізико-хімічні властивості запасних білків зерна кукурудзи // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. Біологія, екологія. – 2000. – Т. 1., Вип. 8–С. 132-139.
2. *Глубока В.М.* Дослідження процесів деградації запасних білків у насінні кукурудзи при комплексній дії ксенобіотиків // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин.– Матер. Всеукр. науково-практичної конф. – Дніпропетровськ, 2005. – С. 13.
3. *Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н.С., Спирин Е.В.* Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. - Т. 42, №4. – С. 364-368.
4. *Деева В.П., Санько Н.В.* О последствиях гербицидов – производных галоидфеноксикислот на культурные растения // Физиология и биохимия культ. растений. – 1990. – Т. 22, №6. – С. 523-531.
5. *Дунаевский Я.Е.* Протеолиз запасных белков и его регуляция у некоторых высших растений. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – М., 1990. – 48 с.
6. *Жученко А.А.* Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). – Кишинев: Штиинца. 1988. – 767 с.
7. *Колупаев Ю.С.* Стресові реакції рослин (молекулярно-клітинний рівень). – Х., 2001. – 172 с.
8. *Коршиков И.И., Котов В.С., Михеенко И.П. та ін.* Взаємодія рослин з техногенно забрудненим середовищем. – К.: Наук. думка, 1997. – 170 с.
9. *Мордерер Є.Ю., Ходєєва Л.В., Мережинський Ю.Г.* Неспецифічні реакції рослин на дію гербіцидів інгібіторів проростання в зв'язку з їх антагоністичною взаємодією з гербіцидами інгібіторами фотосинтезу // Доп. АН України. – 1994. - №8. – С. 157-159.
10. *Соболев А.М., Азаркович М.И., Чайнова С.С.* Возможность возобновления синтеза запасных белков при прорастании семян // Физиология растений. – 1990. – Т. 37, вып. 5. – С.1015-1023.
11. *Тарчевский И.А.* Катаболизм и стресс у растений: 52-е Тимиряз. чт.. – М.: Наука, 1993. – 80 с.
12. *Урбах В.Ю.* Биометрические методы. – М.: Наука, 1974. – 415 с.
13. *Шупранова Л.В., Глінник А.В.* Дослідження наслідків гербіцидної обробки на процес деградації запасних білків проростаючого зерна кукурудзи // Питання біоіндикації та екології. (Збірн. наук. праць Запорізького держ. ун-ту). – 2003. – Вип. 8, №1. – С. 62-68.
14. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method or quantitation of microgram quantities of protein utilizing, the principle of protein dye binding // Anal. Biochem., – 1976. – V. 8. – P. 248-254.
15. *Segundo B.S., Casacuberta J.M., Puigdomenech P.* Sequential expression and differential hormonal regulation of proteolytic activities during germination in *Zea mays* L. // Planta. – 1990. – V. 181. – P. 467-474.

*Надійшла до редакції  
12.05.2007 р.*

**PROTEOLITIC ACTIVITY CHANGES OF CORN OF MAIZE SEEDLINGS  
FOR CONDITION OF INFLUENCE ON PLANTS CADMIUM IONS  
AND DIMETENAMIDE**

O. M. Vinnichenko, L. V. Shupranova, V. M. Gluboka

*Scientific-Research Institute of Biology, Dnipropetrovsk National University  
(Dnipropetrovsk, Ukraine)*

Influencing of cadmium ions is studied, soil herbicide of dimetenamide and their combinations on the process of alcohol-soluble proteins degradation in endosperm of different genotypes germinating seeds of maize. The specific of changes is shown in the expense of zeins and activity of proteolytic enzymes with the sour optimum pH under influencing of chemical stress. It is established that by general conformity to the law in xenobiotic effect on the studied hybrids of maize there is increasing activity of proteases on more late stages of germination, that can be related to activating of protective mechanisms of vegetable cells at influence of toxicants.

**Key words:** *Zea mays* L., endosperm, prolamines, proteolytic activity, dimetenamide, cadmium

## **ЗМІНИ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ**

# **ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЗЕРНА ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ НА РАСТЕНИЯ ИОНОВ КАДМИЯ И ДИМЕТЕНАМИДА**

А. Н. Винниченко, Л. В. Шупранова, В. Н. Глубокая

*Научно-исследовательский институт биологии  
Днепропетровского национального университета  
(Днепропетровского, Украина)*

Изучено влияние ионов кадмия, почвенного гербицида диметенамида и их комбинации на процесс деградации спирторастворимых белков в эндосперме прорастающего зерна кукурузы разных генотипов. Показана специфика изменений в расходе зеинов и активности протеолитических ферментов с кислым оптимумом pH под влиянием химического стресса. Установлено, что общей закономерностью в действии ксенобиотиков на изученные гибриды кукурузы является увеличение активности протеаз на более поздних этапах прорастания, что может быть связано с активацией защитных механизмов растительных клеток при воздействии токсикантов.

**Ключевые слова:** *Zea mays L.*, эндосперм, проламины, протеолитическая активность, диметенамид, кадмий