

## ВПЛИВ ХОЛОДОВОГО ШОКУ НА АКТИВНІСТЬ ЦИТОХРОМНОГО ТА АЛЬТЕРНАТИВНОГО ШЛЯХІВ ТРАНСПОРТУВАННЯ ЕЛЕКТРОНІВ У МІТОХОНДРІЯХ РОСЛИН (МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ)

*Досліджували in vivo та in vitro вплив низьких температур на інтенсивність поглинання кисню клітинами тканин, що перебувають на різних стадіях розвитку. Показано, що холодоровий шок зумовлював зростання активності альтернативного та цитохромного шляху транспортування електронів мітохондрій клітин, що завершили фазу росту. Обговорюються методичні підходи до дослідження альтернативної оксидази клітин рослин.*

Мітохондрії є органелами, які відіграють вирішальну роль у забезпеченні метаболізму клітин енергією. Здатність до трансформації енергії і стабільність мітохондрій має важливе значення для виживання в умовах дії стресів, у тому числі при низьких температурах, особливо на ранніх етапах росту та розвитку рослин [1-3]. Вищі величини інтенсивності дихання рослин північної зони зумовлені енергетичними затратами на підтримання структур клітин [2].

Відомо, що ціанідрезистентне дихання властиве рослинам, водоростям, грибам і бактеріям [4]. Труднощі в дослідженні функції ціанід- та антиміцинрезистентної оксидази зумовлені перш за все тим, що цей фермент важко виділити з органел більшості рослин [1]. Досліди, проведені з використанням мітопластів мітохондрій початків *Arum maculatum*, дозволили зробити припущення, що альтернативна оксидаза локалізована на внутрішній стороні внутрішньої мембрани органел [5]. Показано, що функції ізольованих мітохондрій відповідають стану in vivo дихання тканин [4].

У дослідженнях in vitro регуляції транспортування електронів у мітохондріях рослин використовуються як інгібітори цитохромного ланцюга (ціанід, азид), так і інгібітори альтернативного ланцюга транспортування електронів (гідроксамові кислоти, дисульфідрам, пропіл галат). Інгібітори цитохромного ланцюга (ціанід, азид) дозволяють визначити потенційну активність

альтернативного шляху, оскільки при блокуванні цитохромного шляху електрони можуть транспортуватись до кисню альтернативним шляхом. Для визначення активності альтернативної оксидази необхідно використовувати інгібітори альтернативного ланцюга транспортування електронів, серед яких частіше застосовуються саліцилгідроксамова та бензгідроксамова кислоти. У дослідах із ізольованими мітохондріями для блокування транспортування електронів по альтернативному напрямку використовують саліцилгідроксамову кислоту в концентрації 1 мМ. Такої самої концентрації інгібітора досить для повного блокування альтернативної оксидази в зрізах картоплі. Для клітин культури сої [4] необхідна вища концентрація гідроксамових кислот. Так, у листі пшениці та коренях багатьох видів рослин для повного інгібування альтернативного шляху використовують саліцилгідроксамову кислоту концентрацією від 10 до 25 мМ [4]. Низькі концентрації (1-5 мМ) саліцилгідроксамової кислоти зумовлюють активацію поглинання кисню тканинами деяких рослин [1, 4] за рахунок активації цитоплазматичних оксидаз.

Зміни в інтенсивності поглинання кисню тканинами рослин відображають зміни в активності метаболізму клітин, який тісно пов'язаний із фазою їх розвитку [4].

Установлено підходи до ідентифікації та аналізу активності специфічного для рослин компонента мітохондріального дихання, що ним є дру-

га термінальна оксидаза. У багатьох дослідженнях вона описується такою, що відповідає за «нечутливе до ціаніду дихання», «стійке до ціаніду дихання» або ж «альтернативне дихання». Цей тип дихання був найкраще визначений у суцвітті ароїдних [1, 4].

Альтернативний шлях дихання відгалужується від цитохромного на рівні убіхінону і спрямовує електрони до кисню з формуванням води [1, 4, 5]. Важливою особливістю цього шляху є те, що він не бере участі у формуванні трансмембранного потенціалу. Електрони, що рухаються по ньому, обходять два із трьох потенціальних місць спряження із транспортуванням протонів і, таким чином, не беруть участі у синтезі АТФ [1, 5].

Функцію альтернативного шляху дихання чітко з'ясовано лише для квіток ароїдних [4], де відбувається термогенез. У цих організмів тепло виробляється лише протягом одного дня цвітіння для покращення випаровування легких сполук, які приваблюють комах-запилювачів.

Багато дослідників вважають, що альтернативний шлях використовується для «скидання» (“overflow”) надлишку електронів у випадку насичення або ж блокування цитохромного шляху. Цей механізм скидання електронів розглядається як можливість для функціонування циклу трикарбонових кислот (ЦТК) за умов підвищеного рівня NADH та АТФ у клітинах [4, 6]. АОК індукується окислювальним стресом у рослин, а також інгібуванням цитохромного ланцюга в культурі клітин. Вказані результати свідчать про те, що функції АОК полягають у запобіганні надмірній відновлюваності дихального ланцюга й наступній генерації шкідливих реактивних форм кисню. У всіх досліджених на сьогодні рослин нечутливе до ціаніду дихання корелює з наявністю білків, які реагують із моноклональними антитілами, що отримані на АОК із клітин *Sauro-matum guttatum* [7].

#### Методика досліджень

Для дослідження газообміну тканин кукурудзи використовували полярограф ОН-105 (Угорщина) та закритий платиновий електрод типу Кларка. Вимірювання проводили в середовищі, яке містило  $\text{CaCl}_2$  (0,2 %) та трис-НСІ буфер (10 мМ). Температура комірки підтримувалася за допомогою ультратермостата із холодильним агрегатом, що забезпечував температуру від 0 до 30 °С. Рослини перед вимірами розрізали за допомогою леза на ділянки завширшки 2 мм та

довжиною 3–4 мм. Перед вимірюванням газообміну тканини витримували в розчині інкубації або ж у розчинах відповідних інгібіторів протягом 20 хвилин. Для блокування транспортування електронів по цитохромному ланцюгу використовували азид натрію (5 мМ), альтернативну оксидазу блокували розчином бензгідроксамової кислоти (10 мМ). Активність цитохромного шляху мітохондрій клітин кореня визначали за інтенсивністю поглинання кисню тканинами в присутності бензгідроксамової кислоти після відрахування залишкового дихання. Потенціальну активність альтернативного шляху розглядали як інтенсивність дихання в присутності азиду натрію після відрахування залишкового дихання. Внесок оксидаз немітохондріального походження в загальне поглинання кисню визначали як залишкове дихання після сумісного введення в тканини коренів кукурудзи азиду натрію та бензгідроксамової кислоти [3, 4]. Зайнятість альтернативного шляху розраховували за відношенням ступеня інгібування дихання бензгідроксамовою кислотою до ступеня стійкості дихання в присутності азиду натрію (4). Мітохондрії отримували методом диференціального центрифугування, як це описано раніше [8].

#### Формування альтернативного шляху транспортування електронів у мітохондріях коренів кукурудзи

Вивчали інтенсивність поглинання кисню коренями гібрида кукурудзи сорту Колективний 100 ТВ зони меристеми (ділянка 0–2 мм від початку кореня), зони розтягування (ділянка 2–4 мм) та зони дозрілих клітин (10–20 мм).

У процесі росту коренів кукурудзи інтенсивність дихання клітин, в перерахунку на суху речовину, знижується від 450,9 мкМ  $\text{O}_2$  (г сух. речов.)<sup>-1</sup> год<sup>-1</sup> у клітинах зони меристеми до 249,2 мкМ  $\text{O}_2$  (г сух. речов.)<sup>-1</sup> год<sup>-1</sup> у дозрілих клітинах коренів. Показник інтенсивності дихання клітин зони розтягнення займає проміжну позицію між клітинами меристеми та дозрілими клітинами коренів (табл. 1, контроль). Уведення в тканини меристеми інгібітора цитохромного шляху транспортування електронів (азиду натрію) знижувало на 56 % інтенсивність дихання клітин у період їх поділу. Разом із тим клітини меристеми слабо реагували на дію інгібітора альтернативного шляху транспортування електронів – бензгідроксамової кислоти. Тканини зони початку розтягування клітин коренів кукурудзи були більш стійкі до дії азиду натрію й

суттєво не відрізнялися чутливістю до дії бензгідроксамової кислоти порівняно з тканинами меристеми (табл. 1, контроль). Дозрілі клітини коренів кукурудзи (зона 10–20 мм від початку кореня) були майже вдвічі чутливішими до дії інгібітора альтернативного шляху транспортування електронів порівняно з клітинами меристеми. Так, ступінь інгібування інтенсивності поглинання кисню в присутності бензгідроксамової кислоти становив 16,4 % від контролю. Сумісне введення в тканини коренів гібридів кукурудзи азиду натрію та бензгідроксамової кислоти знижувало інтенсивність дихання до 90 %, що свідчить про основну роль мітохондріальних ферментів у поглинанні кисню.

Як показали результати проведених досліджень, у процесі росту клітин коренів спостерігається зниження інтенсивності поглинання кисню (табл. 1).

Отримані результати досліджень енергообміну злаків свідчать про те, що формування альтернативного шляху транспортування електронів у мітохондріях відбувається в клітинах меристеми. Органели цих клітин здатні транспортувати електрони по альтернативному шляху, але цей шлях у клітинах меристеми функціонує слабо. Зайнятість ціанідрезистентного шляху транспортування електронів дещо збільшується в зоні початку розтягнення клітин коренів кукурудзи. Найбільшу активність альтернативного шляху транспортування електронів проявляють дозрілі корені кукурудзи. Таким чином показано, що альтернативний шлях транспортування електронів у мітохондріях формується, як і цитохромний, на ранніх етапах росту клітин, але вища активність ціанідрезистентного дихання спостерігається в дозрілих клітинах злаків.

#### **Вплив холодного шоку на активність цитохромного та альтернативного шляхів транспортування електронів у клітинах меристеми й дозрілих клітин коренів кукурудзи**

Стійкість рослин до несприятливих умов середовища тісно пов'язана із здатністю їхніх клітин забезпечувати енергією й метаболітами процесу росту та підтримання структур клітин в екстремальних температурних умовах. Вивчення впливу холодного шоку на інтенсивність поглинання кисню клітинами злаків було розпочате з визначення чутливості дихального енергообміну клітин рослин, що перебувають на різних етапах росту, до пониження температури середови-

ща. Як об'єкт досліджень були використані корені гібридів кукурудзи сорту Колективний 100 ТВ. Полярографічний аналіз поглинання кисню коренями різних ділянок (меристеми, зони розтягнення, дозрілих клітин) коренів гібридів кукурудзи виявив різну реакцію на холодний стрес клітин коренів кукурудзи в процесі їх росту. Так, не виявлено суттєвих змін інтенсивності дихання клітин меристеми під впливом дії холоду (табл. 1), у той час як у клітин зони початку розтягнення (2–4 мм від кінчика кореня) спостерігається незначне підвищення інтенсивності поглинання кисню після дії холодного стресу. Найбільш виражена реакція на холодний шок у клітин коренів гібридів кукурудзи, що завершили ріст (ділянка 10–20 мм), де виявлено значне підвищення дихальної активності (табл. 1, 2).

Охолодження рослин практично не змінює чутливості усіх досліджуваних зон коренів до інгібітора цитохромного шляху транспортування електронів у мітохондріях – азиду натрію. Разом із тим у всіх досліджуваних зонах росту коренів холодний стрес змінює реакцію дихання на введення в середовище інкубації інгібітора альтернативного шляху транспортування електронів у мітохондріях – бензгідроксамової кислоти.

Спостерігається збільшення ступеня інгібування дихання бензгідроксамовою кислотою з 9,6 до 11,5 % у клітинах меристеми; із 11,5 до 17,0 % у зоні початку розтягування клітин; з 16,4 до 24,3 % у зоні дозрілих клітин коренів гібридів кукурудзи відповідно до та після холодного шоку. Отримані результати свідчать про активацію альтернативного шляху при низьких температурах у клітинах, що завершили ріст. Збільшення активності альтернативного шляху транспортування електронів при зниженні температури середовища може бути зумовлено новоутворенням білка [1], унаслідок активації експресії генів, як це було нещодавно показано для рису [9].

#### **Вплив низьких температур на регуляцію транспортування електронів у мітохондріях рослин**

Виявлено активацію *in vivo* альтернативної оксидази тканин рослин при низьких температурах середовища. Для з'ясування впливу низьких температур на функції мітохондрій рослин ми провели дослідження *in vitro* впливу холоду на параметри мітохондріальної активності. Як свідчать проведені дослідження, перенесення паростків рослин озимої пшениці із середовища

**Таблиця 1. Вплив холодового шоку на активність цитохромного і альтернативного шляхів транспортування електронів мітохондрій клітин коріння гібриду кукурудзи Колективний 210 ТВ при 25 °С у {мкМ O<sub>2</sub> (г сух. речов.)<sup>-1</sup> год<sup>-1</sup>}**

|   | Контроль, 25 °С |             |             | Холод, 10 °С, 24 год |            |             |
|---|-----------------|-------------|-------------|----------------------|------------|-------------|
|   | Ділянка коріння |             |             | Ділянка коріння      |            |             |
|   | 0–2 мм          | 2–4 мм      | 10–20 мм    | 0–2 мм               | 2–4 мм     | 10–20 мм    |
| Інтенсивність дихання                         | 450,9 ± 6,3     | 338,8 ± 8,9 | 249,2 ± 2,8 | 451,6 ± 9,1          | 363 ± 10,1 | 343,5 ± 4,9 |
| Активність цитохромного дихання               | 359 ± 4         | 265 ± 8     | 177 ± 3     | 359 ± 6              | 266 ± 8    | 231 ± 12    |
| Потенційна активність альтернативного дихання | 150 ± 2         | 144 ± 16    | 100 ± 6     | 157 ± 6              | 148 ± 5    | 138 ± 7     |
| Інтенсивність дихання                         | 48,4 ± 4,6      | 34,9 ± 0,5  | 31,0 ± 2,9  | 40,8 ± 2,7           | 35,0 ± 4,2 | 29,3 ± 2,3  |

**Таблиця 2. Вплив азиду натрію (NaN<sub>3</sub>) та бензгідроксамової кислоти (БГК) на інтенсивність поглинання кисню тканинами коренів гібриду кукурудзи Колективний 210 СВ (мкМ O<sub>2</sub> (г сух. речов.)<sup>-1</sup> год<sup>-1</sup>)**

|  | Контроль, 25 °С |             |             | Холод, 10 °С, 24 год |            |             |
|--|-----------------|-------------|-------------|----------------------|------------|-------------|
|  | Ділянка коріння |             |             | Ділянка коріння      |            |             |
|  | 0–2 мм          | 2–4 мм      | 10–20 мм    | 0–2 мм               | 2–4 мм     | 10–20 мм    |
| Інтенсивність дихання                          | 450,9 ± 6,3     | 338,8 ± 8,9 | 249,2 ± 2,8 | 451,6 ± 9,1          | 363 ± 10,1 | 343,5 ± 4,9 |
| Стійкість до дії NaN <sub>3</sub> , (5 мМ), %  | 44,1 ± 1,0      | 52,9 ± 1,0  | 52,7 ± 2,0  | 43,8 ± 1,2           | 50,5 ± 1,9 | 48,7 ± 2,0  |
| Ступінь інгібування дихання під впливом БГК, % | 9,6 ± 1,3       | 11,6 ± 1,3  | 16,4 ± 1,7  | 11,5 ± 2,4           | 17,0 ± 4,3 | 24,3 ± 3,0  |

з температурою 25 °С на середовище з низькою температурою (3 °С) викликає зміни параметрів мітохондріальної активності. Через 24 години дії холоду на рослини відзначено зростання інтенсивності поглинання кисню препаратами мітохондрій у третьому (на 12 %) та четвертому (на 34,7 %) метаболічному станах органел (рис. 1).

Зростання інтенсивності дихання ізольованих мітохондрій супроводжувалось зниженням дихального контролю та відношення АДФ : О. За вказаний проміжок часу відбулося зростання інтенсивності поглинання кисню в присутності азиду натрію (до 67,1 %). Відзначено також підвищення ступеня інгібування поглинання кисню мітохондріями під впливом БГК (до 38 %). Подальший вплив низьких температур на проростки пшениці протягом 48 годин не викликає суттєвих змін активності органел у третьому метаболічному стані, тоді як у четвертому метаболічному стані відбувається суттєве зниження інтенсивності поглинання кисню порівняно з рівнем, зафіксованим через 24 години дії холоду на рослини (рис. 1). Відзначено також підвищення чутливості дихання органел до дії азиду натрію,

одночас спостерігалось поступове зниження чутливості окислювальної активності мітохондрій до дії інгібітора альтернативної оксидази – БГК.

Упродовж довготривалого витримування рослин при низьких температурах в органелах відзначено зростання енергетичної ефективності дихання та поступове підвищення дихального контролю мітохондрій. При тривалішій дії холоду (від 3 до 6 діб) відбувається подальше зниження інтенсивності поглинання кисню органелами в третьому та четвертому метаболічних станах порівняно з рівнем, зафіксованим через 24 години дії низьких температур на рослини (рис. 1). Мітохондрії проявляли меншу чутливість до дії БГК і, навпаки, більшою мірою пригнічували інтенсивність дихання при введенні в суспензію ізольованих органел азиду натрію. Вказані зміни супроводжувалися підвищенням енергетичної ефективності дихання.

Дослідження з ізольованими мітохондріями виявили активацію альтернативної оксидази при охолодженні рослин протягом 24 год. При більш тривалій дії низьких температур спостерігається

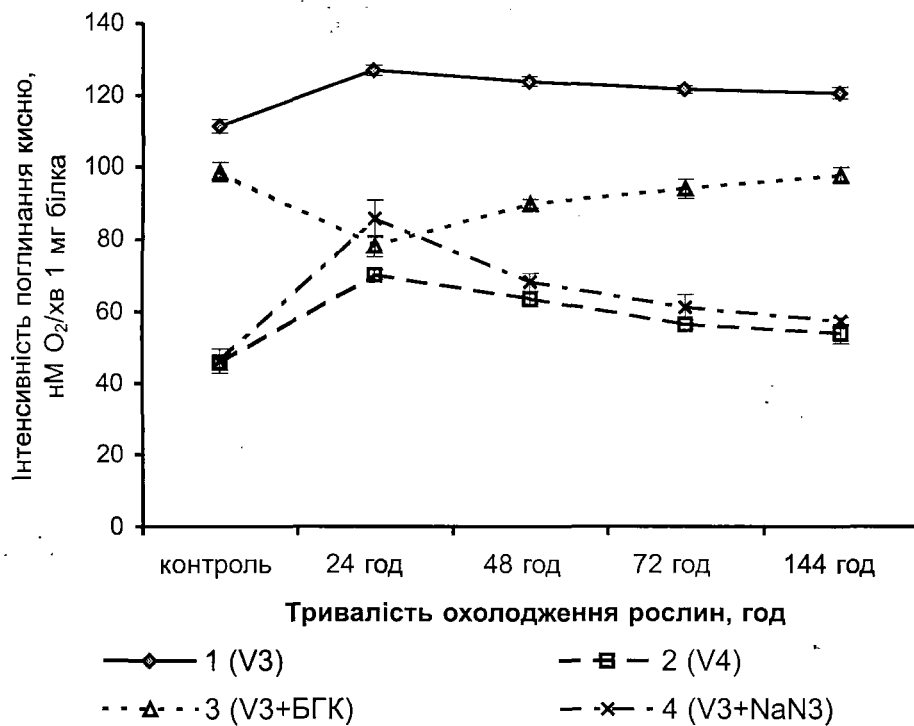


Рис. 1. Вплив охолодження рослин на інтенсивність окислення сукцинату мітохондріями паростків озимої пшениці сорту Миронівська 808 у третьому (1) й четвертому (2) метаболічних станах та в присутності БГК (3) й азиду натрію (4)

зниження активності альтернативного шляху транспортування електронів.

Таким чином, у процесі з'ясування реакції рослин на дію холоду доцільно поєднувати дослідження на тканинному та субклітинному рівнях організації рослин. Аналіз впливу низьких температур на дихальний енергообмін у злаків вказує на активацію альтернативної оксидази при дії холоду. Збільшення інтенсивності поглинання кисню через альтернативний шлях може бути зумовлене або індукцією синтезу альтернативної оксидази, або ж її активацією органічними кислотами [1, 5, 6] і/або внаслідок тіолольної модифікації ферменту [1].

Значення альтернативного дихання для рослин може полягати в тому, що:

1) посилена теплопродукція в процесі транспортування електронів по альтернативному шляху може безпосередньо захищати клітини впродовж певного часу;

2) потік електронів через альтернативний шлях знижує здатність до генерації високого рівня супероксидів та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [10, 11], рівень яких зростає при блокуванні транспортування електронів по цитохромному ланцюгу в тканини, що зазнали впливу холоду [12];

3) активація цього шляху сприяє функціонуванню циклу трикарбонних кислот за умов високого рівня відновлюваності компонентів цитохромного шляху [4–6].

1. Vanlerberghe G. C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.– 1997.– N 48.– P. 703–734.
2. Семухатова О. А. Энергетика дыхания в норме и при экологическом стрессе.– Л., 1990.– 72 с.
3. Kravets V. The alternative respiration of maize embryo tissues during germination of seeds at low temperatures // Responses of plant metabolism to air pollution and global change / Ed. By L. J. De Kok, I. Stulen.– Leiden: Backhuys Publishers, 1998.– P. 355–358.
4. Lambers H. Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organism // In Encyclopedia of Plant Physiology.– New series.– 1985.– V. 18.– Higher plant cell respiration (Douce R and Day DA., ed.)– P. 418–473.
5. Wagner A. M., Krab K. The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation // Physiol. Plant.– N 1.– 1995.– 95.– P. 318–325.
6. Millenaar F. F., Gonzalez-Meler M. A., Siedow J. N., Wagner A. M. and Lambers H. Role of sugars and organic acids

in regulating the concentration and activity of the alternative oxidase in *Poa annua* roots J. of Exp. Botany.- 2002, 53 - N371.-P. 1081-1088.

*Elthon T. E., Nickels R. L., McIntosh L.* Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria II Plant Physiology.-1989.-P. 1311-1317.

*Войников В. К., Кравец В. С.* Зависимость параметров окислительного фосфорилирования от концентрации митохондрий при инкубации // Физиология и биохимия культурных растений.-1980-Т. 12.-№6.-С. 644-648.

*ho Y., Saisho D., Nakazono M., Tsutsumi N-, Hirai A.* Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in

rice are increased by low temperature II J. Gene.- 1997.- N 1(203).-P. 121-129.

10. *Purvis A. C.* Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria II Physiol. Plant,- 1997.-N 1(100).-P. 165-170.

11. *Wagner A. M.* A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells II FEBS Lett- 1995.- N 2(368).- P. 339-342.

12. *Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R.* Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide II Plant Cell.- 1994.- N 1(6).- P. 65-74.

*V. Kravets, S. Kretynin*

#### THE EFFECT OF COLD SHOCK ON THE ACTIVITY OF THE ALTERNATIVE PATHWAY OF ELECTRON TRANSPORT OF PLANTS MITOCHONDRIA (THE METHOD APPROACH)

*The effect of low temperature on oxygen uptake by tissues from different stages of development of plant's tissues was studied in vivo and in vitro. It was shown that cold shock caused increasing of the alternative and cytochrome pathway of electron transport of mature plant cells' zone mitochondria. The method approach to the investigation of the alternative oxidase in the plant cells are discussed.*