

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ *POPULUS NIGRA* L. В УМОВАХ АЕРОТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ СЕРЕДОВИЩА

В. Більчук, Г. Россихіна-Галича

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49010, Україна
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru

Досліджено зміни активності основних оксидоредуктаз у вегетативних органах *Populus nigra* L. в умовах дії полікомпонентних забруднювачів у процесі онтогенезу. Встановлено, що за хронічної дії поллютантів відбувається активація супероксиддисмутази (СОД), каталази та пероксидази на різних етапах фенологічного циклу. При цьому активність СОД дослідних рослин перевищувала контроль в 1,5–1,7 разу; пероксидази – в 1,3–1,5 разу; каталази – 1,4–2,1 разу залежно від фази розвитку і тривалості дії стрес-фактора. Підвищення активності оксидоредуктаз підтверджує факт газостійкості *Populus nigra* L. в умовах аерогенного забруднення. Виявлено кореляційні зв'язки між активністю антиоксидантів вегетативних органів рослин у процесі онтогенетичного розвитку. Наведені рівняння регресії.

Ключові слова: *Populus nigra* L., вегетативні органи, аеротехногенне забруднення, антиоксидантні ферменти, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза.

Аеротехногенне забруднення середовища є однією з найскладніших і важко вирішуваних проблем. У результаті дії цього фактора відбувається зниження біорізноманіття рослинних організмів як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях за рахунок елімінації найменш стійких індивідуумів [9]. Аеротоксиканти, які надходять до асиміляційних органів, викликають зміни в інтенсивності біохімічних процесів, фотосинтезі, диханні, біосинтезі білків та інших речовин, функціонуванні системи антиоксидантного захисту. Участь антиоксидантних ферментів у процесах формування захисних реакцій деревних порід в умовах дії багатокомпонентної системи забруднень атмосфери вивчено недостатньо [6, 10].

Для об'єктивної оцінки адаптаційної здатності деревних порід у процесі онтогенезу можна використовувати активність антиоксидантних ферментів як діагностичні критерії. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження індивідуальної мінливості показників оксидоредуктаз, особливості ферментативних окисно-відновних реакцій, ступеня їх взаємозв'язку в листках стійких рослин на прикладі *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення.

Матеріали та методи

Об'єктами натурних досліджень були листки *Populus nigra* L. (тополі чорної), яка зростає вздовж автотраси Донецьк-Київ, що проходить через смт Петропавлівка Дніпропетровської області. Поблизу дослідної ділянки розміщена вугільна шахта «Степова». Як умовний контроль вибрана територія зони відпочинку поблизу хвойного лісу та р. Самари (на відстані 17 км. від забрудненої території), де росла *Populus nigra* L. Вибір насаджень проведено згідно з ступенем забруднення ґрунту й атмосферного повітря.

Оцінку онтогенетичного стану *Populus nigra* L. проводили у фази активного (травень), пасивного росту (липень) та початку фізіологічного спокою (серпень).

Наважку листків розтирали при 4°C у порцеляновій ступці з буферними розчинами у співвідношенні 1:10, при визначенні активності СОД застосовували 0,1 М фосфатний буфер (рН 7,8), а при визначенні активності каталази і пероксидази – 0,2 М ацетатний буфер (рН 5,4). Одержаний гомогенат центрифугували протягом 20 хв при 15000 g при 4°C. Супернатант переносили в чисті сухі пробірки і використовували як ферментний препарат при проведенні реакцій.

Стан антиоксидантної системи рослин оцінювали за активністю основних ферментів-детоксикантів активних форм кисню. Активність СОД визначали за рівнем гальмування процесу відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) у присутності НАДН і феназинметасульфату (ФМС) згідно з [13]. Реакційна суміш містила 1,2 мл 0,15 М Na-фосфатного буферу (рН 7,8), 0,1 мл 0,160 мМ ФМС, 0,3 мл 0,610 мМ НСТ, 0,3 мл супернатанту. Реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл 1 мМ НАДН і зупиняли 1 мл льодяної оцтової кислоти.

Каталазну активність оцінювали за титриметричним методом [14] і виражали в ммоль перекису водню, розкладеного за хвилину.

Активність пероксидази визначали за швидкістю реакції окиснення бензидину згідно з [12] й виражали в умовних одиницях.

Статистичну обробку даних і кореляційно-регресивний аналіз здійснено за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0, розбіжності між вибірками вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Одним із найважливіших ферментів антиоксидантної системи є СОД, яка каталізує дисмутацію супероксидних радикалів і забезпечує обрив ланцюга киснезалежних вільнорадикальних реакцій у клітинах [6, 15, 20]. Активність СОД є показником неспецифічної резистентності рослинного організму до стресових чинників.

Як свідчать результати даної роботи, в ході онтогенезу у вегетативних органах *Populus nigra* L. спостерігається широке варіювання значень активності супероксиддисмутази (рис. 1). Вегетативний період для *Populus nigra* L., який починається з кінця квітня і триває до початку вересня, супроводжується зростанням активності ферменту. Максимум активності зафіксовано в середині липня, що, очевидно, пов'язано з підвищеною інтенсивністю росту в міжфазний період. Деяке зниження показника ферментативної активності збігається з кінцем вегетаційного періоду. При цьому величина активності супероксиддисмутази становить $25,8 \pm 1,4$ ум.од./хв·г наважки і близька до значень рівня ензиму в період активного росту (травень-червень). Дія антропогенних викидів призводила до підвищення активності ферменту в усі фенотипічні фази. На початку росту пагонів і цвітіння цей показник перевищував контроль в 1,5 разу, а в період інтенсивного росту – в 2,1 разу.

У кінці серпня, в фазу переходу рослин до фізіологічного спокою, в умовах забруднення середовища спостерігали зниження активності СОД порівняно з іншими фенофазами, але її рівень перевищував контрольні зразки в 1,4 разу. Згідно з літературними даними, за дії хронічного техногенного навантаження активність СОД у нестійких рослин знижується [1, 4], тобто *Populus nigra* L. за цим показником належить до стійкого виду проти умов аеротехногенного забруднення, що узгоджується з даними Н.Г. Лук'янчук [11].

Відомо, що активація СОД за дії техногенного навантаження на рослини призводить до посилення накопичення пероксиду водню, який, у свою чергу, є сильним окиснювачем і негативно впливає на метаболічні процеси рослин [5, 15, 16, 19].

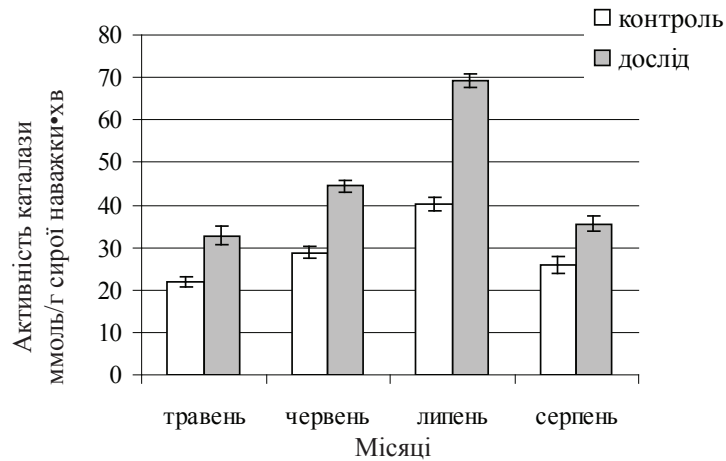


Рис. 1. Вплив аеротехногенного забруднення на активність супероксиддисмутаз у вегетативних органах *Populus nigra* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Важлива роль в обміні речовин, у процесах адаптації організму до стрес-факторів відводиться каталазі (КАТ), яка є одним із найбільш активних ферментів у рослинах [21] і каталізує процес розкладу пероксиду водню на воду та молекулярний кисень. Нами було встановлено, що вегетативні органи проявляють різну каталазну активність, як у процесах онтогенетичного розвитку, так і в залежності від забруднення середовища (рис. 2). Аналіз показав, що листки *Populus nigra* L. мали найбільший рівень активності у фазу вторинного росту (липень), що узгоджується з високим рівнем активності супероксиддисмутаз. Дія забруднювачів призводила до підвищення активності каталази у всі фази фенотипічного розвитку. У фазу активного росту (травень) за дії стрес-факторів активність каталази дослідних зразків становила 0,83 ммоль H_2O_2 /г сирової наважки*хв, що перевищувало контроль в 1,4 разу. В період вторинного росту вегетативних органів забруднювачі повітря викликали зростання активності ферменту в 1,6 разу порівняно з контролем. Найбільші відмінності за активністю ферменту контрольних і дослідних листків спостерігали в період інтенсивного росту *Populus nigra* L. За дії токсикантів рівень активності каталази підвищувався удвічі. Тривала дія забруднювачів на рослини *Populus nigra* L. викликала інтенсифікацію каталазної реакції. При цьому рівень активності ферменту дослідних зразків перевищував контроль в 1,6 разу.

Зафіксоване нами підвищення активності каталази за умов дії аерополітантів узгоджується з даними М. Г. Половникової та О. Л. Воскресенської [17]. Така зміна активності ферменту свідчать про стійкість рослинних організмів до техногенного забруднення.

У реакціях знешкодження пероксиду водню, який утворюється в результаті функціонування СОД, бере участь і пероксидаза. Як свідчать результати в ході вегетаційного періоду *Populus nigra* L., спостерігається широке варіювання значень активності ферменту. Динаміка пероксидазної активності при переході від фази активного росту до початку фізіологічного спокою у вегетативних органах *Populus nigra* L. контрольних і дослідних рослин, була спрямована в бік її підвищення (рис. 3). Дія багатоконпонентних токсичних викидів призводила до зростання активності ферменту у процесі онтогенезу від 20 до 50%. При цьому найбільший рівень активності ферменту був притаманний вегетативним органам

Populus nigra L. в умовах дії полутантів у період їх максимального росту. Одержані дані корелюють із підвищеним рівнем активності СОД і узгоджуються з результатами робіт інших авторів [2, 3, 7, 8, 18]. Тобто максимальна активність антиоксидантів збігається з періодом інтенсивного росту вегетативних органів.

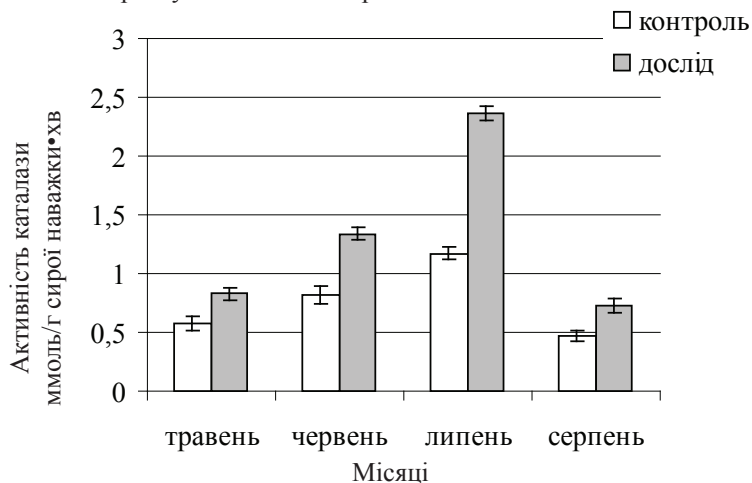


Рис. 2. Вплив аеротехногенного забруднення на активність каталази у вегетативних органах *Populus nigra* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Таким чином, підвищення активності трьох ферментів системи антиоксидантного захисту забезпечує виживання рослинних організмів за тривалої дії стрес-факторів.

Подальший аналіз отриманих даних спрямовано на встановлення закономірностей функціональних зв'язків між компонентами антиоксидантного захисту в листках *Populus nigra* L. контрольних і дослідних зразків у зв'язку з дією аерогенного забруднення. Методом кореляційно-регресивного аналізу встановлена достовірна кореляція активності СОД із підвищеним рівнем пероксидази та каталази, що свідчить про ефективність антиоксидантного захисту і збалансованість реакції антиоксидантів. При цьому коефіцієнти кореляції мають високі значення ($r=0,94\div 0,98$) (табл. 1).

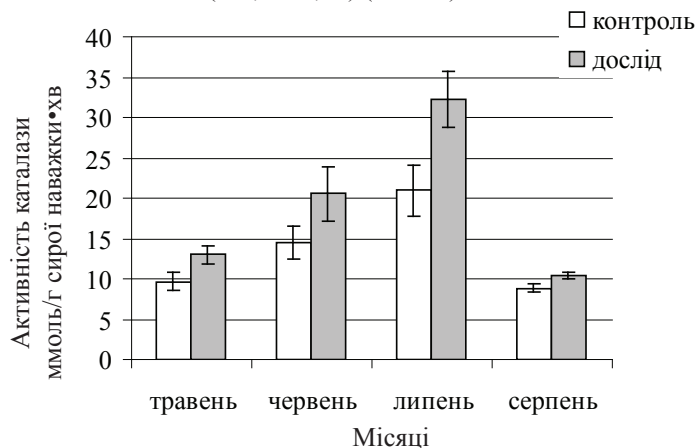


Рис. 3. Вплив аеротехногенного забруднення на активність пероксидази у вегетативних органах *Populus nigra* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Таблиця 1

Кореляційні залежності між активністю оксидоредуктаз у листках *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення

Показник	СОД	Каталаза	Пероксидаза
СОД	–	0,98	0,94
Каталаза	0,98	–	0,98
Пероксидаза	0,94	0,98	–

Між активністю СОД та інших оксидоредуктаз вегетативних органів встановлена лінійна залежність, яка описується рівняннями регресії (табл. 2). Високі значення коефіцієнтів детермінації (0,89–0,96) вказують на тісний зв'язок між рівнем супероксиддисмутази й активностями каталази і пероксидази, які каталізують розкладання продуктів перетворення супероксидного радикала. Наявність взаємозв'язку між активністю пероксидази та каталази в умовах аерогенного забруднення, можливо, пояснюється необхідністю їх сумісної участі в детоксикації активних форм кисню у процесі адаптації рослинних організмів. Одержані рівняння регресії статистично достовірні та дають змогу прогнозувати величини антиоксидантів у даних умовах.

Особливістю стійкого виду *Populus nigra* L. є практично незмінні взаємозв'язки між компонентами антиоксидантного захисту контрольних і дослідних рослин.

Таблиця 2

Регресійні залежності між активністю оксидоредуктаз у листках *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення

Взаємозв'язок між ферментами	Коефіцієнт детермінації	F	p<0,05	Рівняння регресії
СОД(y)–ПЕР(x) контроль	0,91	96,15	1,9E-06	$y=1,33x+11,2$
СОД(y)–ПЕР(x) дослід	0,95	184,99	8,9E-08	$y=1,66x+13,9$
СОД(y)–КАТ(x) контроль	0,86	60,32	1,5E-05	$y=23,38x+11,5$
СОД(y)–КАТ(x) дослід	0,98	561,12	4,1E-10	$y=22,12x+16,3$
ПЕР(y)–КАТ(x) контроль	0,99	827,72	5,9E-11	$y=17,90x-0,098$
ПЕР(y)–КАТ(x) дослід	0,99	887,75	4,2E-11	$y=13,03x+1,58$
КАТ(y)–ПЕР(x) контроль	0,99	827,73	5,9E-11	$y=0,055x+0,015$
КАТ(y)–ПЕР(x) дослід	0,99	887,75	4,24E-11	$y=0,076x-0,13$

Встановлено, що за дії полютантів, які індукують оксидативний стрес, відбувається активація ферментів антиоксидантного захисту СОД, каталази, пероксидази у вегетативних органах *Populus nigra* L. в процесі онтогенезу, що забезпечує його стійкість до аеротехногенного забруднення.

Процес адаптації рослин *Populus nigra* L. до стрес-чинників відбувається за рахунок підвищення активності СОД в 1,5–1,7 разу, пероксидази – в 1,3–1,5 разу та каталази – в 1,4–2,1 разу залежно від фази розвитку й терміну дії токсикантів.

Встановлено наявність тісних кореляційних зв'язків між активністю СОД і каталази, СОД і пероксидази у листках *Populus nigra* L. у процесі онтогенетичного розвитку за стресових умов.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бессонова В. П. Цитофизиологические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. Запорожье: Запор. гос. ун-т, 1999. 208 с.
2. Виноградова Е. Н. Кинетические свойства и компонентный состав пероксидазы листьев *Populus deltoids* Marsh и *Fraxinus lanceolata* Borkh в условиях техногенного загрязнения // Промышленная ботаника. 2007. Вып. 7. С. 63–68.
3. Виноградова Е. Н. Peroксидазная активність в клітках листків деревесних рослин в зв'язі з їх стійкістю до викидів коксохімічного підприємства // Промышленная ботаника. 2006. Вып. 6. С. 35–40.
4. Гуральчук Ж. З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії. К.: Логос, 2006. 208 с.
5. Квеситадзе Г. И., Хатисашвили Г. А., Садунишвили Т. А., Евстегнеева З. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М.: Наука, 2005. 199 с.
6. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Бараненко В. В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. К.: Наукова думка, 2005. 278 с.
7. Коршиков И. И. Адаптация растений к условиям техногенно загрязненной среды. К.: Наукова думка, 1996. 237 с.
8. Коршиков И. И., Котов В. С., Михеенко И. П. и др. Взаимодействие растений с техногенно-загрязненной средой: монография. К.: Наукова думка, 1995. 190 с.
9. Коршиков И. И., Терлыга Н. С., Бычков С. А. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции. Донецк: Лебедь, 2002. 328 с.
10. Косаківська І. В. Екологічний напрям у фізіології рослин: досягнення й перспективи // Физиология и биохимия культурных растений. 2007. Т. 39. № 4. С. 279–290.
11. Лук'янчук Н. Г., Чмир Р. М. Вплив автомобільного транспорту на паркові фітоценози м. Львова // Наук. вісн. нац. лісотехн. ун-ту України. 2007. Вип. 17.7. С. 71–76.
12. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова, 3-е изд. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
13. Персегина И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. 1989. № 11. С. 20–23.
14. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
15. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Укр. биохим. журнал. 1989. Т. 61. № 2. С. 14–27.
16. Полесская О. Г. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от форм и дозы азота в среде // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 5. С. 686–691.
17. Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 5. С. 777–785.
18. Стороженко В. О. Ключові антиоксидантні ферменти фотосинтетичного апарату вищих рослин за стресових чинників // Физиология и биохимия культ. растений. 2004. Т. 36. № 1. С. 36–47.
19. Таран Н. Ю., Оканенко О. А., Боцманова Л. М. та ін. Вторинний оксидний стрес як елемент адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. 2004. Т. 36. № 1. С. 3–14.
20. Трач В. В., Стороженко А. В. Супероксиддисмутаза как компонент антиоксидантной системы при абиотических стрессовых воздействиях // Физиология и биохимия культ. растений. 2007. Т. 39. № 4. С. 291–302.
21. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 244 с.

Стаття: надійшла до редакції 01.06.13

доопрацьована 20.01.14

прийнята до друку 21.01.14

CHANGES IN THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN VEGETATIVE ORGANS *POPULUS NIGRA* L. IN THE MATTER OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION

V. Bilchuck, A. Rossikhina-Galycha

Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru

The changes in the activity of the main oxidoreductases in vegetative organs of *Populus nigra* L. under the action of multicomponent pollutants during ontogenesis are revealed. It is established, that at chronic action of pollutants an activation of superoxide dismutase (SOD), catalase and peroxidase in different stages of phenological cycle is occurred. Thus SOD activity of the investigated plants exceeds the control in 1.5–1.7; peroxidase – in 1.3–1.5, catalase – to 1.4–2.1 times depending on the development phase and duration of stress factor. Increased activity of oxidoreductases confirms the gas resistance of *Populus nigra* L. in conditions of aerogenic contamination. The presence of correlation between the antioxidant activity of the vegetative organs of plants in the process of ontogenetic development is revealed. The equations of regression are adduced.

Keywords: *Populus nigra* L., vegetative organs, environmental contamination, anti-oxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, peroxidase.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНАХ *POPULUS NIGRA* L. В УСЛОВИЯХ АЭРОТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ

В. Бильчук, А. Россихина-Галыча

Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru

Исследованы изменения активности основных оксидоредуктаз в вегетативных органах *Populus nigra* L. в условиях действия поликомпонентных загрязнителей в процессе онтогенеза. Установлено, что при хроническом действии поллютантов происходит активация супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы на разных этапах фенологического цикла. При этом активность СОД опытных растений превышает контроль в 1,5–1,7 раза; пероксидаза – в 1,3–1,5 раза; каталаза – в 1,4–2,1 раза в зависимости от фазы развития и продолжительности действия стресс-фактора. Повышение активности оксидоредуктаз подтверждает факт газоустойчивости *Populus nigra* L. в условиях аэрогенного загрязнения. Выявлено наличие корреляционных связей между активностью антиоксидантов вегетативных органов растений в процессе онтогенетического развития. Приведены уравнения регрессии.

Ключевые слова: *Populus nigra* L., вегетативные органы, аэротехногенное загрязнение, антиоксидантные ферменты, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза.