

ВПЛИВ ГЕРБІЦИДІВ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ГІБРИДУ КУКУРУДЗИ БІЛОЗІРСЬКИЙ 295СВ

В. Більчук, Г. Россихіна-Галича, Т. Легостаєва, Ю. Шмагайло

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

Досліджено вплив ґрунтових гербіцидних препаратів (Харнес, Мерлін) на активність супероксиддисмутази (СОД), каталази, пероксидази та накопичення продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у листках проростків кукурудзи гібриду Білозірський 295СВ на ранніх стадіях онтогенезу. Встановлено, що адаптивна здатність гібриду до гербіцидного стресу реалізується завдяки підвищенню активності оксидоредуктаз. Встановлено наявність взаємозв'язку між активностями ферментів і рівнем накопичення ТБК-активних продуктів.

Ключові слова: кукурудза, СОД, каталаза, пероксидаза, малоновий діальдегід, гербіцидний стрес.

У розвитку загального адаптаційного синдрому організмів до абіотичних і біотичних стресорів середовища, в тому числі і гербіцидів, однією з перших неспецифічних реакцій є посилення процесів перекисного окислення ліпідів, яке призводить до перебудови метаболізму рослин як на рівні клітин, так і всього організму [3, 6]. Тому зміщення про-/антиоксидантної рівноваги в напрямі активації ПОЛ є інформативнішим показником для оцінки ступеня впливу різних факторів на організм. Підтримка стаціонарного фізіологічно нормального рівня вільнорадикальних процесів у клітині забезпечується завдяки функціонуванню антиоксидантної системи, до якої належать ферментативні та низькомолекулярні компоненти [7, 8, 10, 11, 14]. Провідну роль в елімінації кисневих радикалів і перериванні вільнорадикальних реакцій відіграє СОД [9, 18, 20]. Основні функції регуляторної діяльності клітини виконують пероксидаза та каталаза, які забезпечують нормальних хід окиснювальних процесів за дії несприятливих умов. Наявність в організмі кількох ферментів, які виконують одну і ту ж каталітичну функцію, – є цінною властивістю, яка розширює адаптаційні можливості організму, що особливо важливо для життєздатності рослин за стресових умов [4, 10, 11, 16, 17]. Стан антиоксидантної системи за дії гербіцидів у тканинах рослин на різних стадіях онтогенезу висвітлено недостатньо [1, 4, 5, 12, 18]. Залишаються недослідженими спрямованість і співрозмірність змін фізіолого-біохімічних показників, що характеризують життєздатний функціональний стан рослин.

Тому метою роботи є одержання кількісної оцінки змін активності основних антиоксидантних ферментів і нагромадження ТБК-активних продуктів у листках проростків в умовах дії гербіцидного забруднення і визначення кореляційних залежностей між цими показниками.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були проростки кукурудзи середньостиглого гібриду Білозірський 295СВ на ранніх стадіях онтогенезу. Насіння гібридної кукурудзи вирощували протягом 2 діб у рулонах фільтрувального паперу на дистильованій воді.

На 3-тю добу проростки переносили на розчини ґрунтових гербіцидних препаратів у концентраціях, максимально наближених до виробничих Харнес (2,9 ммоль/л) і Мерлін (1,2 ммоль/л). У фотосинтезуючих частинах проростків – листках – визначали активність СОД за рівнем гальмування процесу відновлення нітросинього тетразолію [21], каталази за кількістю розкладеного перекису водню [15], пероксидази за швидкістю реакції окиснення бензидину згідно з А.Н. Бояркіним [13] та вміст ТБК-активних продуктів (ТБКАП) за М.М. Мусієнком зі співавт. [19]. 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

Результати аналізу фізіолого-біохімічних показників гібриду Білозірський 295СВ в умовах дії досліджуваних ґрунтових гербіцидів показали наявність зміщення про-/антиоксидантної рівноваги в напрямку активації ПОЛ. Про це свідчать результати накопичення ТБК-активних продуктів у листках проростків. Так, вміст ТБКАП у листках проростків підвищувався в 1,1–1,2 разу залежно від тривалості дії ксенобіотиків і типу гербіцидів. Істотна інтенсифікація процесу ПОЛ відбувалася за дії препарату Харнес. Максимальну кількість ТБКАП зареєстровано на 3-тю добу дії гербіцидів. З подовженням тривалості експозиції до 5 діб відзначали зниження даного показника (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни вмісту ТБК-активних продуктів у листках гібриду Білозірський 295СВ за дії препаратів Харнес і Мерлін, ммоль/г сирової речовини

Варіант	Тривалість дії гербіцидів		
	1 доба	3 доба	5 доба
Контроль	248,4±11,8	283,9±16,4	270,2±11,5
Харнес (2,9 ммоль/л)	322,9±13,2	369,1±13,3	324,2±11,3
Мерлін (1,2 ммоль/л)	298,1±14,1	369,1±14,2	351,2±11,3

Підтримка гомеостазу клітин гібриду Білозірський 295СВ забезпечується завдяки підвищенню активності одного з основних антиоксидантних ферментів – СОД в 1,1–1,5 разу. Найбільше значення активності ензиму, яке зафіксоване на 3-тю добу впливу препаратів, збігається з терміном підвищення вмісту ТБК-активних продуктів (табл. 2).

Таблиця 2

Зміни активності супероксиддисмутази в листках гібриду Білозірський 295СВ за дії препаратів Харнес і Мерлін, ум.од./г сирової речовини•хв.

Варіант	Тривалість дії гербіцидів		
	1 доба	3 доба	5 доба
Контроль	20,3±0,3	21,0±0,1	20,8±0,1
Харнес (2,9 ммоль/л)	23,3±0,1	27,3±0,1	24,9±0,1
Мерлін (1,2 ммоль/л)	26,4±0,05	32,2±0,06	29,2±0,06

Незважаючи на підвищений рівень активності СОД, антиоксидантний захист у листках проростків не був би достатньо ефективним без участі інших антиоксидантів – пероксидази та каталази, які включаються у процес детоксикації продуктів пероксидації (табл. 3, 4).

Аналіз результатів визначення активності пероксидази в листках проростків за дії гербіцидних препаратів свідчить про достовірне збільшення рівня цього показника в 1,3–1,8 разу, порівняно з контролем. Крива залежності пероксидазної активності від тривалості дії гербіцидів проходить через максимум на 5-ту добу гербіцидного стресу (табл. 3). Слід зазначити, що для проростків гібриду підвищення активності ензиму за дії препарату Мерлін було істотним, порівняно з дією гербіциду Харнес.

Таблиця 3

Зміни активності пероксидази в листках гібриду Білозірський 295СВ за дії препаратів Харнес і Мерлін, ум.од./г сирової речовини•хв

Варіант	Тривалість дії гербіцидів		
	1 доба	3 доба	5 доба
Контроль	26,35±0,16	35,88±0,25	43,6±0,11
Харнес (2,9 ммоль/л)	39,53±0,33	46,64±0,31	47,96±0,14
Мерлін (1,2•ммоль/л)	36,89±0,33	53,82±0,31	65,4±0,24

У ході адаптації до негативної дії продуктів ПОЛ в умовах гербіцидного забруднення бере участь і каталаза, яка пришвидшує процес розкладання пероксиду водню на молекулярний кисень і воду [3, 16, 17]. Каталазна активність у всіх варіантах дослідів була вищою, ніж у контролі, в 1,3–1,4 разу (табл. 4). Підвищення активності каталази свідчить про стійкість рослинного організму до стресу [16, 17]. Активність антиоксидантів залишалась на підвищеному рівні протягом експерименту.

Таблиця 4

Зміни активності каталази в листках гібриду Білозірський 295СВ за дії препаратів Харнес і Мерлін, ммоль Н₂О₂/г сирової речовини•хв.

Варіант	Тривалість дії гербіцидів		
	1 доба	3 доба	5 доба
Контроль	8,3±0,04	8,7±0,02	9,3±0,07
Харнес (2,9 ммоль/л)	10,7±0,03	10,9±0,02	11,6±0,02
Мерлін (1,2•ммоль/л)	10,7±0,04	12,2±0,02	13,0±0,05

Подальший аналіз взаємозв'язку фізіолого-біохімічних показників у листках проростків кукурудзи за дії гербіцидів виявив деякі особливості. За рівнем коефіцієнта кореляції між вмістом ТБКАП й активністю оксидоредуктаз можна стверджувати факт участі всіх компонентів захисту в процесі знешкодження активних форм кисню. Особливістю для гібриду Білозірський є наявність позитивного прямого зв'язку між вмістом ТБК-продуктів і активністю СОД, каталази та пероксидази (табл. 5) за дії препарату Харнес. Взаємозв'язок між рівнем ТБК і пероксидазною активністю ($r=0,74$) є близький до функціонального. За дії препарату Мерлін за показником коефіцієнта кореляції усі взаємозв'язки є функціональними і значимими (табл. 6).

Таблиця 5

Кореляційні залежності між активністю оксидоредуктаз і вмістом ТБК-активних продуктів у листках кукурудзи гібриду Білозірський 295СВ за дії препарату Харнес

Показник	ТБК	СОД	Каталаза	Пероксидаза
ТБК	–	0,97	0,85	0,74
СОД	0,97	–	0,86	0,73
Каталаза	0,85	0,86	–	0,83
Пероксидаза	0,74	0,73	0,83	–

Деякі розбіжності у значеннях коефіцієнта кореляції між накопиченням ТБК й активністю каталази і ТБК–пероксидази за дії різних препаратів вказують на особливості участі компонентів антиоксидантного захисту в детоксикації продуктів ПОЛ. Зниження значення $r=0,74$ для залежності вміст ТБК – активність пероксидази, ймовірно, свідчить про участь ферменту в інших процесах метаболізму одночасно з реакцією окиснення органічних сполук (фенолів, амінів та ін.) у присутності пероксиду водню [2].

Регресивні залежності між вмістом ТБК-активних продуктів і активністю антиоксидантів вказали на мінливість рівня взаємозв'язку між цими показниками за коефіцієнтом детермінації (R^2). Найвищий рівень сполученості виявлено для показників накопичення ТБК-продуктів і активністю СОД упродовж дії досліджуваних гербіцидів.

Позитивний корелятивний зв'язок високого ступеня ($R^2=0,88$) відзначено між рівнем утворення ТБК-активних продуктів і активністю каталази в умовах дії гербіциду Мерлін. Слід зазначити, що відповідні коефіцієнти детермінації в умовах дії Харнесу були дещо нижчими, ніж для препарату Мерлін, що підтверджує токсичність останнього (табл. 7). Поряд із цим, необхідно відзначити низький рівень коефіцієнта детермінації для взаємозв'язку нагромадження ТБК-продуктів і активністю пероксидази (0,54 за дії Харнеса та 0,74 за дії Мерліну), що свідчить про наявність у ферменту додаткових функцій, не пов'язаних із детоксикацією пероксиду водню. Підтвердженням цього є низький рівень зв'язку між активністю СОД і пероксидази за умов гербіцидного стресу. Проте спостерігається тісний взаємозв'язок між активністю СОД і каталази за стресових умов, що свідчить про включення каталази в детоксикаційний процес рослинного метаболізму за дії ксенобіотиків.

Таблиця 6

Кореляційні залежності між активністю оксидоредуктаз і вмістом ТБК-активних продуктів у листках кукурудзи гібриду Білозірський 295СВ за дії препарату Мерлін

Показник	ТБК	СОД	Каталаза	Пероксидаза
ТБК	–	0,98	0,94	0,86
СОД	0,98	–	0,92	0,75
Каталаза	0,94	0,92	–	0,91
Пероксидаза	0,86	0,75	0,91	–

Наведені результати досліджень активності СОД і накопичення ТБК-активних продуктів у листках проростків дали можливість встановити, що на початковому етапі стресового впливу гербіцидних препаратів наявний слабкий ($r=0,65$) рівень сполученості між цими показниками.

Таблиця 7

Значення коефіцієнта детермінації між активністю оксидоредуктаз і вмістом ТБК-активних продуктів у листках кукурудзи гібриду Білозірський 295СВ за дії препаратів Харнес і Мерлін

Взаємозв'язок між показниками	Коефіцієнт детермінації	F	$p \leq 0,05$	
ТБК(x)–СОД(y)	0,94	Харнес	60,08	0,001
		Мерлін		
ТБК(x)–СОД(y)	0,96	Харнес	85,44	0,001
		Мерлін		
ТБК(x)–КАТ(y)	0,72	Харнес	10,35	0,032
		Мерлін		
ТБК(x)–КАТ(y)	0,88	Харнес	29,06	0,005
		Мерлін		
ТБК(x)–ПЕР(y)	0,54	Харнес	4,79	0,094
		Мерлін		
ТБК(x)–ПЕР(y)	0,74	Харнес	11,50	0,027
		Мерлін		
СОД(x)–ПЕР(y)	0,53	Харнес	4,59	0,098
		Мерлін		
СОД(x)–ПЕР(y)	0,57	Харнес	5,21	0,085
		Мерлін		
СОД(x)–КАТ(y)	0,74	Харнес	11,24	0,028
		Мерлін		
СОД(x)–КАТ(y)	0,84	Харнес	20,74	0,010
		Мерлін		
ПЕР(y)–КАТ(x)	0,69	Харнес	8,85	0,041
		Мерлін		
ПЕР(y)–КАТ(x)	0,82	18,22	0,013	

Однак із продовженням тривалості експозиції (упродовж 3–5 діб) кореляційний зв'язок посилюється ($r=0,90-0,97$). Аналогічна тенденція спостерігається і для залежності між активністю каталази та вмістом ТБК-активних продуктів, а також між активністю СОД і каталази, що свідчить про посилення корелятивного зв'язку зі збільшенням тривалості інтоксикації. На відміну від цього, результати кореляційного аналізу між активністю пероксидази та накопиченням ТБКАП дали можливість виявити зниження рівня сполученості цих показників зі збільшенням тривалості впливу гербіцидів (табл. 8).

Отже, можна стверджувати, що токсична дія гербіцидів на проростки кукурудзи гібриду Білозірський 295СВ проявляється в істотному порушенні прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що підтверджується відповідним посиленням накопиченням ТБК-продуктів, яке корелює з підвищенням активності оксидоредуктаз. Варіювання рівня спорідненості між цими показниками вказують на зміни у функціонуванні компонентів антиоксидантного захисту.

Таблиця 8

Значення коефіцієнтів детермінації та кореляції між активністю оксидоредуктаз і вмістом ТБК-активних продуктів у листках кукурудзи гібриду Білозірський 295СВ за різної тривалості дії гербіцидів

Тривалість дії гербіцидів, доба	Коефіцієнт детермінації	Коефіцієнт кореляції	$p \leq 0,05$
		ТБК(x)–СОД(y)	
1	0,42	0,65	0,55
3	0,81	0,90	0,29
5	0,96	0,97	0,13
		ТБК(x)–ПЕР(y)	
1	0,98	0,99	0,09
3	0,84	0,92	0,26
5	0,75	0,87	0,33
		ТБК(x)–КАТ(y)	
1	0,89	0,95	0,21
3	0,87	0,93	0,24
5	0,99	0,99	0,03
		СОД(x)–ПЕР(y)	
1	0,56	0,75	0,46
3	0,99	0,99	0,02
5	0,90	0,95	0,20
		СОД(x)–КАТ(y)	
1	0,74	0,86	0,33
3	0,99	0,99	0,04
5	0,98	0,99	0,09
		КАТ(x)–ПЕР(y)	
1	0,96	0,98	0,12
3	0,99	0,99	0,02
5	0,79	0,89	0,30

Отже, проростки гібриду Білозірський 295СВ є стійкими до гербіцидного забруднення завдяки включенню в стресових умовах трьох компонентів антиоксидантного захисту і наявності прямого корелятивного зв'язку високого ступеня між активністю оксидоредуктаз і рівнем продуктів ПОЛ. Істотне посилення зазначеного зв'язку (ТБК–СОД) після 1-добової експозиції пояснюється, на нашу думку, синтезом нових ізоформ ензиму.

Одночасне дослідження багатьох показників антиоксидантного захисту і продукції ПОЛ дають можливість виявити індивідуальний вклад кожного компонента в загальний антиоксидантний потенціал рослинних організмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Адаптогенез растений к пестицидам / Н.А. Рябченко, Н.П. Коцюбинская, Е.В. Домашнева и др. Днепропетровск: Пороги, 2000. 193 с.
2. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
3. Барбой В. А., Сутковой Д. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. К.: Чернобыльинтеринформ, 1997. 420 с.
4. Винниченко О. М. Захисні механізми рослин за дії гербіцидів // Наукові записки Тернопіль. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер. біол. 2002. № 3 (18). С. 90–92.
5. Винниченко О. М., Більчук Г. С., Россихіна Г. С. Вплив гербіцидної обробки на інтенсивність перекисного окислення ліпідів в зерні кукурудзи // Бюлетень Ін-ту зернового господарства. 2003. № 20. С. 30–31.
6. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовск. общ. образов. журнал. 2000. Т. 6. № 12. С. 13–19.
7. Возможное регуляторное влияние ПОЛ на активность H^+ -АТФ-азы плазмалеммы в условиях стресса / А.П. Веселов, Л.Н. Курганова, А.В. Лихачева и др. // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 3. С. 385–389.
8. Гришко В. Н., Сыщиков Д. В. Пероксидное окисление липидов и функционирование некоторых антиоксидантных ферментных систем у кукурузы и овса при острым поражении фтористым водородом // Укр. біохім. журнал. 1999. Т. 71. № 3. С. 51–57.
9. Губаренко Ю. Ю., Більчук В. С. Стан антиоксидантної системи в меристемах кукурудзи за дії сполук кадмію та гіпертермії // Strategiczne pytania swiatowej nauki: materialy VI miedzynarodowej naukowo-praktycznej konf. (Przemysl, 2010). С. 65–67.
10. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / Е.Л. Кордюм, К.М. Сытник, В.В. Бараненко и др. К.: Наук. думка, 2005. 278 с.
11. Косаківська І. В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. К.: Сталь, 2003. 192 с.
12. Костышин С. С., Руденко С. С., Морозова Т. В. Ксенобиотики и антиоксидантная система организмов // Ксенобиотики и живые системы: материалы III Междунар. науч. конф. (Минск, 2008). С. 78–81.
13. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова, 3-е изд. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
14. Платонова А. А., Костишин С. С. Вміст малонового діальдегіду та активність антиоксидантних ферментів у проростках гороху за дії іонів кадмію // Физиология и биохимия культурных растений. 2000. Т. 32. № 2. С. 146–150.
15. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1968. 183 с.
16. Половникова М. Г. Экофизиология стресса / Марийский гос. ун-т. Йошкар-Ола, 2010. 200 с. [Электронный ресурс].
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. Россихіна Г. С. Супероксиддисмутазна активність різних за стійкістю ліній кукурудзи при комбінованій дії гербіциду 2,4-Д амінна сіль та ґрунтової посухи // Strategiczne pytania swiatowej nauki: materialy VI Miedzynarodowej naukowo-praktycznej konf. 2010. (Przemysl, 2010). С. 40–42.

19. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М.М. Мусієнко, Т.В. Паршикова, П.С. Славний. К.: Фітосоціоцентр, 2001. 200 с.
20. *Стороженко В. О.* Ключові антиоксидантні ферменти фотосинтетичного апарату вищих рослин за дії стресових чинників // Физиология и биохимия культурных растений. 2004. Т. 36. № 1. С. 36–42.
21. *Чевари С., Чаба И., Секей Й.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. № 11. С. 678–681.

Стаття: надійшла до редакції 22.11.12

доопрацьована 24.01.13

прийнята до друку 19.02.13

THE INFLUENCE OF HERBICIDES ON FUNCTION OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF MAIZE HYBRID BILOZIRSKIJ 295CV

V. Bilchuck, A. Rossihina-Galicha, T. Legostajeva, J. Shmagajlo

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Research Institute of Biology
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine
e-mail: anna-rossihina@rambler.ru*

It has been investigated influence of soil herbicide preparations (Harnes, Merlin) on activity of superoxidismutase, peroxidase, catalase and accumulation of peroxide oxidation lipid products (POL) in vegetative parts of maize seedlings of hybrid Belozerskij 295CV on early ontogenesis stages. It has been established that adaptation ability of hybrid to herbicide stress realizes by activity increase of all oxidoreductases. Close correlation between enzyme activities and accumulation of TBK-active products in ontogenesis process is revealed.

Keywords: maize, SOD, catalase, peroxidase, malonyl dialdehyde, herbicide stress.

ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ГИБРИДА КУКУРУЗЫ БЕЛОЗЕРСКИЙ 295СВ

В. Бильчук, А. Россихина-Гальчая, Т. Легостаева, Ю. Шмагайло

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

Исследовано влияние почвенных гербицидных препаратов (Харнес, Мерлин) на активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, пероксидазы и накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в вегетативных частях проростков кукурузы гибрида Белозерский 295СВ на ранних стадиях онтогенеза. Установлено, что адаптивная способность гибрида к гербицидному стрессу реализуется за счет повышения активности оксидоредуктаз. Установлено наличие тесной взаимосвязи между активностями ферментов и накоплением ТБК-активных продуктов в процессе онтогенеза.

Ключевые слова: кукуруза, СОД, каталаза, пероксидаза, малоновый диальдегид, гербицидный стресс.