



УДК 581.198: 632.15(665.61)

## ВМІСТ ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ У КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ ЗА ДІЇ УМОВ НАФТОЗАБРУДНЕНОГО ҐРУНТУ

**М. В. Довгаюк-Семенюк, О. І. Величко, О. І. Терек**

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: maria.dovgauk@rambler.ru

Досліджено вплив умов нафтозабрудненого ґрунту на загальний вміст вільних амінокислот і проліну в рослинах конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) сорту Передкарпатська 6 на ранніх етапах онтогенезу – стадії сім'ядольних листків, першого справжнього та першого трійчастого листка. Встановлено, що за дії умов нафтозабрудненого ґрунту в органах конюшини лучної зростає вміст вільних амінокислот, а особливо – у листках рослин. Виявлено індуковане умовами нафтозабрудненого ґрунту семикратне зростання кількості проліну в листках конюшини лучної. Максимально вміст вільних амінокислот і проліну за дії умов нафтозабрудненого ґрунту зростає на початковій стадії росту рослин конюшини лучної – стадії сім'ядольних листків. Із настанням подальших фенологічних фаз – першого справжнього та першого трійчастого листка – індуковане нафтовим забрудненням ґрунту зростання кількості як проліну, так і загального вмісту вільних амінокислот у органах рослин конюшини лучної було менше вираженим. Встановлені дані засвідчили, що найістотнішу захисну роль вільні амінокислоти і пролін відіграють на початкових етапах росту рослин конюшини лучної у нафтозабрудненому ґрунті.

**Ключові слова:** *Trifolium pratense* L., вільні амінокислоти, пролін, нафтове забруднення ґрунту.

### ВСТУП

Адаптація рослин до стресових умов навколишнього середовища є однією з центральних проблем сучасної теоретичної та практичної біології [11]. На особливу увагу заслуговує дослідження адаптації до негативних умов середовища рослин, які можуть бути використані для відновлення цього середовища. Однією з причин негативних змін навколишнього середовища є його забруднення полютантами, а зокрема – нафтою та нафтопродуктами. Основним реципієнтом нафтового забруднення є ґрунт. Нафтозабруднений ґрунт є прикладом одночасної дії на рослину кількох стресових чинників, а саме – негативної дії змінених фізико-хімічних

властивостей ґрунту і безпосередньої дії вуглеводнів нафти, які можуть потрапляти у рослину [18]. Тому під час дослідження адаптації рослин до умов нафтозабрудненого ґрунту слід враховувати комплекс різних за природою та силою чинників. На сьогодні з'ясовані окремі адаптивні реакції рослин на умови нафтозабрудненого ґрунту [18, 19]. Зокрема, з'ясовано, що адаптація рослин *Carex hirta* до дії умов нафтозабрудненого ґрунту пов'язана з нагромадженням низькомолекулярних антиоксидантів (наприклад, поліфенолів), тоді як у коренях рослин *Faba bona* за дії нафти зростає активність антиоксидантних ферментів – каталази і пероксидази [18]. Проте фізіологічні основи механізмів адаптації багаторічних бобових рослин до умов нафтозабрудненого ґрунту потребують вивчення. Передбачаємо, що адаптація бобових рослин до умов нафтозабрудненого ґрунту пов'язана зі змінами у метаболізмі нітрогену.

Однією з неспецифічних реакцій рослин на дію стресових чинників є збільшення кількості різних низькомолекулярних сполук, зокрема – розчинних вуглеводів і різноманітних нітрогеновмісних сполук (вільних амінокислот, амідів, пептидів, поліамінів) [8]. Низькомолекулярні нітрогеновмісні сполуки за стресових умов можуть виконувати протекторні та регуляторні функції [10]. У попередніх дослідженнях встановлено накопичення низькомолекулярних нітрогеновмісних сполук у органах рослин конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту [18]. Серед низькомолекулярних нітрогеновмісних сполук важливу роль у адаптації рослин до негативних умов навколишнього середовища відіграють вільні амінокислоти. Поліфункціональним протектором у рослинах за стресових умов є така амінокислота як пролін [4,13]. У роботі досліджували загальний вміст вільних амінокислот і вміст проліну в рослинах конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

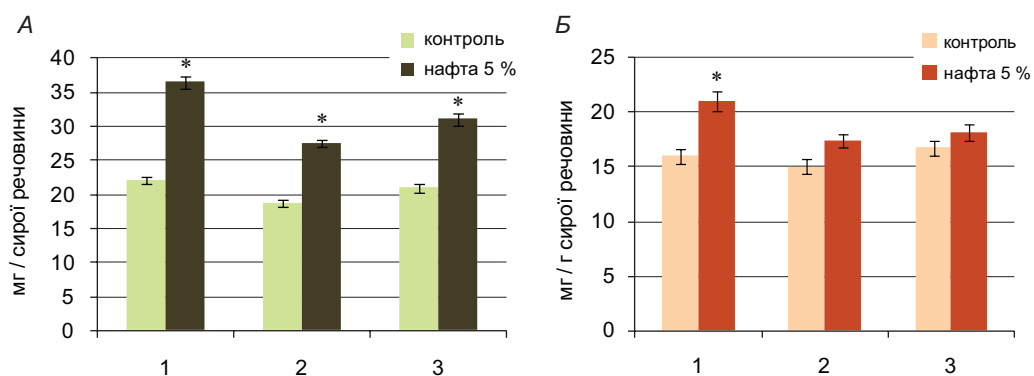
Для проведення досліджень використовували дерново-підзолистий, суглинковий ґрунт з околиць м. Борислав Львівської області. Повітряно-сухий ґрунт перемішували зі сирою нафтою в кількості 5 %. Через 30 діб, необхідних для вивітрювання ароматичних вуглеводнів, у ґрунт сіяли сухе насіння конюшини лучної (*Trifolium pratense* L.) сорту Передкарпатська 6. Контролем були рослини, вирощені у ґрунті без нафти. Рослини вирощували в лабораторних умовах. Для аналізу використовували рослини на стадії сім'ядольних листків, першого справжнього та першого трійчастого листка. Вміст вільних амінокислот визначали нінгідриновим методом [16]. Амінокислоти екстрагували 10% оцтовою кислотою. До 2 мл фільтрату додавали 3 мл нінгідринового реактиву, 0,1 мл 1% аскорбінової кислоти й нагрівали на водяній бані упродовж 15 хв. Після цього фільтрат охолоджували та доводили 60% спиртом до 5 мл. Вимірювали оптичну густину отриманого розчину за довжини хвилі 580 нм. Вміст вільних амінокислот розраховували у мг на 100 г сирової речовини.

Для визначення проліну 0,5 г рослинного матеріалу гомогенізували з 1 мл 3 % сульфасаліцилової кислоти, доводили об'єм до 10 мл і фільтрували. До 2 мл отриманого фільтрату додавали 2 мл оцтової кислоти, 2 мл нінгідрину та ставили на водяну баню на 1 год. Після цього пробірки виймали та поміщали у лід. До охолодженого екстракту додавали 4 мл толуолу та ретельно перемішували упро-

довж 25–30 с. Далі шар толуолу відділяли та нагрівали до кімнатної температури. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали за довжини хвилі 520 нм. Вміст проліну в рослинному матеріалі розраховували у мкмоль/г сирової речовини [17]. Результати опрацьовували статистично.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Вільні амінокислоти вважають центром метаболізму нітрогену в рослинному організмі. У літературі трапляються повідомлення стосовно змін у рослинах кількості вільних амінокислот за дії різних несприятливих екологічних чинників, а саме – водного і сольового стресів; нестачі мінеральних елементів, дії пестицидів, гербіцидів; надлишку іонів  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ; за умов фенольного забруднення атмосфери; фумігації сірчистим ангідридом тощо [4, 5, 8, 14]. У наших дослідженнях встановлено збільшення вмісту вільних амінокислот у органах рослин конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту (див. рисунок).



Вплив умов нафтозабрудненого ґрунту на вміст вільних амінокислот у листках (А) та коренях (Б) рослин конюшини лучної на різних фенологічних фазах розвитку (фази розвитку: 1 – сім'ядольних листків; 2 – першого справжнього листа; 3 – першого трійчастого листка)

**Примітки:** \* – відмінність достовірна щодо контролю  $p \leq 0,05$

The content of free amino acids in the leaves (A) and roots (B) of red clover plants at different phenological phases of development under the conditions of oil polluted soil (phases of development: 1 – cotyledon leaves; 2 – first real leaf; 3 – first trifoliate leaf)

**Comments:** \* – significant differences compared with control at  $p \leq 0.05$

Максимально вміст вільних амінокислот зростав у рослинах конюшини лучної на початковій стадії росту – стадії сім'ядольних листків. Із настанням кожної наступної фенологічної фази – збільшення пулу вільних амінокислот за дії нафтозабрудненого ґрунту було менш вираженим (див. рисунок). Істотніше вміст вільних амінокислот під дією умов нафтозабрудненого ґрунту зростав у листках рослин. Так, на стадії сім'ядольних листків вміст вільних амінокислот у листках конюшини лучної був удвічі більшим, ніж у контролі, тоді як у коренях збільшення вмісту амінокислот за цих умов становило тільки 23 % (див. рисунок).

Відомо, що вміст вільних амінокислот залежить від форми нітрогену, доступного для рослини. Рослини містять більше вільних амінокислот, якщо єдиним джерелом нітрогену для них є  $\text{NH}_4^+$ , а не  $\text{NO}_3^-$  [1]. Це пов'язано з тим, що поглинений

нітрат відновлюється до  $\text{NH}_4^+$  або нагромаджується у вакуолях і використовується для асиміляції залежно від наявності вуглеводів, а амоній безпосередньо використовується на синтез амінокислот і далі – на синтез білків. У попередніх дослідженнях встановлено, що у ґрунті внаслідок забруднення нафтою виникає гострий дефіцит  $\text{N-NO}_3^-$  і що основним джерелом нітрогену для рослин за цих умов є його амонійна форма [3]. Це може забезпечувати швидкий синтез амінокислот, які при цьому не використовуються для біосинтезу білків, а нагромаджуються для виконання захисних функцій.

Вільні амінокислоти у рослинах виконують різні протекторні та регуляторні функції. Зокрема, нагромадження проліну сприяє формуванню осмотичного потенціалу клітин. Окремі амінокислоти беруть участь у регуляції метаболізму, впливаючи на активність фітогормонів. Такі амінокислоти як аргінін, гістидин, пролін, цистеїн, триптофан, лізин, метіонін, треонін проявляють антиоксидантні властивості [10]. Крім того, вільні амінокислоти можуть зазнавати подальших метаболічних перетворень в інші низькомолекулярні сполуки нітрогену, які також мають протекторні властивості [8]. Вільні амінокислоти використовуються також для синтезу захисних білків. Показано синтез захисних білків за умов нафтозабрудненого ґрунту в рослинах конюшини лучної на стадії першого трійчастого листка [21]. Виявлено, що аланін і орнітин збільшують агрегацію полірибосом, а під дією аланіну зменшується час елонгації синтезованих поліпептидних ланцюгів. Крім того, пролін в умовах стресу стимулює включення мічених попередників у клітинні білки та стабілізує полірибосоми [10]. Таким чином, вільні амінокислоти не лише є основою для синтезу білків, а й можуть впливати на роботу білоксинтезуючого апарату.

Ті вільні амінокислоти, які нагромаджуються в рослинах конюшини лучної за дії нафтового забруднення ґрунту, можуть виконувати різні захисні функції. Без сумніву, основні протекторні функції реалізуються за участі проліну, оскільки виявлено, що під дією нафтового забруднення ґрунту в листках рослин конюшини лучної його вміст збільшувався у 7 разів (див. таблицю).

**Вплив умов нафтозабрудненого ґрунту на вміст проліну в рослинах конюшини на різних фазах фенологічного розвитку,  $\mu\text{mol/g}$  сирої речовини**

**The content of proline in the red clover plants under the influence of oil pollution at different stages of phenological development,  $\mu\text{mol/g}$  of crude substance**

Умови вирощування	Фаза розвитку					
	сім'ядольних листків		першого справжнього листка		першого трійчастого листка	
	корені	листки	корені	листки	корені	листки
Ґрунт без нафти	3,84±0,51	4,09±0,76	3,64±0,53	4,23±0,39	3,80±0,44	3,43±0,57
Ґрунт із вмістом нафти 5%	14,50±0,74	28,32±1,88	12,08±0,95	23,68±1,62	9,79±0,41	11,04±1,21

Семикратне зростання вмісту проліну за дії умов нафтозабрудненого ґрунту у листках рослин конюшини лучної відзначено на початковій стадії росту рослин – стадії сім'ядольних листків. Із настанням подальших фенологічних фаз – першого

трійчастого та першого справжнього листка – нагромадження проліну (див. таблицю), як і вільних амінокислот (див. рисунок), у органах рослин конюшини за дії умов нафтозабрудненого ґрунту було не настільки вираженим.

Вважають, що на початкових стадіях розвитку стресової реакції пролін діє не як осморегуляторна, а як протекторна сполука. У цьому разі пролін розглядають і як учасника стресової реакції (неспецифічних механізмів стійкості), і як важливого чинника спеціалізованої адаптації до стресу [4, 10]. Тому індуковане умовами нафтозабрудненого ґрунту збільшення вмісту проліну в органах рослин конюшини лучної на стадії сім'ядольних листків може бути пов'язане з підтримкою клітинного гомеостазу та його переходом у новий стан.

Менш виражене зростання вмісту проліну в органах рослин конюшини лучної на подальших етапах фенологічного розвитку – стадії першого трійчастого та першого справжнього листка – може мати такі причини: по-перше, прояв синергізму, коли замість нагромадження однієї захисної речовини у високих концентраціях (як це відбувається на стадії сім'ядольних листків), рослини починають накопичувати різні комбінації хімічних сполук з більшою ефективністю за значно нижчих концентрацій (наприклад, поліаміни, вуглеводи) [10]; по-друге, пролін, синтезований на початкових етапах фенологічного розвитку, може використовуватись як джерело енергії (відомо, що в результаті розпаду 1 молекули проліну утворюється 30 молекул АТФ [13]).

Накопичений пролін на подальших етапах фенологічного розвитку рослин може виконувати й інші функції, насамперед – осморегуляторну, що важливо у разі адаптації рослин конюшини лучної до гідрофобних умов нафтозабрудненого ґрунту. Поліфункціональність проліну проявляється й у тому, що він відіграє антиоксидантну роль, бере участь у підтримці потоку електронів у електронтранспортних ланцюгах хлоропластів, стабілізує гідратаційну сферу білків, є джерелом запасного нітрогену [7, 12, 19].

Способи накопичення вільних амінокислот у органах рослин можуть бути різними. Відомо, що залежно від сили стресу можуть запускатися різні механізми нагромадження вільних амінокислот: за умов помірних стресів нагромадження амінокислот є наслідком їхнього синтезу, а за умов “жорстких” стресів – результатом активування протеаз [8]. З'ясовано, що пролін за стресових умов синтезується *de novo* із глутамату [2, 13]. Можемо вважати, що встановлене нами нагромадження проліну є результатом його синтезу, оскільки виявлено зростання у рослинах конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту глутамінсинтетазної активності (ще не опубліковані дані). А глутамінсинтетаза є основним ферментом глутаматсинтетазного шляху асиміляції амонію, у результаті діяльності якого синтезується глутамат – субстрат для синтезу проліну.

Таким чином встановлено, що за дії умов нафтозабрудненого ґрунту відбувалося зростання загального вмісту вільних амінокислот і вмісту проліну в органах рослин конюшини лучної. На стадії сім'ядольних листків зростання загального вмісту вільних амінокислот і проліну в органах конюшини лучної за дії умов нафтозабрудненого ґрунту було максимальним, а далі – на стадії першого справжнього та першого трійчастого листка – проявлялося меншою мірою. Це свідчить про те, що основну захисну роль вільні амінокислоти і пролін виконують на початкових етапах адаптації рослин конюшини лучної до умов нафтозабрудненого ґрунту, а далі – можливе залучення й інших механізмів захисту.

1. *Atanasova E.* Effect of nitrogen sources on the nitrogenous forms and accumulation of amino acid in head cabbage. **Plant, Soil and Environment**, 2008; 54: 66–71.
2. *Diaz P., Betti M., Sanchez D.H.* et al. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress, **New Phytol**, 2010; 188: 1001–1013.
3. *Dovgajuk-Semenuk M.V., Velychko O.I., Terek O.I.* The content of ammonium and nitrate nitrogen in the red clover plants under the influence of oil polluted soil and fertilization with phosphorus-potassium fertilizers. **Scientific Notes TNPU**, 2015; 1(62): 94–99. (In Ukrainian).
4. *Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.* et al. Role of proline under changing environments. **Plant Signal Behav**, 2012; 7(11): 1456–1466.
5. *Ivanchenko O. E.* Influence of heavy metals on nitrogen metabolism of plants. **Problems of Bioindications and Ecology**, 2009; sites.znu.edu.ua. (In Ukrainian).
6. *Kamenova-Yuchimenko St., Georgieva V., Markovska J.* Changes in the quantity of amino acids and soluble proteins as regards pea plants in an answer to Cd toxicity in the presence of some physiologically – active substance. **Bulg. J. Plant Physiol, Spec. Issul**, 2003: 397.
7. *Kavi Kishor P. B., Sreenivasulu N.* Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant Cell Environ**, 2014; 37: 300–311.
8. *Kobyletska M.S., Terek O.I.* Effect of salicylic acid on free amino acids content in wheat *Triticum aestivum* L. and sunflower *Helianthus annuus* L. under the actions of cadmium ions. **Studia Biologica**, 2012; 6(1): 87–92. (In Ukrainian).
9. *Kolupaev Yu.E., Vayner A.A., Yastreba T.O.* Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. **The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University**, 2014; 2 (32): 6–22. (In Ukrainian).
10. *Kolupaev Yu.Ye., Karpets Yu.V.* Participation of soluble carbohydrates and low-molecular nitrogen compounds in adaptive reactions of plants. **The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University**, 2010; 2 (20): 36–53. (In Ukrainian).
11. *Kosakivska I.V., Golovyanko I.V.* Adaptation of plants: biosynthesis and functions of stress proteins. **Ukrainian Phytosociological Collection**, 2006; 24: 3–17. (In Ukrainian).
12. *Li Z., Peng Y., Zhang X.* et al. Exogenous spermidine improves water stress tolerance of white clover (*Trifolium repens* L.) involved in antioxidant defence, gene expression and proline metabolism. **Plant. Omics. Journal**, 2014; 7(6): 517–526.
13. *Liang X., Zhang L., Natarajan S.K.* et al. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2013; 19(9): 998–1011.
14. *Malenka U., Kobyletska M., Terek O.* Influence of salicylic acid on the amount of free amino acids and proline in plants of wheat and corn under drought conditions, **Studia Biologica**, 2014; 8(2): 123–132. (In Ukrainian).
15. *Neuberg M., Pavlíková D., Pavlík M.* et al. The effect of different nitrogen nutrition on proline and asparagine content in plant. **Plant Soil Environ**, 2010; 56(7): 305–311.
16. *Pochinok H.N.* **Methods of Analysis Biochemically Plants**. Kiev: Science Thought, 1976. P. 72–95. (In Russian).
17. *Sadasivam S., Manickam A.* **Biochemical methods**. New Age International, New Delhi, 1996; 56–140.
18. *Terek O., Lapshyna O., Velychko O.* et al. Crude oil contamination and plants. **Journal of Central European Green Innovation**, 2015; 3(2): 175–184.
19. *Terek O.I., Patsula O.I.* **Plant growth and development**. Lviv: Ivan Franko LNU, 2011: P. 259–262. (In Ukrainian).
20. *Vayner A.O., Kolupaev Yu.E., Yastreba T.O.* et al. Exogenous proline suppresses the increase in the activities of antioxidant enzymes of wheat seedlings caused by heat hardening. **The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University**, 2014; 1(31): 66–71. (In Ukrainian).



21. Velychko O.I. The Influence of the oil polluted soil conditions on the Red clover protein spectral composition. **Scientific Journal NLTUU**, 2014; 24(9): 115–117. (In Ukrainian).

## THE CONTENT OF FREE AMINO ACIDS IN THE RED CLOVER PLANTS UNDER THE INFLUENCE OF OIL POLLUTED SOIL

**M. V. Dovgajuk-Semenuk, O. I. Velychko, O. I. Terek**

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: maria.dovgauk@rambler.ru*

The influence of conditions of oil polluted soil on the general content of free amino acids and proline in the red clover plants (*Trifolium pratense* L., sort Peredkarpatska 6) at early stages of ontogenesis was studied. It was found that the content of free amino acids increased in organs of red clover plants under the influence of oil pollution of soil. The content of free amino acids under the influence of oil polluted soil increased more substantially in the plants' leaves. The amount of proline in the red clover leaves increased 7 times under induction by soil pollution with oil. The maximum increase in free amine acids content under the effect of oil pollution of soil was at the primary stage of red clover plants growth – the stage of cotyledon leaves. At the upcoming of following phenological phase – the first real and first trifoliate leaf – the induction by oil pollution of soil increase in the amount of both proline and general content of free amino acids in organs of red clover plants was less expressed. Obtained results suggest that free amino acids and proline play a significant protective role at primary phases of red clover plants' growth in the soil polluted with oil.

**Keywords:** *Trifolium pratense* L., free aminoacids, proline, oil polluted soil.

## СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО ПОД ВЛИЯНИЕМ УСЛОВИЙ НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННОЙ ПОЧВЫ

**М. В. Довгаюк-Семенюк, О. И. Величко, О. И. Терек**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: maria.dovgauk@rambler.ru*

Исследовано влияние условий нефтезагрязненной почвы на общее содержание свободных аминокислот и пролина в растениях клевера лугового (*Trifolium pratense* L. ) сорта Предкарпатская 6 на ранних этапах онтогенеза. Установлено, что под влиянием условий нефтезагрязненной почвы в органах растений клевера лугового увеличивалось содержание свободных аминокислот. Существенно содержание свободных аминокислот под действием условий нефтезагрязненной почвы увеличивалось в листьях растений. Выявлено индуцированное условиями нефтезагрязненной почвы семикратное увеличение количества пролина в листьях растений. Максимально содержание свободных аминокислот и пролина под влиянием условий нефтезагрязненной почвы повышалось на начальной стадии роста растений – стадии семядольных листьев. С наступлением дальнейших фенологи-

ческих фаз – первого настоящего и первого тройчатого листа – индуцированное нефтяным загрязнением почвы увеличение количества как пролина, так и общего содержания свободных аминокислот в органах растений клевера лугового было менее существенным. Установленные данные показали, что существенную защитную роль свободные аминокислоты и пролин играют на самых первых этапах роста растений клевера лугового в нефтезагрязненной почве.

**Ключевые слова:** *Trifolium pratense* L., свободные аминокислоты, пролин, нефтезагрязненная почва.

Одержано: 08.04.2016