

УДК: 631.811

**Активність ферментів системи антиоксидантного захисту в насінні
Gleditsia triacanthos L. за антропогенного впливу**Ю.В. Лихолат¹, Г.С. Россихіна-Галича¹, О.М. Боброва², І.В. Білик²¹Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара (Дніпропетровськ, Україна)²Ботанічний сад ДНУ ім. Олеся Гончара (Дніпропетровськ, Україна)

Lykholat2006@ukr.net

Досліджено вплив антропогенного забруднення м. Дніпропетровська на зміни активності антиоксидантних ферментів у насінні *Gleditsia triacanthos* L. З'ясовано, що посилення активності супероксиддисмутази формується за хронічного впливу аерогенних викидів автотранспорту, носить пристосувальний характер. Показана важлива роль каталази в адаптації достигаючого насіння до умов урбофітоценозу. Встановлене зниження активності каталази у жовтні, ймовірно, спричинене як інактивацією ферменту певними аерополітантами, так і пригніченням білкового синтезу внаслідок підвищеного генерування активних форм кисню. Виявлені зміни активності пероксидази впродовж терміну досягання насіння *Gleditsia triacanthos* свідчить про реакцію даного виду, спрямовану на захист від окиснення компонентів рослинної клітини, й активну участь ферменту у відновленні H_2O_2 до H_2O .

Ключові слова: *Gleditsia triacanthos* L., супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, аерополітанти, насіння.

**Активность ферментов системы антиоксидантной защиты в семенах
Gleditsia triacanthos L. при антропогенном влиянии**

Ю.В. Лихолат, Г.С. Россихина-Галича, О.М. Боброва, И.В. Билик

Исследовано влияние антропогенного загрязнения г. Днепропетровска на изменения активности антиоксидантных ферментов в семенах *Gleditsia triacanthos* L. Выяснено, что увеличение активности супероксиддисмутазы, которое формируется при хроническом воздействии аерогенных выбросов автотранспорта, носит приспособительный характер. Показана важная роль каталазы в адаптации созревающих семян гледичии к условиям урбофитоценоза. Установленное подавление активности каталазы в октябре, вероятно, вызвано как инактивацией фермента определенными аерополітантами, так и угнетением белкового синтеза вследствие повышенного генерирования активных форм кислорода. Установленные изменения активности пероксидазы в течение термина созревания семян *Gleditsia triacanthos* свидетельствует о реакции данного вида, направленной на защиту от окисления компонентов растительной клетки, и активное участие фермента в восстановлении H_2O_2 до H_2O .

Ключевые слова: *Gleditsia triacanthos* L., супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, аерополітанти, семена.

**The enzyme activity of antioxidant defence in the *Gleditsia triacanthos* L. seeds
at antropogenic exposure**

Yu.V. Lykholat, A.S. Rossikhina-Galicha, O.M. Bobrova, I.V. Bilyk

The influence of antropogenic pollution of Dnipropetrovsk on changes of antioxidant enzymes in of *Gleditsia triacanthos* L. seeds was investigated. It was found that increased activity of SOD was formed by chronic exposure of aerogenic emissions from motor vehicles and had adaptive character. Important role of catalase in ripening seeds adapting to the conditions of urbofitocenosis was shown. The decrease in catalase activity in October, probably was caused by both a specific enzyme inactivation by aeropollutants and inhibition of protein synthesis due to increased generation of reactive oxygen species. Revealed peroxidase activity changes indicates this reaction aimed on the plant cell components protection and enzyme active role in the restoration of H_2O_2 to H_2O during the *Gleditsia triacanthos* seeds ripening term.

Keywords: *Gleditsia triacanthos* L., superoxide dismutase, catalase, peroxidase, aeropollutants, seed.

Вступ

Рослинність міських урбофітоценозів зазнає негативного впливу природних і особливо антропогенних стресорів. Суттєві зміни відмічені у процесах росту та розвитку рослинних організмів, їх здатності до насіннєвого та вегетативного розмноження. Головним чинником реалізації адаптивних можливостей виду, його ефективного відтворення та розповсюдження є репродуктивна стратегія. Тому,

важливе завдання сьогодення – виявлення видів рослин з високим рівнем екологічної адаптації та пластичності до умов урбосередовища (Журавлева, 2012).

Відомо, що для насіння деревних рослин, яке формується за умов хронічного антропогенного стресу характерним є зменшення морфометричних характеристик (Бессонова, Юсипіва, 2001; Грицай, Денисенко, 2011), зниження вмісту жирів, крохмалю й сахарози (Бессонова, Юсипіва, 2001), поява великої кількості пухлого насіння (Воронин, 1989), пригнічення інгібіторів протеїназ та редукція вмісту легкорозчинних білків, зміни ізоферментного складу і зниження активності амінотрансфераз (Більчук, 2005), зростання активності ферментів глутатіонового циклу (глутатіон-S-трансферази і глутатіон-редуктази) та вмісту відновленого глутатіону, підвищення вмісту вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (тіобарбітуратактивних продуктів – ТБК-активних продуктів) (Ловинська, Россихіна, 2012). Зростання внутрішньоклітинної концентрації активних форм кисню за дії стресорів призводить до пошкодження молекул ліпідів, білків і нуклеїнових кислот (Кулинский, 1999; Gille, Singer, 1995). Для підтримання клітинного гомеостазу активується антиоксидантна система захисту, зокрема супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза та ін. (Кордюм та ін., 2003; Россихіна-Галича та ін., 2014), компоненти якої активно досліджуються. Враховуючи, що особливості активності окисно-відновних ферментів насіння деревної рослинності в умовах урбосередовища вивчені недостатньо, досить актуальним є дослідження зміни активності антиоксидантних ферментів у насінні *Gleditsia triacanthos* L., яке формується за дії аерогенних полутантів м. Дніпропетровська.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження впливу антропогенного забруднення на активність антиоксидантних ферментів в насінні деревних порід проводили на основі натурального досліду, який проходив на базі головних автомагістралей м. Дніпропетровська. Для дослідження було обрано одну з малодосліджених на території міста деревну породу – *Gleditsia triacanthos* L. Насіння відбирали по мірі його досягання (серпень, вересень та жовтень) з різних моніторингових точок: I – с. Першотравенка (чиста зона – контроль), II – парк 40-річчя Перемоги, III – узбіччя пр. Гагаріна, IV – узбіччя вул. Героїв Сталінграда.

Активність супероксиддисмутази (СОД) оцінювали фотоелектроколориметрично за ступенем інгібування відновлення нітросинього тетразолію за І.О. Переслегіною (Переслегіна, 1989). Активність каталази оцінювали за кількістю розкладеного перекису водню титриметрично за Б.П. Плешковим (Плешков, 1968). Активність бензидин-пероксидази реєстрували за швидкістю реакції окислення бензидину фотоелектроколориметрично за (Ермаков, 1987). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета Microoft Statistica 6.0. Розбіжності між вибірками вважали значущими при $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Антропогенні компоненти сприяють утворенню великої кількості активних форм кисню і як наслідок посилюють пероксидне окиснення ліпідів, яке індукує пошкодження клітинних мембран і порушення фізіологічних функцій (Лукаткин, 2002). Ключова роль в елімінації активних форм кисню в клітині відводиться антиоксидантним ферментам, і, в першу чергу СОД (Мерзляк, 1999). Цей фермент приймає участь в окисно-відновних реакціях рослинних клітин, захисних механізмах при екстремальних впливах (Таран, 2004) за рахунок пониження концентрації супероксиду (Мерзляк, 1999).

Установлено, що в умовах м. Дніпропетровська у насінні дерев *Gleditsia triacanthos* L. серпневого відбору, які зростали на дослідних ділянках, спостерігали більшу активність СОД (10,20–12,22 ум.од. / г сухої речовини хв.) порівняно з контрольним насінням (6,63 ум.од./г сухої речовини хв.). У рослин з II моніторингової точки цей показник підвищувався відносно контролю у 1,5 рази, з III – 1,8 рази, з IV – у 1,2 рази (рис. 1).

У насінні з контрольної і дослідних ділянок вересневого відбору порівняно з серпневим відмічено підвищення активності СОД. Насіння жовтневого відбору (повна стиглість) у контрольних рослин характеризувалось зниженням активності ферменту (7,01 ум.од. / г сухої речовини хв.) порівняно з вересневим відбором. У дослідного насіння навпаки фіксували зростання активності ферменту відносно насіння з контрольної ділянки (рис. 1).

Важлива роль у реалізації адаптаційного потенціалу рослин належить пероксидазі, яка будучи одним із маркерних ферментів, практично першою реагує й активується на широкий спектр стрес-факторів, що порушують гомеостаз обміну речовин. Слід зазначити, що активність даного ферменту за впливу несприятливих чинників середовища змінюється паралельно зі збільшенням ступеню техногенного навантаження на рослинний організм (Тарчевський, 2002).

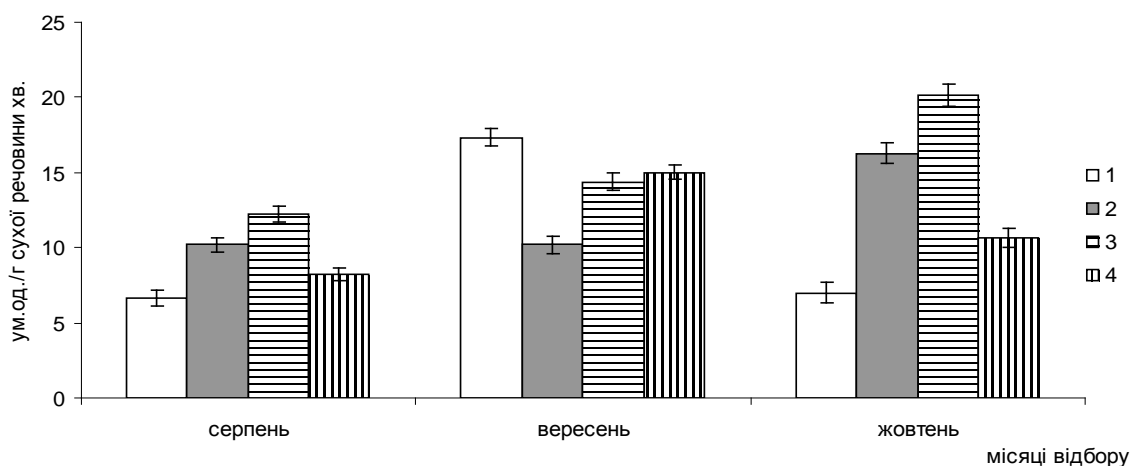


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази у насінні *Gleditsia triacanthos* L. за різних умов існування, ум.од. /г сухої речовини хв.

Примітка (тут і далі): 1 – с. Першотравенка; 2 – парк 40-річчя Перемоги; 3 – вул. Г. Сталінграда; 4 – пр. Гагаріна.

Результати визначення активності пероксидази у насінні *Gleditsia triacanthos* за дії аерогенних викидів автотранспорту представлені на рис. 2. Так, у насінні, відібраного у серпні місяці з дослідних ділянок активність ферменту порівняно з контрольними підвищувалася в 1,4 рази (моніторингова точка – II), в 1,89 рази (моніторингова точка – III) та у 2,0 рази (моніторингова точка – IV).

У вересні місяці спостерігали зниження активності пероксидази порівняно з серпнем у контрольному насінні в 1,3 рази, а у дослідного – від 1,8 до 2,1 рази в залежності від точки відбору. Слід відмітити, що у насінні з ділянок, які зазнали антропогенного навантаження рівень активності ензиму перевищував контрольні показники в 1,1–1,4 рази.

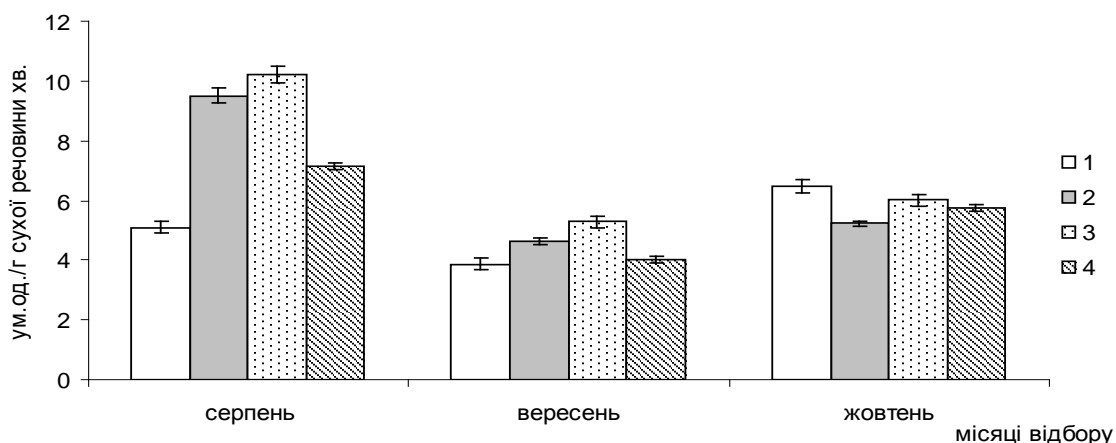


Рис. 2. Активність пероксидази у насінні *Gleditsia triacanthos* L. за різних умов існування, ум.од. / г сухої речовини хв.

Деяке збільшення пероксидазної активності як в контрольних, так і в дослідних зразках фіксували у жовтні порівняно з вереснем місяцем. Але, у насінні з дослідних ділянок відносно контрольних значень спостерігалася тенденція до зниження ферментативної активності, що ймовірно, пов'язано зі зниженням інтенсивності дихання і переходом насіння до стану спокою.

Результати досліджень по вивченню динаміки активності каталази в період досягання насіння гледичії триколючкової дозволили виявити, що її значення у репродуктивних органах серпневого відбору дослідних рослин становили 0,42–0,52 ммоль/г сухої речовини хв., а контрольних – 0,39 ммоль/г сухої речовини хв.

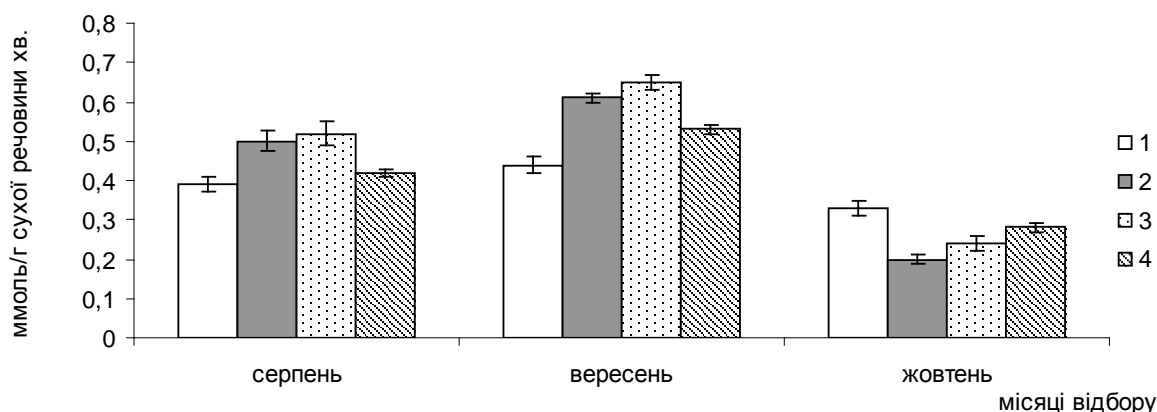


Рис. 3. Активність каталази у насінні *Gleditsia triacanthos* L. за різних умов існування, ммоль/г сухої речовини хв.

У вересні відмічалось зростання активності ферменту порівняно з серпнем у 1,1 рази як у контрольному насінні, так і в 1,2–1,25 рази у дослідному. При цьому слід зазначити, що насіння у рослин, що зростали вздовж автомагістралей міста, характеризувалось збільшенням активності каталази відносно контрольних зразків в 1,4; 1,5 та 1,2 рази. У жовтні спостерігалась тенденція до зниження активності каталази у насінні порівняно з вереснем: в 1,3 рази (с. Першотравенка), в 1,9 рази (пр. Гагаріна), в 3,0 та 2,7 рази (парк 40-річчя перемоги та вул. Г. Сталінграда), що свідчить згідно (Пацула, 2008) про активну участь каталази у детоксикації пероксиду водню.

У зв'язку з викладеним можна заключити, що підвищення активності супероксиддисмутази у насінні *Gleditsia triacanthos*, в умовах хронічного впливу аерогенних викидів автотранспорту, носить пристосувальний характер.

Показана важлива роль каталази в адаптації досягаючого насіння гледичії до умов урбофітоценозу м. Дніпропетровська. Встановлене пригнічення активності каталази у жовтні може бути спричинене як інактивацією ферменту певними токсикантами аеровикидів, пригніченням експресії її гену, так і пригніченням білкового синтезу внаслідок підвищеного генерування активних форм кисню.

Виявлені нами зміни активності пероксидази впродовж етапів досягання насіння гледичії триколючкової свідчить про реакцію даної породи, спрямовану на захист від окиснення компонентів рослинної клітини й активну участь ферменту у відновленні H_2O_2 до H_2O .

Список літератури

- Бессонова В.П., Юсыпова Т.И. Семенное возобновление древесных растений и промышленные поллютанты (SO_2 и NO_2). – Запорожье: Запорожский гос. ун-т, 2001. – 193 с. / Bessonova V.P., Yusyypiva T.I. Semennoe vozobnovlenie drevesnykh rasteniy i promyshlennyye pollyutanty (SO_2 i NO_2). – Zaporozhe: Zaporozh. gos. un-t, 2001. - 193 s.
- Більчук В.С. Вплив техногенного забруднення на активність і компонентний склад амінотрансфераз репродуктивних органів деревних рослин // Сучасні проблеми фізіології та інтродукції рослин: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. – Дніпропетровськ, 2005. – С. 6. / Bilchuk V.S. Vplyv tekhnogennogo zabrudnennya na aktyvnist i komponentnyi sklad aminotransferaz reproduktyvnykh organiv derevnykh roslyn / Bilchuk V.S. // Suchasni problemy fiziologii ta introduktsii roslyn: materialy Vseukr. nauk.-prakt. conf. – Dnipropetrovsk, 2005. – S. 6.
- Воронин В.И. Действие серосодержащих эмиссий на пихту сибирскую в Южном Прибайкалье: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Иркутск, 1989. – 19 с. / Voronin V.I. Deystvie serosoderzhashchikh yemissiy na pikhtu sibirskuyu v Yuzhnom Pribaykale: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.02.08. Irkutsk, 1989. – 19 s.
- Грицай З.В., Денисенко О.Г. Насіннева продуктивність деревних рослин в умовах забруднення довкілля викидами металургійного підприємства // Вісн. Дніпропетровськ. ун-ту. Сер. біол. Екол. – 2011. – Вип. 19, Т. 2. – С. 40–44. / Gritsay Z.V., Denysenko O.G. // Visn. Dnipropetrovsk. un-tu. Ser. Boil. Yekol. – Vyp. 19, T. 2. – S. 40-44.
- Журавлева А.Н. Эколого-биологическое состояние и особенности размножения растений в условиях урбанизированной среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Тольятти, 2012. – 18 с. / Zhuravleva A.N. Ekologo-biologicheskoe sostoyanie i osobennosti razmnozheniya rasteniy v usloviyah urbanizirovannoy sredy: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.02.08. Tolyatti, 2012. – 18 s.
- Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. – К.: Наук. думка,

2003. – 270 с. / Kordum E.L. Kletochnye mekhanizmy adaptatsii rasteniy k neblagopriyatnym vozdeystviyam yekhologicheskikh faktorov v estestvennykh usloviyakh. – K.: Nauk. dumka, 2003. – 270 s.

Кулинский В.И. Активированные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита // Сорос. образов. Ж урн. – 1999. – № 1. – С. 2-7. / Kulinciy V.I. Aktivirovannye formy kisloroda i oksidativnaya modifikatsiya makromolekul: polza, vred, zashchita // Soros. obrazov. zhurn. – 1999. – № 1. – С. 2-7.

Ловинська В.М., Россихина Г.С. Вплив *Rhytisma acerinum* на прооксидантно-антиоксидантну систему насіння кленів в умовах промислового міста // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2012. Вип. 58. – С.280-285 / Lovynska V.M. Vplyv *Rhytisma acerinum* na prooksidantno-antioksidantnu sistemu nasinnya kleniv v umovakh promyslovogo mista / Lovynska V.M., Rossikhina G.S. // Visnyk Lviv Universitu. Seriya Biologichna. – 2012. Vyp. 58.–S. 280-285.

Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1.Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений//Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 697-702. / Lukatkin A.S. Vklad oksiditelnogo stressa v razvitie kholodovogo povrezhdeniya v listyakh teplolubivykh rasteniy. 1. Obrazovanie aktivirovannykh form kisloroda pri okhlozhdenii rasteniy // Fiziologiya rasteniy. – 2002. – Т. 49, № 5. – С. 697-702.

Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2. Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 6. – С. 878-885. / Lukatkin A.S. Vklad oksiditelnogo stressa v razvitie kholodovogo povrezhdeniya v listyakh teplolubivykh rasteniy. 2. Aktivnost antioksidantnykh fermentov v dinamike okhlozhdeniya // Fiziologiya rasteniy. – 2002. – Т. 49. № 6. – С. 878-885.

Мерзляк М.Н. Активный кислород и жизнедеятельность растений // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20-26. / Merzlyak M.N. Aktivnyy kislorod i zhiznedeятельnost rasteniy // Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal. – 1999. – № 9. – С. 20-26.

Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений, 3-е изд. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с. / Metody biokhimitseskogo issledovaniya rasteniy / Pod red. A.I. Ermakova, 3-e izd. – L.: Agropromizdat, 1987. – 430 s.

Пацула О., Кобылецка М., Терек О. Оксидативні реакції рослин // Вісник Львівського університету. Біологія. – 2008. – Т. 48. – С. 201-204. / Patsula O., Kobyletska M., Terek O. Oksydatyvni reaktsiyi roslyn // Visnyk Lviv Universitu. Seriya Biologia. – 2008. – V. 48. – S.201– 204.

Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 20–23. / Pereslegina I.A. Aktivnost antioksidantnykh fermentov sluny zdorovykh detey // Laboratornoe delo. – № 11. – С. 20–23.

Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, 1968. – 183 с. / Plechkov B.P. Praktikum po biokhimii rasteniy. – M.: Kolos, 1968. – 183 s.

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. / Polovnikova M.G. Aktivnost komponentov antioksidantnoy zashchity i polifenoloksidazy u gazonnykh rasteniy v ontogeneze v usloviyakh gorodskoy sredy // Fiziologiya rasteniy. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 777-785.

Россихина-Галича Г.С., Лихолат Ю.В., Винниченко О.М. Активность ферментов антиоксидантной защиты растений кукурузы, произрастающих в условиях гербицидной обработки // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2014. – Т. 10, № 4.- С. 30-35. / Rossikhina-Galycha A.S., Lykholat Y.V., Vinnychenko O.M. Aktivnost fermentov antioksidantnoy zashchity rasteniy cucuruzy, proizrastaychis v ysloviyakh gerbizydnoy obrabotki // Ecologicheskyy vesnik Severnogo Kavkaza. – 2014. – V. 10, № 4. – С. 30-35.

Ситар О.В. Регулювання адаптивних реакцій проростків сої сіркою за умов свинцевого забруднення // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 443-449. / Sytar O.V. Reguluvannya adaptyvnykh reaktsiy prorstkiv soi sirkou za umov svyntseвого zabrudnennya // Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 443-449.

Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Бацманова Л.М. Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля // Физиология и биохимия культурных растений. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 3-14. / Taran N.U. Vtorynny oksidny stress yak element zagalnoyi adaptivnoyi vidpovidy Roslyn na diyu nespryiatlyvykh faktoriv dovkillya// Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 3-14.

Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294 с. / Tarchevskiy I.A. Signalnye sistemy kletok rasteniy. – M.: Nauka, 2002. – 294 s.

Gille G. Oxidative stress in living cells / Gille G., Singer K. // Folia Microbiol. – 1995. – Vol. 2. – P. 131-152.

Представлено: Ю.І. Грицан / Presented by: Yu.I. Grytsan

Рецензент: В.Ф. Тимошенко / Reviewer: V.F. Tymoshenko

Подано до редакції / Received: 20.11.2014