

ГВАЯКОЛ-ЗАЛЕЖНА ПЕРОКСИДАЗНА

система проростків пшениці озимої після дії гербіцидів

Визначено активність фракції гваякол-залежних пероксидаз після дії гербіцидів. Встановлено, що більша частина ферменту залишається у зв'язаному стані. Можливо, більш високий рівень активності зв'язаних з гваяколом фракцій пероксидази в клітинах коренів та пагонів проростків пшениці в деякій мірі пояснюється їх стійкістю щодо гербіцидного забруднення.

гербіциди, проростки, гваякол-залежні пероксидази

Відомо, що період використання хімічних засобів захисту сільськогосподарських культур від бур'янів триває понад 50 років, внаслідок чого відбувалися та продовжують проходити значні зміни не тільки у бур'янах, які виробляють захисні реакції проти дії гербіцидів та стають резистентними до низки хімічних класів препаратів, а й в культурних рослинах. Разом з тим, на відміну від бур'янів, сільськогосподарські культури упродовж онтогенезу не можуть швидко виробити захисні механізми на дію гербіцидів, які є для них новим чинником. Тому гербіциди, що застосовуються при вирощуванні кожної окремої культури, є для неї ксенобіотиками і за неправильного застосування здатні зумовлювати стрес. Культурні рослини пристосовуються до впливу ксенобіотиків, у першу чергу, за рахунок чисельних адаптаційних механізмів, які сформувалися в процесі їх еволюційного розвитку. Чим більше механізмів адаптації використовується рослиною одночасно на самих різних рівнях, тим організм стає більш стійким проти дії як окремо взятого чинника, так і їх комплексу [1–6].

Рослинні організми мають достатню стійкість проти окиснювальних пошкоджень завдяки наявності в клітині антиоксидантних систем, до складу яких входять окремі антиоксидантні ферменти класу оксидоредуктаз. Серед них важливу роль в детоксикації пероксиду водню відіграють різноманітні пероксидази,

Ю.І. ТКАЛІЧ,
доктор сільськогосподарських наук,
професор
e-mail: tkalich_yuriy@ukr.net

В.Л. МАТЮХА,
кандидат сільськогосподарських наук
e-mail: volmat1@uandex.ua

О.І. БОКУН,
кандидат сільськогосподарських наук

Л.В. БОГУСЛАВСЬКА
e-mail: milbo@rambler.ru
ДУ Інститут сільського господарства
степової зони НААН України

які присутні в багатьох компартаментах рослинної клітини і відновлюють H_2O_2 до H_2O [7–10].

Виходячи з вищевикладеного матеріалу, *завданням наших досліджень* було встановити, як позначається післядія гербіцидів на активності окремих антиоксидантних ферментів класу оксидоредуктаз (пероксидази) у рослинах пшениці, вирощуваних у модельному експерименті.

Матеріали та методика досліджень. Польові дослідження проводили в 2014–2015 рр. на Дослідному господарстві «Дніпро» ДУ Інституту сільського господарства степової зони НААН України (м. Дніпропетровськ), у модельному експерименті на п'ятидобових проростках пшениці озимої сорту Зіра.

Наведемо деяку коротку характеристику внесених у цьому дослідженні препаратів:

1 — контроль (без гербіцидів);
2 — Старане Преміум (0,5 л/га) — діюча речовина флуроксипір (хімічна група — похідні піридинкарбонової кислоти), селективний гербіцид для захисту зернових, колосових, цибулі, маку та кукурудзи від однорічних та багаторічних бур'янів;

3 — Паллас (0,4 л/га) — діюча речовина 45 г/л пірокссуламу + 90 г/л клівінтосет-мексилу (антидот) (хімічна група — триазолпіримідини), селективний гербіцид для захисту

пшениці озимої від однорічних злакових та дводольних бур'янів;

4 — Лонтрел Гранд (120 г/га) — діюча речовина 750 г/кг клопіраліду (хімічна група — похідні піридинкарбонової кислоти), селективний гербіцид для захисту буряків цукрових, ріпаку, зернових колосових, кукурудзи та овочів від осотів та деяких інших дводольних бур'янів;

5 — Діален Супер (0,8 л/га) — діюча речовина 120 г/л дикамби + 344 г/л 2,4-Д диметиламіної солі (хімічна група — похідні бензойної й акрилоксиалканкарбонової кислот), селективний гербіцид для захисту посівів зернових колосових культур та кукурудзи від однорічних і багаторічних дводольних бур'янів.

Відібране насіння після польового експерименту замочували протягом 4-х годин в дистильованій воді, потім переносили в термостат, де пророщували протягом 5-ти діб при $t = +27^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Для витягу розчинної фракції білків наважку 1 г гомогенізованого матеріалу заливали 3 мл 0,1 М буфера Трис-НСЛ, рН 7,0, центрифугували протягом 15 хв при швидкості 15000 об./хв. Отриманий супернатант зливали у пробірки для подальшого дослідження. Активність гваякол-залежних пероксидаз визначали за загальноприйнятою методикою [11]. Досліди виконані не менше як в 3-х повторностях. Отримані результати опрацьовували статистично за допомогою стандартних комп'ютерних програм у Excel 2003/XP. Достовірність різниці між варіантами оцінювали за критерієм Ст'юдента, використовуючи 5% рівень значущості [12].

Результати досліджень. Пероксидаза — фермент, який одним із перших реагує на різні негативні впливи та виконує знешкодуючу функцію стосовно токсичних перекисних сполук, що зумовлює важливу роль ферменту в стійкості рослин [13]. Відомо, що ізоферменти пероксидази локалізуються в різних компартаментах рослинної клітини [13–16]. Залежно від місця локалізації та рівня зв'язку з іншими компонентами клі-

тини розрізняють вільну (розчинну), іонозв'язану та ковалентно зв'язану з гваяколом (субстрат) фракції пероксидази [17–19]. Згідно з літературними даними, вільна фракція пероксидази в основному локалізована в міжклітинному просторі, цитоплазмі, вакуолях та на клітинній стінці, а зв'язана — на клітинній стінці та мембранах [13, 20].

Різні фракції ферменту пероксидази мають неоднакову чутливість до дії несприятливих факторів середовища [20]. Найбільш висока активність та чутливість до дії стресу властива вільній та іонозв'язаній фракціям [21]. За дії на клітину стресових факторів відбуваються зміни її субмолекулярної організації, які спричиняють розпадання слабких зв'язків надмолекулярних структур, що призводить до вивільнення частини упорядковано вбудованих у них білків. Унаслідок цих процесів змінюється співвідношення вільної та зв'язаних форм ферментів [21, 22].

Існують відомості, що після фумігації рослин SO_2 частина зв'язаних компонентів пероксидази переходить в розчинну форму [13]. Можливо, подібні зміни локалізації пероксидази в рослинній клітині мають місце і за дії інших токсикантів. Отже, без дослідження взаємозв'язку ферментів з компартментами клітини важко отримати повне уявлення про їхню роль у стійкості рослин до стресорів.

В результаті дослідження активності фракції вільної пероксидази у коренях проростків пшениці показано її збільшення після дії гербіциду Паллас на 60%, зниження після дії Старане Преміум та Ділен Супер на 40 та 25% відповідно та порівняно з контролем. Після дії гербіциду Лонтрел Гранд активність вільної фракції залишалась на рівні контролю (рис. 1).

Аналіз активності іонозв'язаної з гваяколом фракції ферменту коренів проростків пшениці показав її зниження після дії гербіцидів Старане Преміум, Паллас та Ділен Супер на 46, 29 та 13% відповідно, та її підвищення на 3% після дії Лонтрел Гранд.

активності ковалентно зв'язаної з гваяколом фракції ферменту визначили її зменшення в усіх досліджених зразках порівняно з контролем.

Активність вільної фракції пероксидази пагонів пшениці підвищувалась після дії всіх досліджуваних гербіцидів. Аналіз активності іонозв'язаної з гваяколом фракції ферменту показав її зниження після дії Старане Преміум та Ділен Супер на 29 та 51% відповідно та у порівнянні з контролем (рис. 1). В інших варіантах дослідження активність цієї фракції суттєво не відрізнялась від контрольних значень.

Після дії Старане Преміум підвищувалась активність ковалентно зв'язаної з гваяколом фракції ферменту на 43%, а після дії Палласу та Лонтрелу Гранд знижувалась на 7% порівняно з контролем.

Таким чином, після дії гербіцидів спостерігався перерозподіл пероксидази між гваякол-залежними фракціями в клітинах коренів та пагонів 5-добових проростків пшениці озимої. Встановлено, що більша частина ферменту залишається у зв'язаному стані. Можливо, більш високий рівень активності зв'язаних з гваяколом фракцій пероксидази в

клітинах коренів та пагонів проростків пшениці в деякій мірі пояснюється їх стійкістю проти гербіцидного забруднення.

Для оцінки рівня зв'язку ферменту з мембранним матріксом використовують коефіцієнт структурованості, який дорівнює відношенню активності іонозв'язаної фракції до активності вільної [13]. Найбільший рівень зв'язку пероксидази з компартментами клітини виявлено в коренях пшениці після дії Ділену Супер порівняно з іншими варіантами досліду (рис. 2). Мінімальні значення коефіцієнта структурованості пероксидази визначено в пагонах після дії всіх досліджуваних гербіцидів, а також у коренях після дії гербіцидів Старане Преміум та Паллас.

Відомо, що різні фракції пероксидази мають різний компонентний склад, а найбільша гетерогенність властива вільній фракції [13]. Фракції ферменту можуть виконувати в клітині різну фізіологічну функцію. Так, вільну фракцію пероксидази вважають багатofункціональним ферментом [10]. В літературі не існує єдиної точки зору про роль іонозв'язаної фракції в захисних реакціях рослинної клітини. Дана

фракція ферменту бере участь в процесах лігніфікації клітинних стінок та специфічних механізмах утилізації пероксиду водню. Зокрема, виявлена кореляція між збільшенням вмісту H_2O_2 і зниженням активності іонозв'язаної фракції пероксидази при інфікуванні та старінні рослин пшениці [13]. У той же час іонозв'язана фракція, можливо, генерує активні форми кисню, які можуть бути сигнальними месенджерами, що індуюють захисні реакції клітини [13].

В результаті дослідження в коренях проростків пшениці озимої визначено підвищення активності вільної фракції гваякол-залежної пероксидази після дії гербіциду Паллас та іонозв'язаної з гваяколом фракції після дії Лонтрелу Гранд. Активність ковалентно зв'язаної з гваяколом фракції пероксидази знижувалась після дії всіх гербіцидів. Активність вільної фракції гваякол-залеж-

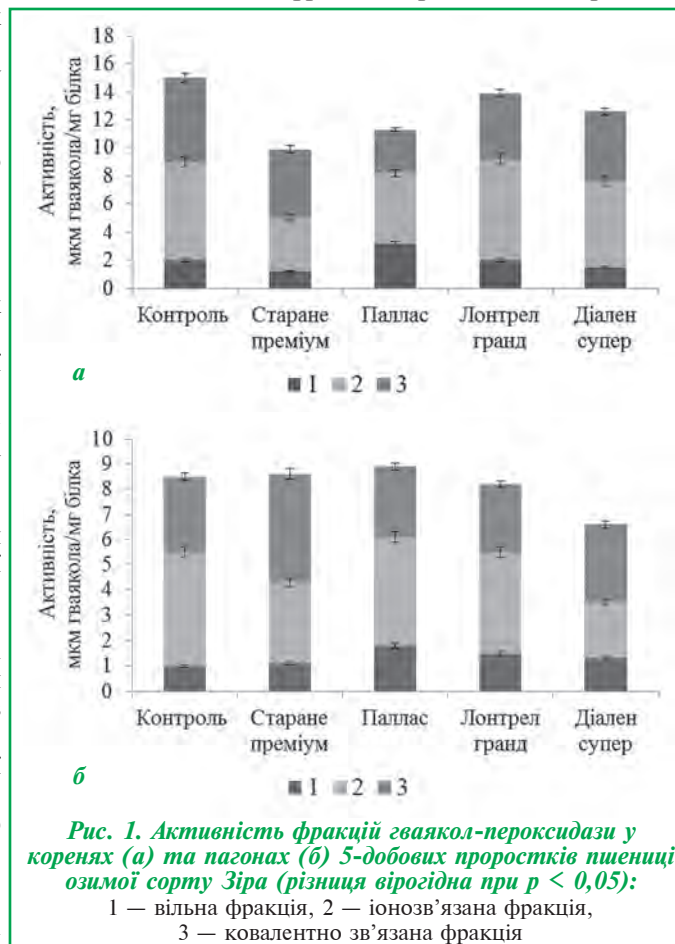


Рис. 1. Активність фракцій гваякол-пероксидази у коренях (а) та пагонах (б) 5-добових проростків пшениці озимої сорту Зіра (різниця вірогідна при $p < 0,05$):
 1 — вільна фракція, 2 — іонозв'язана фракція,
 3 — ковалентно зв'язана фракція

них пероксидаз в пагонах проростків пшениці озимої підвищувалась після дії досліджуваних гербіцидів. Таким чином, за пророщування насіння після дії гербіцидів найбільш чутливим виявилось коріння проростків пшениці.

ВИСНОВКИ

В коренях та пагонах пшениці озимої після дії гербіцидів змінюється співвідношення фракцій ферменту пероксидази. Більша частина пероксидази зв'язана іонними зв'язками з мембранами клітини, що проявляється у підвищенні активності іонота ковалентно зв'язаної фракції пероксидази. Отримані результати збігаються з даними інших авторів [13, 22] та свідчать, що для об'єктивної оцінки змін пероксидазної активності у рослин в умовах післядії гербіцидів необхідно враховувати як вільну, так і зв'язані фракції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Карпенко В.П. Інтенсивність процесів ліпопероксидації та стан антиоксидантних систем захисту ячменю ярого за дії гербіциду Гранстар 75 і регулятора росту рослин Емістим С / В.П. Карпенко // 36. наук. праць Уманського ДАУ. — Умань, 2009. — Вип. 72. — Ч.1. — С. 30—39.
2. Картиноїди та гліколіпіди в адаптивній відповіді рослин озимої пшениці на дію оксидного стресу / Н.Б. Светлова, О.В. Ситар, Л.М. Бацманова [та ін.] // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — Т. 39. — №2. — С. 168—173.
3. Стороженко В.О. Ключові антиоксидантні ферменти фотосинтетичного апарату вищих рослин за дії стресових чинників / В.О. Стороженко // Физиология и биохимия культурных растений. — 2004. — Т. 36. — №1. — С. 36—42.
4. Moller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I.M. Moller // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — 52. — P. 561 — 591.
5. Sairam R.K. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants / R.K. Sairam, A. Tyagi // Curr. Sci. — 2004. — 86. — P. 407—421.
6. Suzuk N. Reactive oxygen species and temperature stress: A delicate balance between signaling and destruction / N. Suzuki, R. Mittler // Physiol. Plant. — 2006. — 126. — №1. — P. 45—51.
7. Таран Н.Ю. Вторинний оксидний стрес як елемент загальної адаптивної відповіді рослин на дію несприятливих факторів довкілля / Н.Ю. Таран, О.А. Оканенко, Л.М. Бацманова, М.М. Мусієнко // Физиология и биохимия культурных растений. — 2004. — Т. 36. — №1. — С. 3—14.
8. Scandalios J.G. Oxidative stress: Molecular

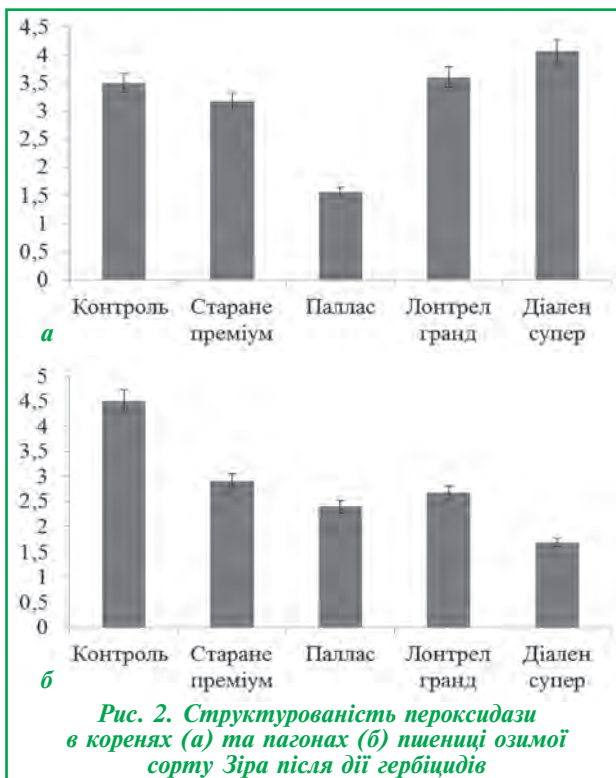


Рис. 2. Структурованість пероксидази в коренях (а) та пагонах (б) пшениці озимої сорту Зіра після дії гербіцидів

perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses / J.G. Scandalios // Braz. J. Med. And Biol. Res. — 2005. — 38. — P. 995—1014.

9. Грицаєнко З.М. Активність окисно-відновних ферментів у рослинах озимого трикале при застосуванні двокомпонентних гербіцидів без і сумісно з біостимулятором Біоаном / З.М. Грицаєнко, Р.М. Притуляк // 36. наук. пр. УДАУ. — Умань, 2008. — С. 30—35.

10. Грицаєнко З.М. Активність окисно-відновних ферментів у рослинах озимої пшениці після різних попередників при застосуванні хімічних та біологічних препаратів / З.М. Грицаєнко, І.Б. Леонтьюк // Вісник УДАУ. — Умань. — 2006. — № 1 — 2. — С. 9—13.

11. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. В.В. Кузнецова. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. — 487 с.

12. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.

13. Виноградова Е.Н. Сезонная динамика пероксидазной активности в листьях *Populus deltoids* Marsh. насаждений техногенно загрязненных территорий / Е.Н. Виноградова, И.И. Коршиков // Промышленная ботаника. — 2012. — В. 12. — С. 161—166.

14. Газарян И.Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидазы растений / И.И. Газарян, Д.М. Шушупульняк, В.И. Тишков // Успехи современной химии. — 2006. — Т. 46. — С. 303—322.

15. Veljovic-Jovanovic S. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica* / S. Veljovic-Jovanovic, B. Kukavica, B. Stevanovi // J. Exp. Bot. — 2006. — 57. — P. 1759—1768.

16. Gill S.S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S.S. Gill, N. Tuteja // Plant Physiol. Biochem. — 2010. — 48. — P. 909—930.

17. Россихина Г. Динамика пероксидного окиснения липидів і активності антиоксидант-

них ферментів у рослинах гібридної кукурудзи за гербіцидної дії / Г. Россихина // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. — 2009. — Вип. 51. — С. 243—251.

18. Ли Т.К. Антиоксидантная система в корнях двух контрастных экотипов *Sedum alfredii* при повышенных концентрациях цинка / Т.К. Ли, Л.Л. Лу, Е. Жу // Физиология растений. — 2008. — № 6. — Т. 55. — С. 886—894.

19. Shradha S. Cadmium Accumulation and Its Influence on Lipid Peroxidation and Antioxidative System in an Aquatic Plant *Vaccaria monnieri* L. / S. Shradha, E. Susan, S.F. Dsouza // Chemosphere. — 2006. — Vol. 62. — P. 233—246.

20. Ghamsari L. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting / L. Ghamsari, E. Keyhani, S. Golkhoo // Iranian Biomedical Journal. — 2007. — Vol. 11, №3. — P. 137—146.

21. Ткалич Ю.І. Післядії гербіцидів на гваякол-залежну пероксидазну систему паростків кукурудзи / Ю.І. Ткалич, В.Л. Матюха, Л.В. Богуславська // Бюлетень Інституту сільськогосподарства степової зони. — 2014. — № 7. — С. 75—80.

22. Ткалич Ю.І. Ферментативна активність проростків пшениці озимої після дії гербіцидів / Ю.І. Ткалич, В.Л. Матюха, Л.В. Богуславська, Н.Ф. Павлюкова, М.В. Задорожня // Карантин і захист рослин. — 2015. — №7. — С. 1—3.

Ткалич Ю.І., Матюха В.Л., Бокун А.І., Богуславская Л.В.

Гваякол-зависимая пероксидазная система проростков пшеницы озимой после действия гербицидов

Определена активность фракций гваякол-зависимых пероксидаз после действия гербицидов. Установлено, что большая часть фермента остается в связанном состоянии. Возможно, что более высокий уровень активности связанных с гваяколом пероксидаз в клетках корней и побегов проростков пшеницы объясняется их устойчивостью к гербицидному загрязнению.

гербициды, проростки, гваякол-зависимые пероксидазы

Tkalich Y.I., Matyukha V.L., Bokun O.I., Bohuslavskaya L.V.

Guaiacol-dependent peroxidase system of wheat seedlings after influence of herbicides

It was determined activity fraction of guaiacol-dependent peroxidases after the action of herbicides. It was established that most of the enzyme remains in bound state. Probably a higher activity level of related with the guaiacol fraction of peroxidase in the cells of the roots and shoots of wheat seedlings in some ways is explained by their resistance to herbicide pollution.

herbicides, seedlings, guaiacol-dependent peroxidases, guaiacol-dependent peroxidases

Рецензент:

Лебідь Є.М., доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН
ДУ Інституту сільськогосподарства степової зони НААН