

УДК 581.1

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ У РЕАКЦІЇ *FRAXINUS EXCELSIOR* L. НА ДІЮ НЕСПРИЯТЛИВИХ УМОВ СЕРЕДОВИЩА

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

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

Досліджені особливості функціонування основних оксидоредуктаз (СОД, пероксидази) і поліфенолоксидази (ПФО) у вегетативних органах *Fraxinus excelsior* L. в умовах дії полікомпонентних забруднювачів промислового міста у процесі онтогенезу. Встановлено, що при хронічній дії поллютантів відбувається активація досліджуваних ферментів у листках на різних етапах фенологічного циклу. При цьому активність супероксиддисмутази дослідних рослин перевищувала контроль в 1,4–1,6 разу, а пероксидази – в 1,6–3,0 разу залежно від фази розвитку і тривалості дії стресчинника. Значне збільшення активності ПФО (в 1,3–1,5 разу) свідчить про здатність даного виду знешкоджувати фенольні сполуки. Підвищення активності ферментів вказує на стійкість *Fraxinus excelsior* L. в умовах промислового міста. Виявлено наявність кореляційних зв'язків між компонентами захисної системи вегетативних органів рослин у процесі онтогенетичного розвитку.

Ключові слова: *Fraxinus excelsior* L., вегетативні органи, аеротехногенне забруднення, оксидоредуктази, супероксиддисмутаза, поліфенолоксидаза, пероксидаза.

Однією з найскладніших проблем сьогодення є атмосферне забруднення промислових міст сполуками важких металів, оксидами нітрогену та сульфуру, вуглеводнями, фенолами тощо [14, 17, 23], які, потрапляючи до рослинного організму, викликають зміни в інтенсивності морфологічних, фізіолого-біохімічних процесів і тим самим впливають на структурне та функціональне різноманіття індивідуумів [9]. За дії стресорів онтогенез рослин забезпечується винятково за рахунок активації захисних ресурсів на різних рівнях організації рослинних організмів, що зумовлює їхню адаптацію до несприятливих умов середовища [1, 7, 17]. Відомо, що у процесах формування захисних реакцій бере участь антиоксидантна ферментна система, яка забезпечує знешкодження впливу токсикантів і спрямована на реалізацію онтогенетичної програми при тривалому впливі забруднюючого чинника [10, 12]. Однією з неспецифічних стресових реакцій рослин є посилення утворення у клітинах активних форм кисню (АФК), таких як супероксиданіон, перекис водню та гідропероксиди ліпідів [7, 17], які призводять до ушкодження білків, ліпідів, нуклеїнових кислот та інших біологічних макромолекул [1, 5, 7, 14]. Нейтралізацію АФК забезпечують супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза (ПО), каталаза, а знешкодження екзогенних фенольних токсикантів – поліфенолоксидаза (ПФО).

У фітоценозах промислових міст наряду з широко розповсюдженими видами *Acer* L. використовується *Fraxinus excelsior* L., клітинні механізми стійкості якого до забруднення атмосферного повітря досліджено недостатньо. Для оцінки адаптаційної здатності ясена звичайного, з метою подальшого його використання для створення міських фітоценозів,

доцільно проводити спостереження функціонування СОД, пероксидази, ПФО протягом онтогенезу. Тому мета роботи полягала у з'ясуванні закономірностей сезонної динаміки активності антиоксидантних ферментів у листках *Fraxinus excelsior* L. за умов антропогенного забруднення.

Матеріали та методи

Тест-об'єктом було обрано один із найпоширеніших на території м. Дніпропетровська видів ясена (*Fraxinus* L.) – ясен звичайний (*Fraxinus excelsior* L.). Для визначення змін активності ферментів із дорослих рослин ясена збирали листки на території Ботанічного саду Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара (умовний контроль) і антропогенно забрудненого міського фітоценозу вихлопами легкового та вантажного транспорту (вул. Героїв Сталінграда – дослідний майданчик). Листки відбирали з однорічних пагонів із 5–10 дерев близького вікового стану на висоті 1,5–2,0 м від поверхні ґрунту, у період із травня (фаза активного росту) по серпень (фаза зупинки росту) на початку кожного місяця. Усереднену пробу для кожної ділянки формували із листків від 10 дерев одного віку.

Активність ферментів визначали у супернатантах, отриманих після центрифугування рослинних екстрактів (15 000 об./хв протягом 20 хв за +4°C), і перераховували на 1 г сирої маси зразка. Ферментативну активність СОД (КФ 1.15.1.11) визначали згідно з [2] за рівнем гальмування процесів відновлення нітросинього тетразолію (НСТ). Реакційна суміш містила 0,1 М фосфатний буфер, розчини НСТ і нікотинамідаденідинуклеотиду (НАДН), феназинметасульфату (ФМС), а також супернатант. Реакцію зупиняли додаванням оцтової кислоти, оптичну густину вимірювали при 540 нм, результати обчислювали в умовних одиницях.

Активність пероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали фотометричним методом згідно з [2] за швидкістю окиснення розчину бензидину, зміни оптичної густини реакційної суміші реєстрували при 490 нм у циклі, активність ферменту обчислювали в одиницях оптичної густини/хв.

Поліфенолоксидазну активність (КФ 1.10.3.1) вимірювали спектрофотометричним методом згідно з [2] за швидкістю окиснення поліфенілдіаміну з утворенням сполук синьо-фіолетового кольору при 420 нм протягом 10 хв. Активність ферменту обчислювали в мкмоль/хв. г сирої речовини. Статистичну обробку даних і кореляційно-регресивний аналіз здійснили за допомогою програми Microsoft Statistica 6.0, розбіжності між вибірками вважали значущими при $p < 0,05$. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Результати і їхнє обговорення

Відомо, що рослини, які ростуть на урбанізованих територіях, зазнають постійного впливу техногенного забруднення [12]. За дії поллютантів у них відбувається індукція прояву і розвиток різних компенсаторних механізмів, що сприяє відновленню порушеної рівноваги та спрямовано на підтримку гомеостазу. При цьому активуються різні метаболічні процеси за участю ферментів [11].

Специфічним ферментом, який запобігає ушкоджуючому впливу супероксидного аніон-радикала на біологічні структури, є супероксиддисмутаза, що перетворює цей радикал на пероксид водню [13]. Одержані результати вказують, що активність СОД у листках *Fraxinus excelsior* L., які ростуть в умовах дослідного майданчика, на ранніх стадіях фенологічного циклу (фаза активного росту) перевищує контроль в 1,4 разу (рис. 1). Згідно з літературними даними, це може бути пов'язано зі синтезом ферменту *de novo* або активацією його латентних форм [6, 22]. Перехід рослин до фази вторинного

росту характеризувався подальшим підвищенням активності ферменту листків порівняно з попереднім етапом в 1,4 разу для контрольної ділянки та в 1,6 разу для дослідних рослин. При цьому за дії техногенного забруднення спостерігали зростання активності СОД щодо контролю в 1,6 разу. Динаміка зміни активності супероксиддисмутази при переході від фази вторинного росту до зупинки росту у контрольних рослин мала тенденцію до збільшення цього показника порівняно з попередньою фазою в 1,5 разу. Для дослідних зразків зафіксовано зниження рівня активності СОД щодо попередньої фази в 1,6 разу. В умовах атмосферного забруднення відбувається гальмування швидкості реакції дисмутації в 1,6 разу щодо контрольних рослин.

Таким чином, вплив поллютантів змінював як рівні, так і сезонну динаміку активності супероксиддисмутази. Згідно з літературними даними [8], зниження активності СОД у кінці періоду вегетації пояснюється втратою здатності рослинної тканини знешкоджувати активні форми кисню з віком. Отримані результати узгоджуються з роботою [21], в якій відмічено, що у молодих листках ячменю активність СОД при фотоокисному стресі збільшується, а у старіючих – знижується. Аналогічна тенденція відмічена [15] у вегетативних органах *A. platanoides* порівняно з *A. pseudoplatanus* та *A. negundo*.

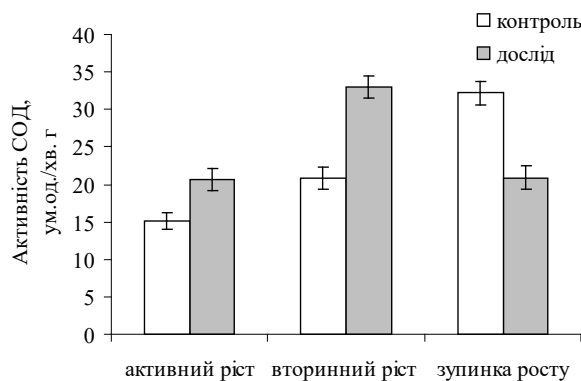


Рис. 1. Вплив аеротехногенного забруднення на активність супероксиддисмутази в листках *Fraxinus excelsior* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Відомо, що СОД не забезпечує повного захисту клітин від окисного стресу, оскільки за її дії утворюється токсичний для клітин перекис водню. Руйнування останнього здійснюється системою, яка включає пероксидазу. У реалізації адаптаційного потенціалу рослин особлива роль відводиться саме пероксидазі – поліфункціональному ферментату, який здатний реагувати на широкий спектр факторів, що призводять до порушення гомеостазу рослин. За впливу несприятливих чинників середовища цей фермент змінює свою активність, причому характер зміни його активності змінюється одночасно зі збільшенням ступеня техногенного навантаження на рослини, що дає змогу припускати їх взаємну обумовленість [11, 16].

Представлені на рис. 2 дані демонструють, що у листках *Fraxinus excelsior* із забрудненої ділянки у фазу активного росту активність пероксидази збільшена щодо контролю в 1,6 разу. При переході рослин *Fraxinus excelsior* L. до фази вторинного росту зареєстровано підвищення активності ферменту порівняно з попереднім етапом онтогенезу удвічі для контрольних рослин і в 3,8 разу для дослідних. При цьому в листках дерев із забруднених територій пероксидазна активність збільшена утричі щодо контрольних зразків. У фазу зупинки росту встановлено збільшення активності ферменту в листках ясен

звичайного контрольної ділянки в 1,5 разу порівняно з попереднім етапом. За хронічної дії антропогенних факторів цей показник знижувався в 1,2 разу. Аналіз отриманих результатів дав змогу виявити достовірне збільшення активності пероксидази в умовах забруднення на етапі зупинки росту в листках *Fraxinus excelsior* L. в 1,8 разу порівняно з контролем.

Встановлене зростання активності пероксидази у листках рослин техногенної території згідно з [20] і [19] свідчить про ефективне знешкодження даним ферментом перекису водню у клітинах цього виду. Здатність до активації пероксидази у рослинних клітинах дослідники асоціюють зі стійкістю до стресу, спричиненого забрудненням середовища промисловими викидами, у таких видів як *Populus nigra* [1], *Acer platanoides* [14], *Robinia pseudoacacia* [18].

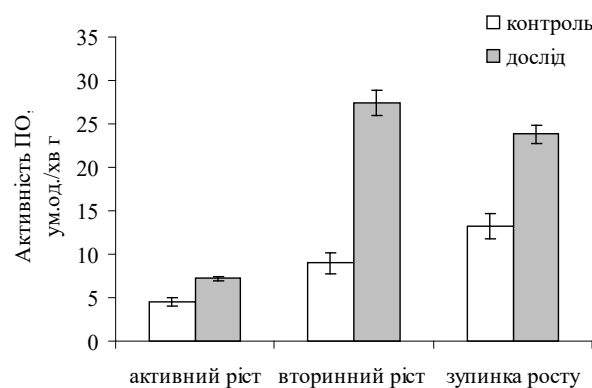


Рис. 2. Вплив аеротехногенного забруднення на активність пероксидази в листках *Fraxinus excelsior* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Важливе значення в регуляції окиснювальних процесів відводиться також ферменту поліфенолоксидазі, що бере участь у послідовних окиснювальних перетвореннях. У ряді робіт показано, що у стресових умовах (при опроміненні, механічному пошкодженні, зміні хімічного складу навколишнього середовища) активність фенолоксидаз зростає, що виявляється в утворенні хімічних бар'єрів, які перешкоджають подальшому поширенню АФК [3, 4].

Нашими дослідженнями встановлено, що активність поліфенолоксидази вегетативних органів *Fraxinus excelsior* L. за хронічної дії аеротехногенного забруднення промислового міста збільшена на всіх етапах онтогенезу. У фази активного і вторинного росту активність ферменту листків ясенів, що ростуть на дослідній ділянці, збільшена щодо контролю в 1,3–1,5 разу. Фаза зупинки росту для досліджуваних рослин *Fraxinus excelsior* характеризувалася зниженням активності ПФО порівняно з попередньою фазою в 1,8 разу. Антропогенне забруднення викликало збільшення активності ферменту в листках ясеня в 1,5 разу порівняно з контролем (рис. 3).

Відомо, що активність ПФО, однієї з термінальних оксидаз рослинної клітини, у стресових умовах середовища посилюється. Даний фермент разом з пероксидазою бере участь в окисненні фенольних сполук, які є антиоксидантами і діють як захисні компоненти рослинної клітини [12].

Наявність високої активності ферменту у вегетативних органах *Fraxinus excelsior* свідчить про достатню кількість субстрату – фенолів і сприяє знешкодженню антропогенних забруднювачів. Це, згідно з [12], дає змогу зберегти окиснювальний обмін на певному стабільному рівні та приводить до збільшення адаптивних можливостей рослинного організму.

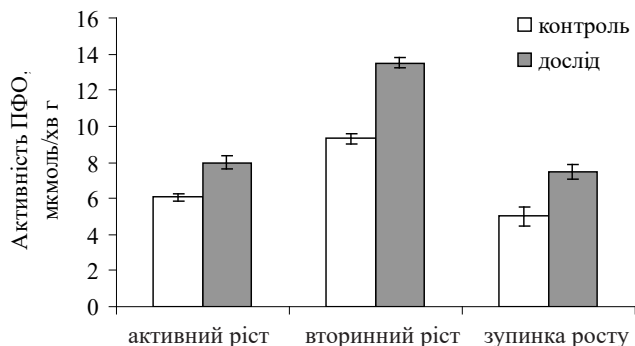


Рис. 3. Вплив аеротехногенного забруднення на активність поліфенолоксидази в листках *Fraxinus excelsior* L. у процесі онтогенезу. Похибка вибірки не перевищує 5% від середніх значень.

Методом кореляційно-регресивного аналізу встановлена достовірна кореляція активності СОД із підвищеним рівнем пероксидази та поліфенолоксидази, що свідчить про ефективність ферментів захисту і збалансованість реакції оксидоредуктаз. При цьому коефіцієнти кореляції мають високі значення ($r=0,89-0,97$) (табл. 1).

Таблиця 1

Кореляційні залежності між активністю оксидоредуктаз у листках *Fraxinus excelsior* L. в умовах аеротехногенного забруднення

Показник	СОД	Поліфенолоксидаза	Пероксидаза
СОД	–	0,94	0,89
Поліфенолоксидаза	0,94	–	0,97
Пероксидаза	0,89	0,97	–

Встановлено, що у листках *Fraxinus excelsior* L. за хронічної дії забруднювачів, які ініціюють окиснювальний стрес, виявлено активацію захисних оксидоредуктаз (супероксиддисмутази, пероксидази) і поліфенолоксидази та зміну сезонної динаміки їх активності у процесі онтогенезу. Це забезпечує певний стабільний рівень окиснювального обміну й розширює адаптивні можливості рослинного організму до несприятливих умов середовища.

Процес адаптації рослин ясен звичайного до стрес-чинників відбувається за рахунок підвищення активності СОД в 1,4–1,6 разу, пероксидази – в 1,6–3,0 разу та поліфенолоксидази – в 1,3–1,6 разу порівняно з контрольними рослинами залежно від фази розвитку і тривалості дії аерополітантів.

Встановлено наявність тісних кореляційних зв'язків між активністю оксидоредуктаз і ПФО вегетативних органів рослин у процесі онтогенетичного розвитку, які характеризують адаптивний стан рослинного організму *Fraxinus excelsior* L.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Більчук В. С., Россихіна-Галича Г. С. Зміни активності ферментів антиоксидантного захисту в вегетативних органах *Populus nigra* L. в умовах аеротехногенного забруднення середовища // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2014. Вип. 64. С. 293–299.
2. Вінниченко О. М., Лихолат Ю. В., Більчук В. С. та ін. Спецпрактикум з фізіології та біохімії рослин : навч. посіб. Дніпропетровськ: ФОП Середняк Т. К., 2014. 224 с.
3. Воскресенская О. Л. Некоторые эколого-физиологические механизмы адаптации в онтогенезе однолетних растений // Поливариантность развития организмов, популяций и сообществ / под ред. О. Л. Воскресенской. Йошкар-Ола: Изд-во МарГУ, 2006. С. 77–86.

4. Жукова Л. А., Воскресенская О. Л., Грошева Н. П. Морфологические и физиологические особенности онтогенеза календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) в посевах разной плотности // Экология. 1996. Т. 2. С. 104–110.
5. Ловинська В. М., Россихіна-Галича Г. С. Вплив *Rhizoma acerinum* на прооксидантно-антиоксидантну систему насіння кленів в умовах промислового міста // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 58. С. 280–285.
6. Калашиников Ю. Е., Закржевский Д. А., Балахнина Т. И. Действие почвенной засухи и переувлажнения на активацию кислорода и систему защиты от окислительной деструкции в корнях и листьях ячменя // Физиология растений. 1992. Т. 39. № 2. С. 259–263.
7. Колупаев Ю. Е., Карпец Ю. В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010. 352 с.
8. 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.
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. Половникова М. Г. Экофизиология стресса. Йошкар-Ола: МарГУ, 2010. 203 с.
12. 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.
13. Романова Е. В. Ферменты в антиокислительной системе растений: супероксиддисмутаза // Агро XXI. 2008. № 7. С. 27–30.
14. Россихіна-Галича Г. С. Прооксидантно-антиоксидантна рівновага насіння *Fraxinus excelsior* L. в умовах міського середовища // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 61. С. 195–200.
15. Россихіна-Галича Г. С. Роль антиоксидантних ферментів у стійкості представників роду *Acer* L. в умовах антропогенного забруднення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 60. С. 294–300.
16. Тарчевский И. А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
17. Хромих Н. О., Більчук В. С., Россихіна-Галича Г. С., Вінниченко О. М. Сезонна динаміка антиоксидантних процесів у листках *Acer Negundo* за дії поллютантів // Вісн. Дніпропетров. ун-ту. Сер. біол., екол. 2014. Вип. 22 (1). С. 71–76.
18. Хромих Н. О., Россихіна Г. С. Сезонна динаміка активності захисних ферментів у листі *Robinia pseudoacacia* за умов урбоценозів // Питання біоіндикації та екології. 2011. Вип. 16. № 1. С. 87–93.
19. Ху Ю. Ф., Лю Ж. П. Ферменты антиоксидантной защиты и физиологические характеристики двух сортов топинамбура при солевом стрессе // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 6. С. 863–868.
20. Шевякова Н. И., Стеценко Л. А., Мецнеряков А. Б. Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцированного формирования САМ // Физиология растений. 2002. Т. 49. № 5. С. 670–677.
21. Casano L. M., Martin M., Sabater B. Sensitivity to superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves // Plant Physiol. 1994. Vol. 106. P. 1033–1039.
22. Sacamoto A., Okumura T., Kaminaka H. Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for cytosolic copper/zinc-superoxid dismutase genes, SOD Cc 1 and SOD Cc 2, in rice protoplasts // Febs Lett. 1995. Vol. 258. P. 62–66.
23. Yadav S. K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants // S. Afr. J. Bot. 2010. Vol. 76. N 2. P. 167–179.

ROLE OF ANTIOXIDANTES ENZYMES IN REACTION OF *FRAXINUS EXCELSIOR* L. ON ACTION OF UNFAVOURABLE CONDITIONS OF ENVIRONMENT

V. Bilchuk, T. Legostayeva, A. Rossihina-Galicha, Yu. Samborska

Oles Honchar National University of Dnipropetrovsk

72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49010, Ukraine

e-mails: Tanyalegostaeva@mail.ru, anna-rossihina@rambler.ru

Features of functioning of the basic oxidoreductases (superoxidismutase, peroxidase) and polyphenoloxidase (PPO) in vegetative organs of *Fraxinus excelsior* L in the conditions of polycomponental pollutants action in industrial city in process of ontogenesis are investigated. It is established, that at chronic action of pollutants there is an activation of investigated enzymes in leaves at different stages of a phenological cycle. Thus activity of superoxidismutase (SOD) of experimental plants exceeded the control in 1,4–1,6 times, and peroxidase – in 1,6–3,0 times depending on a phase of development and duration of the stress-factor. Substantial growth of activity PPO (in 1,3–1,5 times) testifies to ability of the given kind to neutralise organic pollutants. Increase of activity of enzymes specifies in stability *Fraxinus excelsior* L. in the conditions of an industrial city. Presence of correlation communications between components of protective system of vegetative organs of plants in process of ontogenetical development is revealed.

Keywords: Fraxinus excelsior L., vegetative organs, aerotechnogenic contamination, oxidoreductases, superoxidismutase, peroxidase, polyphenoloxidase.

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РЕАКЦИИ *FRAXINUS EXCELSIOR* L. НА ДЕЙСТВИЕ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЙ СРЕДЫ

V. Бильчук, Т. Легостаева, А. Россихина-Галычая, Ю. Самборская

Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара

пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49010, Украина

e-mails: Tanyalegostaeva@mail.ru, anna-rossihina@rambler.ru

Установлено, что при хроническом действии поллютантов происходит активация исследуемых ферментов в листьях на разных этапах фенологического цикла. При этом активность супероксиддисмутазы опытных растений превышала контроль в 1,4–1,6 раза, а пероксидазы – в 1,6–3,0 раза в зависимости от фазы развития и продолжительности стресс-фактора. Значительное увеличение активности ПФО (в 1,3–1,5 раза) свидетельствует о способности данного вида обезвреживать органические поллютанты. Повышение активности ферментов указывает на устойчивость *Fraxinus excelsior* L. в условиях промышленного города. Выявлено наличие корреляционных связей между компонентами защитной системы вегетативных органов растений в процессе онтогенетического развития.

Ключевые слова: Fraxinus excelsior L., вегетативные органы, аэротехногенное загрязнение, оксидоредуктазы, супероксиддисмутазы, полифенолоксидаза, пероксидаза.