

Е.Н. Виноградова, И.И. Коршиков

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ *POPULUS DELTOIDES* MARSH. НАСАЖДЕНИЙ ТЕХНОГЕННО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Populus deltoides Marsh., листья, пероксидаза, техногенное загрязнение

Введение

Защитные механизмы растительного организма основаны на саморегуляции биохимических процессов, осуществляемой через изменение активности и каталитических свойств ферментных систем [6, 15]. К числу ферментов, остро реагирующих на проникновение в клетки листьев токсичных веществ, относится пероксидаза, принимающая участие во многих процессах жизнедеятельности растений [11, 17, 24, 26]. Пероксидаза способна выполнять обезвреживающую функцию по отношению к токсичным перекисным соединениям, образующимся в клетках при воздействии негативных факторов среды, что обуславливает важную роль фермента в устойчивости растений [10, 11, 12, 18, 24–26]. Уровень активности пероксидазы в органах растений часто используют для характеристики их функционального состояния в ответ на действие экстремальных факторов среды, в том числе и техногенного происхождения [22, 23, 28]. Однако активность ферментов, экстрагируемых по общепринятым методикам, без добавления веществ, повышающих ионную силу буферов, и детергентов, разрушающих ковалентные связи, определяется не полностью, преимущественно в растворимой фракции, что оправдано только для энзимов, присутствующих в клетке в одной фракции. Известно, что изоферменты пероксидазы локализируются в разных компартментах растительной клетки [3, 12, 20, 26]. В зависимости от места локализации и уровня связи с другими компонентами клетки различают несколько фракций фермента – свободную (растворимую), ионносвязанную и ковалентно связанную [16, 20, 21]. Согласно литературным данным, свободная фракция пероксидазы в основном локализована в межклеточном пространстве, цитоплазме, вакуолях и, частично, на клеточной стенке, связанные – на клеточной стенке и в мембранах [7, 21]. Разные фракции фермента обладают неодинаковой чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов среды [12, 14, 16, 26]. Наиболее высокая активность и чувствительность к действию стресса свойственна свободной и ионносвязанной фракциям [16]. Так, выявлено активирование преимущественно свободной фракции пероксидазы хрустальной травки под влиянием солей меди и цинка [14]. При действии стрессовых факторов на клетку происходят изменения её субмолекулярной организации, выражающиеся в распаде непрочных связей надмолекулярных структур, что приводит к высвобождению части упорядоченно встроенных в них белков, вследствие чего изменяется соотношение свободной и связанных форм ферментов [7]. В частности, есть информация о том, что после фумигации растений SO_2 часть связанных компонентов пероксидазы переходит в растворимую форму [12]. Возможно, подобные изменения локализации пероксидазы в растительной клетке имеют место и при действии других токсикантов. Без исследований взаимосвязи ферментов с компартментами клетки сложно получить полное представление об их роли в устойчивости растений к стрессу.

Цели и задачи исследований

Цель работы – выявить особенности сезонных изменений пероксидазной активности на основе анализа соотношения свободной и ионносвязанной фракций фермента в листьях тополя дельтовидного (канадского) (*Populus deltoides* Marsh.) насаждений в зоне воздействия выбросов крупных промышленных производств Донбасса.

Объекты и методы исследований

В ходе вегетации определяли активность свободной и ионносвязанной фракций пероксидазы в листьях 25–35-летних растений *P. deltooides* насаждений промплощадок коксохимического (КХЗ) и фенольного (ФЗ) заводов, металлургического (МК) и ртутного (РК) комбинатов. Для анализов отбирали неповреждённые листья или с незначительными повреждениями, соответствующие 0–1 баллу по шкале повреждения листьев, и листья, имеющие повреждения в 2–3 балла [13]. Следует отметить, что из-за высокой фитотоксичности эмиссий на исследуемых территориях произрастают лишь отдельные устойчивые виды древесных растений, к числу которых, прежде всего, относится *P. deltooides*. В качестве контрольных растений использовали насаждение этого вида в относительно экологически чистом районе города Донецка.

Отбор проб листьев с 8–10 растений для каждого варианта опыта осуществляли со стороны источника эмиссий, используя 3–4-ый лист однолетнего прироста боковых ветвей из средней части кроны. Выделение отдельных фракций проводили по методике Т. Т. Lee, модифицированной К. З. Гамбург с соавт. [5, 19]. Свободную фракцию пероксидазы экстрагировали из листьев 0,05 М ацетатным буфером pH 5,4. Ионносвязанную фракцию фермента экстрагировали из осадка 0,2 М ацетатным буфером с добавлением 1 М KCl. После каждого этапа экстракции надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 3500 г в рефрижераторной центрифуге. При дальнейшей обработке осадка растворами Тритона – X-100 (0,1 %) и целлюлазы (0,5 %) для солюбилизации пероксидазы, связанной гидрофобными и ковалентными связями с компартаментами клетки, не было выявлено пероксидазной активности, вероятно, это связано с тем, что данные вещества могут ингибировать активность фермента [5]. По литературным данным, активность пероксидазы этих фракций, как правило, значительно ниже, чем свободной и ионносвязанной, и не изменяется столь существенно под влиянием негативных факторов [12, 16]. Активность пероксидазы определяли с субстратом бензидином фотокалориметрически на ФЭК-56ПМ по методу Бояркина [2]. Реакционная смесь объёмом 8 мл содержала 400 мкМ ацетатного буфера (pH 5,4), 18 мкМ H₂O₂, 10 мкМ бензидина и 2 мл ферментного препарата. Выражали пероксидазную активность в относительных единицах (изменение оптической плотности за 1 сек. на 1 г сырого веса). Для оценки уровня связи фермента с мембранным матриксом использовали коэффициент структурированности (Кс), равный отношению активности ионносвязанной фракции к активности свободной. Экспериментальные данные обработаны статистически [9] с использованием электронных таблиц MS Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализируя полученные результаты, представленные в таблице, следует отметить, что активность ионносвязанной фракции пероксидазы листьев *P. deltooides* во всех вариантах опыта в несколько раз выше, чем активность свободной. В начале вегетационного периода активность свободной фракции фермента в листьях растений, испытывающих влияние техногенных эмиссий, выше, чем растений контрольного насаждения, активность ионносвязанной, напротив, ниже. Исключением является насаждение ФЗ, где активность данной фракции фермента была достоверно выше контроля как для поврежденных, так и неповрежденных листьев. Атмосферные выбросы ФЗ в основном содержат органические вещества, среди которых доминируют фенолы [13]. Поскольку фенол может быть субстратом для пероксидазы, данный факт, по всей видимости, можно объяснить реакцией активирования субстратом именно этой фракции фермента [10]. В июле выявлены тенденции повышения активности обеих фракций фермента в листьях растений контрольного насаждения и снижения – в листьях растений, испытывающих острое воздействие техногенных эмиссий.

По литературным данным, ингибирование пероксидазной активности растений может наблюдаться при высоком уровне стрессовой нагрузки, что, по всей видимости, происходит в зоне действия эмиссий крупных промышленных производств [1]. В конце вегетации активность обеих фракций фермента снижается, более существенно для контрольных растений.

Таблица. Изменение пероксидазной активности в ходе вегетации в листьях *Populus deltoides* Marsh., в различной степени повреждённых разнокачественными техногенными выбросами (в изменении оптической плотности за 1 с на 1 г сырого веса)

Место произрастания растений, состояние листьев	Июнь		Июль		Август	
	свободная фракция	ионно-связанная фракция	свободная фракция	ионно-связанная фракция	свободная фракция	ионно-связанная фракция
Фоновое загрязнение, г. Донецк	0,48±0,05	2,59±0,09	0,61±0,04	3,68±0,45	0,25±0,04	1,20±0,14
КХЗ неповреждённые повреждённые	0,55±0,04 0,78±0,04*	1,67±0,09* 1,50±0,12*	0,22±0,03* 0,25±0,05*	0,86±0,05* 0,87±0,04*	0,19±0,03 0,34±0,09	0,68±0,04* 0,84±0,05
ФЗ неповреждённые повреждённые	0,76±0,04* 0,84±0,08*	3,23±0,56* 3,13±0,48*	0,55±0,04 0,61±0,04	2,03±0,32* 2,77±0,24	0,20±0,03 0,22±0,02	1,43±0,10 1,22±0,16
МК неповреждённые повреждённые	0,91±0,04* 0,63±0,06	2,05±0,15* 1,83±0,05*	0,38±0,05* 0,41±0,022*	1,79±0,34* 1,17±0,10*	0,37±0,06 0,50±0,03*	1,33±0,08 1,29±0,32
РК неповреждённые повреждённые	0,89±0,06* 0,85±0,35*	1,62±0,48* 1,67±0,87*	0,76±0,07 0,51±0,03	1,89±0,18* 1,25±0,10*	0,48±0,04* 0,36±0,03	1,24±0,32 1,21±0,15

Примечание. * – различие со значением показателя в контроле достоверно по критерию Стьюдента при $P \leq 0,05$.

В результате этого значимых различий в активности фермента растений, испытывающих фоновый уровень загрязнения (контроль) и острое воздействие техногенных эмиссий, как правило, не наблюдается. В целом реакция пероксидазы листьев *P. deltoides* на повреждающее воздействие техногенных эмиссий достаточно гетерогенна вследствие того, что ее суммарная активность отражает неоднозначные изменения изоферментного состава и активности отдельных изоформ.

Наибольший уровень связи пероксидазы с компартментами клетки выявлен в листьях *P. deltoides* контрольного насаждения, по сравнению с растениями, испытывающими в ходе онтогенеза различный уровень техногенной нагрузки (рис.). Выявлено только одно исключение из данной закономерности – в конце вегетации для фермента из листьев растений, произраставших на территории фенольного завода, при этом максимальные значения Кс пероксидазы характерны для неповрежденных листьев.

Для других вариантов опыта уровень структурированности пероксидазы неповрежденных листьев *P. deltoides* также в большинстве случаев выше, чем фермента, выделенного из листьев растений, поврежденных эмиссиями промышленных производств. Минимальных значений Кс пероксидазы достигает в листьях растений, испытывающих в ходе онтогенеза наибольшую техногенную нагрузку, прежде всего воздействие эмиссий РК, а в конце вегетации – также КХЗ и МК.

Выявленная закономерность свидетельствует о том, что под действием техногенного стресса уровень связи пероксидазы с компартментами клетки снижается, достигая наименьших значений в наиболее поврежденных листьях. Возможными причинами может быть большая чувствительность ионно-связанной фракции фермента к стрессовому воздействию, а также, в определенной мере, высвобождение части фермента, связанного ионными связями с мембранами клетки, и переход его в свободную фракцию вследствие разрушения структуры биомембран под влиянием разнокачественных промышленных выбросов.

Согласно литературным данным, различные фракции пероксидазы имеют разный компонентный состав, наибольшая гетерогенность свойственна свободной фракции [12, 16]. Фракции фермента могут играть в клетке разную физиологическую роль. Так, свободную фракцию пероксидазы считают многофункциональным ферментом [8]. Однозначного мнения о роли ионосвязанной фракции в защитных реакциях растительной клетки в литературе нет. Данная фракция фермента принимает участие в процессах лигнификации клеточных стенок и специфических механизмах утилизации пероксида водорода. В частности, выявлена корреляция между увеличением содержания H_2O_2 и снижением активности ионосвязанной фракции пероксидазы при инфицировании и старении пшеницы сорта «Диамант» [16]. В то же время ионосвязанная фракция, возможно, причастна к генерированию активных форм кислорода, которые могут быть сигнальными мессенджерами, индуцирующими защитные реакции клетки [8, 27]. Исходный уровень структурированности, т.е. доли связанных фракций пероксидазы в клетках листьев растений, по всей видимости, видоспецифичен, зависит от особенностей метаболизма конкретного вида.

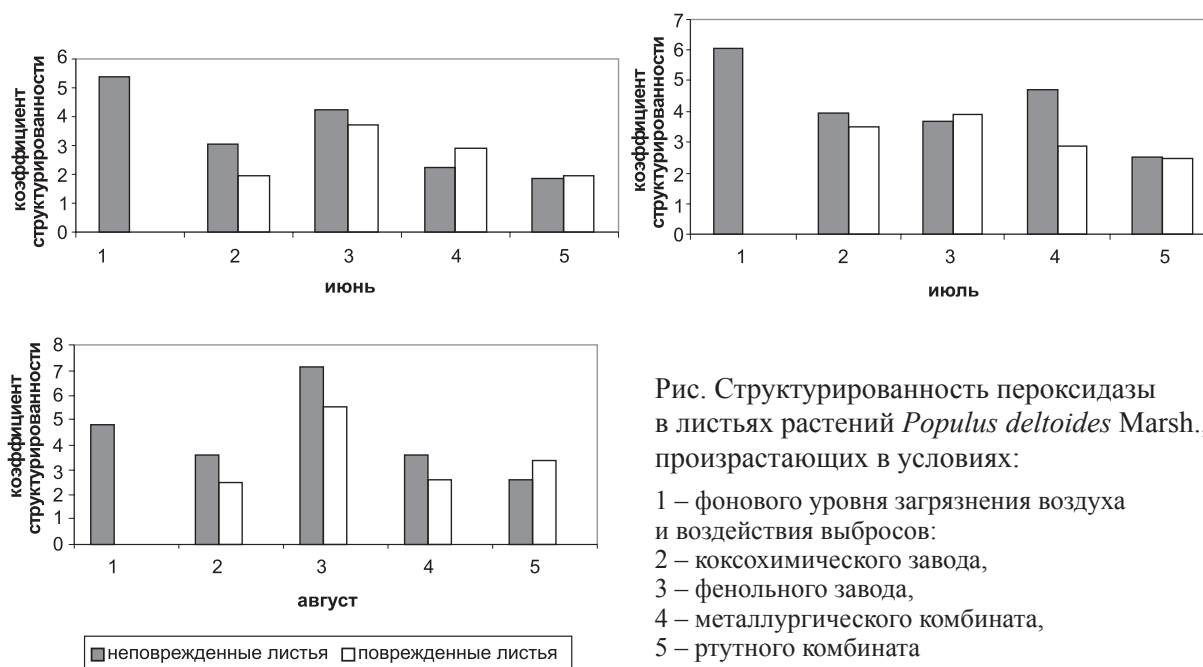


Рис. Структурированность пероксидазы в листьях растений *Populus deltoides* Marsh., произрастающих в условиях:

- 1 – фонового уровня загрязнения воздуха и воздействия выбросов;
- 2 – коксохимического завода,
- 3 – фенольного завода,
- 4 – металлургического комбината,
- 5 – ртутного комбината

Заключение

В листьях растений *P. deltoides* активность ионосвязанной фракции пероксидазы в несколько раз выше активности свободной. Стрессовое воздействие эмиссий крупных промышленных производств вызывает изменение соотношения фракций фермента. Полученные данные свидетельствуют о том, что для объективной оценки изменения пероксидазной активности в листьях растений в условиях стресса важно учитывать, наравне со свободной, и связанные фракции фермента.

1. Влияние кадмия на CO–газообмен, переменную флуоресценцию хлорофилла и уровень антиоксидантных ферментов в листьях гороха / [Т.И. Балахнина, А.А. Кособрюхов, А.А. Иванов, В.Д. Креславский] // Физиол. раст. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 21–26.
2. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. : Учеб. пособие / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, А.М. Хандобина. – М. : Высш. шк., 1975. – 391 с.
3. Газарян И.Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И.Г. Газарян, Д.М. Шушпуляян, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.

4. Галибина Н.А. Функциональная активность клеточной стенки хвои сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения / Н.А. Галибина, Е.Н. Терехова // *Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: мат. Всерос. науч. конф. в рамках XII съезда Русского ботан. об-ва. Часть 6.* (г. Петрозаводск, 22 – 27 сент. 2008 г). – Петрозаводск, 2008. – С. 29 – 31.
5. Гамбург К.З. Изучение активности пероксидазы и ИУК-оксидазы в суспензионных культурах тканей табака и сои / К.З. Гамбург, Л.А. Подолькина, В.М. Ситнева // *Физиол. раст.* – 1977. – Т. 24, № 3. – С. 542–548.
6. Калинин Ф.Л. Химическая регуляция метаболизма, роста и продуктивности растений / Ф.Л. Калинин // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 1996. – Т. 28, № 3. – С. 123–140.
7. Колупаев Ю.С. Стресові реакції рослин: Молекулярно-клітинний рівень / Юрій Євгенович Колупаєв. – Харків : Харківський держ. аграрний ун-т ім. В.В. Докучаєва, 2001. – 173 с.
8. Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений / Ю.Е. Колупаев // *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія.* – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24–41.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учеб. пособие для биологич. спец. вузов. – 3-е изд., перераб. и доп. / Георгий Филиппович Лакин. – М.: Высш. шк. – 1980. – 293 с.
10. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / [Г.И. Квеситадзе, Г.А. Хатисашвили, Т.А. Садунишвили, З.Г. Евстигнеева]. – М.: Наука. – 2005. – 199 с.
11. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / Василий Васильевич Рогожин. – С./Пб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
12. Сарсенбаев К.Н. Роль ферментов в устойчивости растений / К.Н. Сарсенбаев, Ф.А. Полимбетова; отв. ред. И.Р. Рахимбаев. – Алма-Ата: Наука Казах. ССР, 1986. – 180 с.
13. Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей / [В.П. Тарабрин, Е.Н. Кондратюк, В.Г. Башкатов и др.]. – Киев: Наук. думка, 1986. – 216 с.
14. Холодова В.П. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации / В.П. Холодова, К.С. Волков, В.В. Кузнецов // *Физиология растений.* – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 848–858.
15. Хочачка П. Стратегия биохимической адаптации / П. Хочачка, Дж. Сомеро; пер. с англ. Ю.И. Лашкевича под ред. и с пред. Е.М. Крепса. – М.: Мир. – 1988. – 586 с.
16. Юсупова З.Р. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk. / З.Р. Юсупова, Р.М. Аруллин, И.В. Максимов // *Физиол. раст.* – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 910–917.
17. Djakovic T. The role of cell wall peroxidase in the inhibition of leaf and fruit growth / T. Djakovic, Z. Jovanovic // *Bulg. J. Plant Physiol.* – Special issue 2003: Proceedings of the European Workshop on environmental Stress and sustainable Agriculture. – 7–12 September 2002. – Varna, Bulgaria. – P. 264–272.
18. Larson R. Plant defenses against oxidative stress / Richard Larson // *Arch. Insect Biochem. and Physiol.* – 1995. – Vol. 29, № 2. – P. 175–186.
19. Lee T.T. On extraction and guatitation of plant peroxidase isoenzymes / T.T. Lee // *Physiol. plant.* – 1973. – Vol. 29, № 2. – P. 198–203.
20. Lee T.M. Changes in soluble and cell wall bound peroxidase activities with growth anoxiatreated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots / T.M. Lee, Y.H. Lin // *Plant Sci.* – 1995. – Vol. 106. – P. 1–7.
21. Mader M. Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zell-Wander von *Nicotiana tabacum* L. / M. Mader, Y. Meyer, M. Bopp. – *Planta.* – 1975, Vol. 122, № 3 – P. 259–268.
22. MacFarlena G.R. Leaf biochemical parameters in *Avicennia marina* (Forsk) Vierh as potential biomarkers of heavy metal stress in estuarine ecosystems / G.R. MacFarlena // *Mar. Pollut. Bull.* – 2002. – Vol. 44, № 3. – P. 244–256.
23. Nashikkar V.J. Catalase and peroxidase activity in plants – an indicator of heavy metal toxicity / V. J. Nashikkar, T. Chakrabarti // *Indian J. Exp. Biol.* – 1994. – Vol. 32, № 7. – P. 520–521.
24. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife / [F. Passardi, C. Cosio, C. Penel, C. Dunandi] // *Plant Cell Reports.* – 2005. – Vol. 24, № 5. – P. 255–265.
25. Scandalios J. G. Oxidative Stress: Molecular Perception and Transduction of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses / J. G. Scandalios // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* – 2005. – Vol. 38, № 7. – P. 995–1014.
26. Siegel B.Z. Plant peroxidase – an organismus perspective / B.Z. Siegel // *Plant Growth Regul.* – 1993. – Vol. 12, № 3. – P. 303–312.
27. Shannon L.M. Plant Isoenzymes / L.M. Shannon // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1986. – Vol. 5. – P. 187–200.
28. Stress Markers in Chlorsulphuron Tolerant Transgenic Tobacco Plants / V. Kapchina-Toteva, S. Slavov, R. Batchvarova [et al.] // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 30, № 1 – 2. – P. 89–103.

УДК 581.17+19:632.15(477.60)

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ
POPULUS DELTOIDES MARSH. НАСАЖДЕНИЙ ТЕХНОГЕННО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ
Е.Н. Виноградова, И.И. Коршиков

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Изучена динамика в течение вегетационного периода активности свободной и ионносвязанной фракций пероксидазы в клетках листьев растений *P. deltoides*, произрастающих в условиях влияния разнокачественных промышленных эмиссий. Выявлено, что активность ионносвязанной фракции фермента значительно выше, чем свободной. В ходе вегетации *P. deltoides* обнаружено снижение пероксидазной активности. Эмиссии вызывают изменение соотношения ионносвязанной и свободной фракций фермента в листьях.

UDC 581.17+19:632.15(477.60)

SEASONAL DYNAMICS OF PEROXIDASE ACTIVITY IN LEAVES OF *POPULUS DELTOIDES* MARSH.,
GROWING IN PLANTATIONS OF THE TECHNOGENOUS POLLUTED AREAS
Ye.N. Vinogradova, I.I. Korshikov

Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine

The dynamics during a vegetative period of the activity of free and ion-combined fractions of peroxidase in *P. deltoides* leaf cells has been studied in plants growing under the effect of different quality industrial emissions. The study has shown that the activity of an ion-combined fraction of this enzyme was significantly higher than that of a free one. During a growing season, we have found the decrease in *P. deltoides* peroxidase activity. Emissions caused changes in correlation of an ion-combined and free fraction of this enzyme in leaves.