

Е.Н. Виноградова

АКТИВНОСТЬ СВОБОДНОЙ И ИОННОСВЯЗАННОЙ ФРАКЦИЙ ПЕРОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ *POPULUS BOLLEANA* LOUCHE НАСАЖДЕНИЙ КРУПНОГО ИНДУСТРИАЛЬНОГО ГОРОДА

Populus bolleana Louche, листья, пероксидаза, техногенное загрязнение

Введение

Для скрининга функционального состояния растений в условиях воздействия экстремальных факторов среды часто используют уровень активности пероксидаз, ключевых антиоксидантных ферментов с широкой субстратной специфичностью, принимающих участие во многих процессах жизнедеятельности растений [10, 12, 20–22]. В настоящее время пероксидазы делят на основе гомологии аминокислотных последовательностей и особенностей посттрансляционной модификации на 3 класса: I класс включает аскорбатпероксидазу, II – секреторные пероксидазы, III – так называемые классические пероксидазы растений [6, 19]. В зависимости от субстратной специфичности различают аскорбатпероксидазу (КФ.1.11.1.11) и глутатионпероксидазу (КФ.1.11.1.9), восстанавливающие пероксид водорода в клетке за счет окисления, соответственно, аскорбиновой кислоты и глутатиона, и гваяколпероксидазу (КФ.1.11.1.7), использующую для нейтрализации пероксида водорода фенольные соединения [11]. Изоферменты пероксидаз присутствуют в разных компартаментах растительной клетки, в зависимости от уровня связи с которыми различают свободную, ионносвязанную и ковалентносвязанную фракции [11, 14, 16, 21]. Свободная фракция локализована преимущественно в межклеточном пространстве, цитоплазме, вакуолях и, частично, на клеточной стенке, связанные – на клеточной стенке и в мембранах [7]. Свободная и связанные фракции пероксидазы выполняют в клетке различные физиологические функции. Свободная форма фермента многофункциональна, ионносвязанная принимает участие в детоксикации пероксида водорода, однако может и генерировать активные формы кислорода, выполняя обратную реакцию [17, 21]. Под влиянием стресса может происходить увеличение фонда свободных форм фермента за счет их перехода из связанного состояния [24]. Ранее выявлено, что в листьях *Acer pseudoplatanus* L., *Fraxinus lanceolata* Borkh. и *Populus deltoides* Marsh. под воздействием техногенных эмиссий наблюдается увеличение доли свободной фракции и снижение – ионносвязанной в суммарной пероксидазной активности [2, 3]. Возможно, аналогичные изменения локализации пероксидазы в клетке в условиях техногенного загрязнения характерны и для других видов древесных растений. Анализ соотношения фракций пероксидазы в растительной клетке актуален в связи с тем, что при экстракции фермента по общепринятым методикам, без добавления веществ, повышающих ионную силу буферных растворов, ионносвязанная фракция остается неучтенной.

Цели и задачи исследований

Цель работы – выявить особенности изменения пероксидазной активности на основе анализа соотношения свободной и ионносвязанной фракций фермента в листьях *Populus bolleana* Louche (тополя Болле) насаждений крупного индустриального города Донбасса.

Объекты и методы исследований

В начале сентября определяли активность свободной и ионносвязанной фракций гваяколпероксидазы в листьях растений *P. bolleana* близкого возраста (20–25 лет), произрастающих на территории города Макеевки в районах с различной техногенной нагрузкой: промплощадки металлургического, цементного и коксохимического заводов, автовокзал, автозаправочная станция, городской проспект с интенсивным движением автотранспорта и центральная административная часть города. Негативное воздействие эмиссий усиливается неблагоприятными климатическими

факторами, в частности, недостаточным количеством осадков и резкими перепадами температур. В качестве контрольных растений использовали насаждение *P. bolleana* относительно экологически чистой сельской местности на расстоянии 30 км от города. Выбор объекта исследований обусловлен достаточно широкой распространенностью данного вида в насаждениях промышленных городов Донбасса, а также его низкой генетической изменчивостью вследствие вегетативного размножения. Следует также отметить, что растения *P. bolleana* характеризуются высоким фитоэкстракционным потенциалом по отношению к таким распространенным поллютантам урбанизированной городской среды, как тяжелые металлы, т.е. могут накапливать значительное их количество без видимого нарушения жизненного состояния [9]. Авторы объясняют данный факт низким уровнем свободнорадикальных процессов в клетках, что может быть связано с повышенной интенсивностью функционирования антиоксидантных систем.

Отбор проб листьев с 5–7 растений для каждого варианта опыта осуществляли со стороны источника эмиссий, используя 3–4 листа однолетнего прироста боковых ветвей. Экстракцию отдельных фракций пероксидазы проводили по ранее описанной методике [3]. Активность гваяколпероксидазы определяли с субстратом гваяколом спектрофотометрически на «Specol-11» [6]. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала 48 мкМ фосфатного буфера (рН 6,2), 22 мкМ H_2O_2 , 25 мкМ гваякола и 200 мкл ферментного препарата. Выражали пероксидазную активность в микромолях окисленного субстрата (тетрагваякола) за 1 мин на 1 мг белка. Для оценки уровня связи фермента с мембранным матриксом использовали коэффициент структурированности (Кс), равный отношению активности ионносвязанной фракции к активности свободной. Экспериментальные данные обработаны статистически по Г.Ф. Лакину [8] в среде пакета Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализируя полученные результаты, представленные в таблице, следует отметить, что для городских насаждений *P. bolleana* характерны более высокие, по сравнению с контролем, значения активности свободной фракции пероксидазы, за исключением растений, подверженных воздействию эмиссий коксохимического завода, у которых выявлены минимальные значения активности этой фракции фермента. Активность ионносвязанной фракции, напротив, у растений урбанизированных территорий ниже, чем в относительно экологически чистой местности, а минимальные значения, как и в случае свободной фракции, характерны для насаждений коксохимического завода.

Таблица. Значения пероксидазной активности в листьях растений *Populus bolleana* Louche, произрастающих на территории крупного индустриального города под воздействием разнокачественных эмиссий

Место произрастания растений	Свободная фракция		Ионносвязанная фракция	
	мкМ тетрагваякола за 1 мин на 1 мг белка	% от суммарной активности	мкМ тетрагваякола за 1 мин на 1 мг белка	% от суммарной активности
Загородная зона (контроль)	12,05 ± 0,61	24,45	37,24 ± 2,53	75,55
Центральный административный район	17,21 ± 1,82*	35,76	30,91 ± 2,01	64,24
Металлургический комбинат	14,46 ± 0,42*	34,37	27,61 ± 2,31*	65,63
Коксохимический завод	9,75 ± 0,68	45,97	11,46 ± 1,35*	54,03
Цементный завод	19,97 ± 1,79*	45,42	24,00 ± 1,13*	54,58
Автовокзал	16,76 ± 0,23*	42,36	22,81 ± 0,34*	57,64
Городской проспект	16,51 ± 0,68*	42,92	21,95 ± 1,42*	57,08
Автозаправочная станция	20,03 ± 2,01*	36,66	34,61 ± 1,62	63,34

Пр и м е ч а н и е. * – различие со значением показателя в контроле достоверно по критерию Стьюдента при $P \leq 0,05$

Активирование пероксидазы отмечается в научных публикациях достаточно часто и рассматривается в качестве адаптивной реакции растительного организма на действие экстремальных факторов среды [10, 12, 23]. Поллютанты, как и другие стрессоры, способствуют образованию активных форм кислорода, нарушающих нормальное функционирование клетки, вызывая разрушение хлоропластов, белков, ДНК, перекисное окисление липидов [18, 22]. Для устранения повреждающего действия оксидантов во всех растительных клетках присутствует защитная система, состоящая из антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидаз, монодигидроаскорбатредуктазы и глутатионредуктазы) и низкомолекулярных соединений (аскорбиновой кислоты, фенолов, глутатиона, каротиноидов и др.) [7, 10, 11, 15, 18, 22]. Наиболее эффективной является ферментативная система антиоксидантной защиты [24].

Пероксидаза, наряду с каталазой, осуществляет утилизацию пероксида водорода, образующегося при нейтрализации супероксидного анион-радикала супероксиддисмутазой [10, 21]. Учитывая низкое сродство каталазы к пероксиду водорода, активирование пероксидазы является достаточно важной характеристикой состояния антиоксидантной системы растений в условиях загрязнения среды [10]. Однако при высоком уровне стрессовой нагрузки может наблюдаться, напротив, ингибирование пероксидазной активности [4]. Коксохимическое производство относится к наиболее токсичным на территории Донбасса [1]. Возможно, именно высокая фитотоксичность эмиссий коксохимического завода является причиной того, что в зоне их воздействия в листьях *P. bolleana* выявлена минимальная активность обеих фракций пероксидазы.

Тот факт, что наряду со стресс-индуцированным активированием свободной фракции пероксидазы, выявлено снижение активности ионносвязанной формы фермента *P. bolleana* с урбанизированных территорий по отношению к контрольным растениям (см. табл.), может свидетельствовать о большей чувствительности данной формы фермента к воздействию поллютантов. Согласно научным публикациям, разные фракции пероксидазы обладают различной чувствительностью к экстремальным воздействиям [13, 14, 23].

Максимальное значение доли ионносвязанной фракции (76 % от суммарной активности) выявлено для фермента из листьев растений *P. bolleana* экологически чистой загородной зоны (см. табл.). Для всех исследуемых городских насаждений доля ионносвязанной фракции в суммарной активности фермента на 10–20 % ниже. Соответственно, наибольший уровень связи пероксидазы с мембранным матриксом ($K_c = 3,09$) характерен для контрольных растений, у фермента растений городских насаждений он значительно ниже ($K_c = 1,18–1,91$) (рис.).

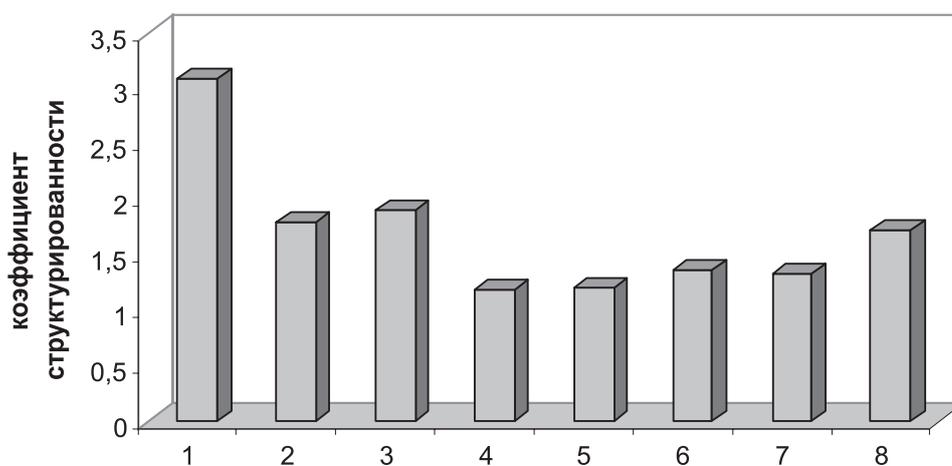


Рис. Структурированность пероксидазы в листьях растений *Populus bolleana* Louche:

- 1 – контроль (загородная зона); 2 – центральный административный район индустриального города;
3 – металлургический комбинат; 4 – коксохимический завод; 5 – цементный завод; 6 – автовокзал;
7 – проспект с интенсивным движением; 8 – автозаправочная станция

Минимальных значений коэффициент структурированности пероксидазы достигает в листьях растений, испытывающих в ходе онтогенеза влияние эмиссий цементного и коксохимического заводов. Наряду с большей чувствительностью ионносвязанной фракции фермента к экстремальным воздействиям, более низкий, по сравнению с контролем, уровень связи пероксидазы с мембранным матриксом в листьях *P. bolleana* насаждений в условиях урбанизации, вероятно, объясняется высвобождением части фермента, связанного ионными связями с мембранами клетки, и переходом его в свободную фракцию вследствие разрушения структуры мембран в условиях стресса.

Заключение

Значительная часть гваяколпероксидазы листьев *P. bolleana* имеет ионные связи с компартаментами клетки. У городских насаждений активность свободной фракции фермента выше, а ионносвязанной – ниже по сравнению с растениями относительно экологически чистой зоны. Поскольку высокий конститутивный уровень ионносвязанной фракции пероксидазы, а также изменение соотношения свободной и ионносвязанной форм фермента под влиянием поллютантов выявлены и в листьях исследованных нами ранее видов *Fraxinus lanceolata*, *Acer pseudoplatanus* и *Populus deltoides* [2, 3], можно предположить, что описанные закономерности достаточно широко распространены у древесных растений. В этой связи необходим критический подход к научным результатам, полученным только на свободной фракции пероксидазы, как недостаточно объективным, в определенной степени отражающим изменение уровня связи фермента с мембранным матриксом в результате влияния стрессового фактора.

1. **Взаимодействие** растений с техногенно загрязнённой средой / [И.И. Коршиков, В.С. Котов, И.П. Михеенко и др.]. – Киев: Наук. думка. – 1995. – 190 с.
Korshikov, I.I., Kotov, V.S., and Mikheenko, I.P., *Vzaimodeistvie rastenii s tekhnogenno zagryaznennoi sredoi* (Plant Interaction with Technogenous Polluted Environments), Kiev: Naukova Dumka, 1995.
2. **Виноградова Е.Н.** Пероксидазная активность в клетках листьев древесных растений в связи с их устойчивостью к выбросам коксохимического предприятия / Е.Н. Виноградова // Промышленная ботаника. – 2006. – Вып. 6. – С. 35–40.
Vinogradova, Ye.N., Peroxidase Activity in the Cells of Woody Plant Leaves in Relation to Their Resistance to Coke-Chemical Plant Emissions, *Prom. bot. (Industrial Botany)*, 2006, vol. 6, pp. 35–40.
3. **Виноградова Е.Н.** Сезонная динамика пероксидазной активности в листьях *Populus deltoides* Marsh. насаждений техногенно загрязненных территорий / Е.Н. Виноградова, И.И. Коршиков // Промышленная ботаника. – 2012. – Вып. 12. – С. 161–166.
Vinogradova, Ye.N., and Korshikov, I.I., Seasonal Dynamics of Peroxidase Activity in Leaves of *Populus deltoides* Marsh. Growing in Plantations of the Technogenous Polluted Areas, *Prom. bot. (Industrial botany)*, 2012, vol. 12, pp. 161–166.
4. **Влияние** кадмия на СО-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.
Balakhnina, T.I., Kosobryukhov, A.A., Ivanov, A.A., and Kreslavskii, V.D., Cadmium Effects on the CO Gas Exchange, Variable Chlorophyll Fluorescence and Antioxidant Enzyme Levels in Pea Leaves, *Fiziologiya rastenii* (Plant Physiology), 2005, vol. 52, no. 1, pp. 21–26.
5. **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.
Gavrilenko, V.F., Ladygina, M.E., and Khandobina, A.M., *Bolshoi praktikum po fiziologii rastenii. Fotosintez. Dykhanie. (ucheb.posobie)* (A Large Laboratory Course in Plant Physiology. Photosynthesis. Breathing. A Handbook), Moscow: Vysshaya Shkola, 1975.
6. **Газарян И.Г.** Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И.Г. Газарян, Д.М. Шушпулян, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
Gazarian, I.G., Shushpulyan, D.M., and Tishkov, V.I., Specific Features of Plant Peroxidases Structure and Mechanism of Their Action, *Uspekhi biologicheskoi khimii* (The Advances in Biological Chemistry), 2006, vol. 46, pp. 303–322.
7. **Колупасв Ю.С.** Стресові реакції рослин: Молекулярно-клітинний рівень / Юрій Євгенович Колупасв. – Харків: Харків. держ. аграрний ун-т ім. В.В. Докучаєва, 2001. – 173 с.

- Kolupaev, Yu.Ye.**, *Stresovi reaktsii roslyn: Molekulyarno-klitinnyi riven* (Stress Reactions in Plants: Molecular-Cell Level), Kharkiv: Kharkiv. derzh. agr. un-t im. V.V. Dokuchaeva (Kharkiv V.V. Dokuchaev State Agrarian Univ.), 2001.
8. **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.
Lakin, G.F., *Biometriya*. (Biometrics), 3rd Rev. Ed., Moscow: Vysshaya Shkola, 1980.
 9. **Піскова О.М.** Оцінка впливу промислового забруднення на процеси пероксидації в листках деревних рослин / О.М. Піскова, В.М. Гришко // *Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку* / [НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр. т-во фізіологів рослин; голов. ред. В.В. Моргун]. – К.: Логос, 2009. – Т. 2. – С. 299–305.
Piskova, O.M., and Grishko, V.M., The Evaluation of Industrial Pollution Effect on Peroxidation Processes in Woody Plant Leaves, *Fiziologiya roslyn: problemy ta perspektyvy rozvitku* (Plant Physiology: the Problems and Development Prospects), *NAN Ukrainy, In-t fiziologii roslyn i genetiki, Ukr. t-vo fiziologiv roslyn* (National Academy of Sciences of Ukraine, Institute for Plant Physiology and Genetics, Ukrainian Society of Plant Physiologists and Geneticists, Morgun, V.V., Ed., Kiev: Logos, 2009, vol. 2, pp. 299–305.
 10. **Рогожин В.В.** Peroxidaza kak komponent antioksidantnoi sistemy zhivykh organizmov / Василий Васильевич Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
Rogozhin, V.V., *Peroxidaza kak component antioksidantnoi sistemy zhivykh organizmov* (Peroxidase as a Component of the Antioxidant System of Living Organisms), St. Petersburg: GIORД, 2004.
 11. **Сравнительный** анализ активности компонентов антиоксидантной системы древесных растений в условиях техногенного стресса / [А.Р. Гарифзянов, С.В. Горелова, В.В. Иванищев, Е.Н. Музафаров] // *Известия Тульского гос. ун-та. Естественные науки.* – 2009. – С. 45–48.
Garifzyanov, A.R., Gorelova, S.V., Ivanishchev, V.V., and Muzafarov, Ye.N., Comparative Analysis of the Antioxidant System Activity in Woody Plants Under the Anthropogenic Stress Conditions, *Izvestiya Tul'skogo gos. un-ta* (Proceedings of the Tula State Univ. Nature Science), 2009, pp. 45–48.
 12. **Тарчевский И.А.** Сигнальные системы клеток растений / Игорь Анатольевич Тарчевский. – М.: Наука. – 2002. – 294 с.
Tarchevskii, I.A., *Signalnye sistemy kletok rastenii* (Signaling Systems of Plant Cells), Moscow: Nauka, 2002.
 13. **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 // *Физиол. раст.* – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 848–858.
Kholodova, V.P., Volkov, K.S., and Kuznetsov, V.V., Adaptation of Ice Plant to High Concentrations of Copper and Zinc Salts and the Prospects of These Plants Use in Phytoremediation, *Fiziologiya rastenii* (Plant Physiology), 2005, vol. 52, no. 6., pp. 848–858.
 14. **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.
Yusupov, Z.R., Arullin, R.M., and Maksimov, I.V., Peroxidase Activity in Various Cell Fractions of Wheat Infected with *Septoria nodorum* Berk., *Fiziologiya rastenii* (Plant Physiology), 2006, vol. 53, no. 6, pp. 910–917.
 15. **Blokhina, O.**, Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V., Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review, *Ann. Bot.*, 2003, vol. 91, pp. 179–194.
 16. **Lee, T.M.**, and Lin, Y.H., Changes in Soluble and Cell Wall Bound Peroxidase Activities with Growth Anoxiatreated Rice (*Oryza sativa* L.) Coleoptiles and Roots, *Plant Sci.*, 1995, vol. 106, pp. 1–7.
 17. **Minibayeva, F.**, Kolesnikov, O., and Chasov, A., Wound-Induced Apoplastic Peroxidase Activities: Their Roles in the Production and Detoxification of Reactive Oxygen Species, *Plant Cell Envir.*, 2009, vol. 32, pp. 497–508.
 18. **Mittler, R.**, Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends in Plant Science*, 2009, vol. 32, pp. 497–508.
 19. **Molecular** Analysis of Class III Peroxidases from Cotton, Delannou, E., Marmey, P., and Jalloul, A., *J. Cotton Sci.*, 2006, vol. 10, no. 1, pp. 53–60.
 20. **Nashikkar, V.J.**, and Chakrabarti, T., Catalase and Peroxidase Activity in Plants – an Indicator of Heavy Metal Toxicity, *Indian J. Exp. Biol.*, 1994, vol. 32, no. 7, pp. 520–521.
 21. **Peroxidases** Have More Functions Than a Swiss Army Knife, Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., and Dunandi, C., *Plant Cell Reports*, 2005, vol. 24, no. 5, pp. 255–265.
 22. **Scandalios, J.G.**, Oxidative Stress: Molecular Perception and Transduction of Signals Triggering Antioxidant Gene Defenses, *Braz. J. Med. and Biol. Res.*, 2005, vol. 38, no. 7, pp. 995–1014.

23. Siegel, B.Z., Plant Peroxidase – an Organismus Perspective, *Plant Growth Regul.*, 1993, vol. 12, no. 3, pp. 303–312.
24. Zhang, J., Drought-Stress Induced Changes in Activities of Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase in Wheat Species, *Plant Cell Physiol.*, 1994, vol. 35, pp. 785–791.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Получено 18.07.2013

УДК 581.17:581.19:581.52(477.60)

АКТИВНІСТЬ ВІЛЬНОЇ ТА ІОНОВ'ЯЗАНОЇ ФРАКЦІЙ ПЕРОКСИДАЗИ В ЛИСТКАХ
POPULUS BOLLEANA LOUCHE НАСАДЖЕНЬ ВЕЛИКОГО ІНДУСТРІАЛЬНОГО МІСТА
О.М. Виноградова

Донецький ботанічний сад НАН України

Досліджено вільну та іонозв'язану фракції пероксидази листків рослин *P. bolleana*, що зростають за умов великого індустриального міста. Відзначено, що конститутивний рівень активності іонозв'язаної фракції ферменту значно вищий, ніж вільної. Техногенне забруднення призводить до підвищення у міських рослин активності вільної фракції та зниження – іонозв'язаної. Обґрунтовується необхідність дослідження за умов стресу, поряд із вільною, іонозв'язаної фракції пероксидази рослин.

UDC 581.17:581.19:581.52(477.60)

ACTIVITY OF THE FREE AND ION-COMBINED FRACTIONS OF PEROXIDASE
IN *POPULUS BOLLEANA* LOUCHE LEAVES IN URBAN STANDS
O.M. Vinogradova

Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine

The free and ion-combined fractions of peroxidase were studied in *P. bolleana* leaves sampled in urban stands. The constitutional activity level of this enzyme ion-combined fraction is noted to be significantly higher than that of a free one. Industrial pollution causes the increased activity of the free fraction and decreased activity of the ion-combined one in urban trees. There is a clear need for research on ion-combined peroxidase fraction along with a free one in plants under stress conditions.