

Е. Н. Виноградова

ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ *FRAXINUS LANCEOLATA* BORKH. И *ACER PSEUDOPLATANUS* L. В СВЯЗИ С ИХ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ВЫБРОСАМ КОКСОХИМИЧЕСКОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

ясень зеленый, клен ложноплатановый, листья, пероксидаза, промышленные токсиканты

При адаптации растений к условиям техногенной среды на уровне регуляции ферментативных процессов в клетке имеют место изменения как в интенсивности работы уже имеющихся молекул фермента, так и в соотношении деградации и синтеза новых молекул. Наряду с этим, изменения ферментативной активности могут быть обусловлены и другими причинами, в частности, изменением локализации фермента в клетке. Если этот факт не учитывать в исследовательской работе, то это может привести к ошибочным выводам об уровне изменения ферментативной активности. Активность ферментов, экстрагируемых по общепринятым методикам, часто определяется не полностью, что оправдано только для ферментов, присутствующих в клетке в одной фракции. Однако, после извлечения многих ферментов буфером со слабой ионной силой (свободная фракция), можно ещё извлечь значительное его количество, используя буферы с повышенной ионной силой (ионно-связанная фракция) и детергенты, разрушающие ковалентные связи (ковалентно-связанная фракция) [3, 8]. Рядом биофизических методов показано, что при действии супероптимального фактора на клетку происходят изменения её субмолекулярной организации, выражающиеся прежде всего в разрыве непрочных связей, цементирующих надмолекулярные структуры – липопротеидные комплексы биомембран. Поскольку в биомембраны упорядоченно встроены многие ферменты, нарушение структуры мембран приводит к их высвобождению [1]. Таким образом, при воздействии стрессового фактора изменяется экстрагируемость белков, что может привести к «кажущемуся» изменению активности фермента. В этой связи представляет интерес изучение активности пероксидазного комплекса, играющего значительную роль в адаптивных реакциях растений, на неблагоприятные воздействия [6, 7].

Целью данной работы было изучение соотношения свободной и связанной фракций пероксидазы в клетках листьев древесных растений в связи с их устойчивостью к выбросам коксохимического производства.

Объектами исследования служили древесные растения, часто используемые для озеленения промышленных предприятий Донбасса и при этом чётко различающиеся по газоустойчивости: ясень зелёный (*Fraxinus lanceolata* Borkh.) и клён ложноплатановый (*Acer pseudoplatanus* L.), произраставшие на территории Донецкого ботанического сада и Авдеевского коксохимического завода. У растений *F. lanceolata*, одного из самых чувствительных к техногенным выбросам, особенно к органическим токсикантам [9], произрастающих в зоне влияния коксохимического завода, некрозы составляли до 40% листовой пластинки. У произраставшего там же *A. pseudoplatanus*, проявляющего высокую устойчивость к выбросам различных производств Донбасса [9], повреждения были незначительны и располагались по краю листовой пластинки. Листья для лабораторных анализов отбирали в июле – августе с 10 деревьев, достигших репродуктивного возраста. Использовали участки ткани листьев, характеризующиеся четко выраженной метаболической направленностью: листья, не имеющие видимых повреждений,

преднекротические, а также некротизированные участки поврежденных листьев. Действие фенола, одного из основных ингредиентов промышленных выбросов коксохимического производства, изучали методом фумигации изолированных побегов растений в стационарной камере с проточным режимом объемом 1 м³. Применяли концентрации токсиканта, превышающие критические ёмкости поглощения для исследуемых видов и вызывавшие видимые повреждения листьев [9]. Листья для анализов отбирали через 24 часа после обработки фенолом. Контролем служили побеги тех же растений, не подвергавшиеся фумигации. Выделение свободной и ионосвязанной фракций пероксидазы проводили по модифицированной методике Гамбург с соавт. [4]. Свободную фракцию пероксидазы экстрагировали из листьев 0,05 М ацетатным буфером, рН 5,4, экстракцию повторяли трижды. Для получения ионосвязанной фракции осадок инкубировали с 0,2 М ацетатным буфером, используя в качестве ионного детергента 1М раствор KCl, и дважды промывали тем же буфером без KCl. Ковалентно связанная форма пероксидазы не выявлена, вероятно, это связано с тем, что применявшийся в опытах детергент Тритон - X-100, способный разрушать ковалентные связи, может ингибировать пероксидазную активность [4]. По литературным данным, активность пероксидазы в ковалентной фракции, как правило, значительно ниже, чем в свободной и ионосвязанной, и не изменяется столь существенно под влиянием негативных факторов [8]. Активность фермента определяли фотокалориметрически на ФЭК - 56 ПМ с субстратом бензидином [3] и выражали в изменении оптической плотности за 1 сек на 1 г сырого вещества. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методике Лакина [5] и с помощью пакета Microsoft Excel.

На рисунке 1 показан ход экстракции пероксидазы из листьев растений *F. lanceolata* и *A. pseudoplatanus*, произрастающих на территории ботанического сада. А активность первой свободной фракции составляет 36% от общей активности фермента листьев *F. lanceolata* (фракция 1, рис. 1, А). Всего же активность свободной фракции пероксидазы (фракции 1-3) составляет 46% общей пероксидазной активности. Таким образом, около половины фермента находится в связанном состоянии и извлекается буфером с более высокой ионной силой (фракции 4-6). При экстракции аналогичным образом пероксидазы из ткани листьев *A. pseudoplatanus* активность первой свободной фракции составляет только 9 %, объединённая свободная фракция (фракции 4-6) содержит 14 % общей пероксидазной активности (рис. 1, Б). Буфером с более высокой ионной силой в первую фракцию извлекается 72 % общей пероксидазной активности (фракция 4), всего же активность ионосвязанной фракции составляет 86 % общей пероксидазной активности, т.е. активность ионосвязанной фракции более, чем в 6 раз, выше свободной.

Свободная фракция пероксидазы в основном локализована в межклеточном пространстве, цитоплазме и, частично, на клеточной стенке, ионосвязанная – преимущественно на клеточной стенке [11]. Различные фракции пероксидазы могут играть в клетке разную физиологическую роль, а также обладают различной чувствительностью к воздействию неблагоприятных факторов среды [7, 8]. Вероятно, более высокий уровень активности ионосвязанной фракции фермента в клетках листьев *A. pseudoplatanus* в некоторой степени объясняет его устойчивость к техногенному загрязнению среды.

Используя свободную и ионосвязанную фракции фермента, выясняли степень влияния фенола на изменение пероксидазной активности в клетках листьев изучаемых видов растений. Анализируя полученные данные, следует отметить одинаковую направленность изменения активности фермента в листьях обоих видов (рис. 2). Под влиянием токсиканта выявлено повышение пероксидазной активности в свободной фракции и снижение в ионосвязанной. В клетках листьев *F. lanceolata* это приводит к

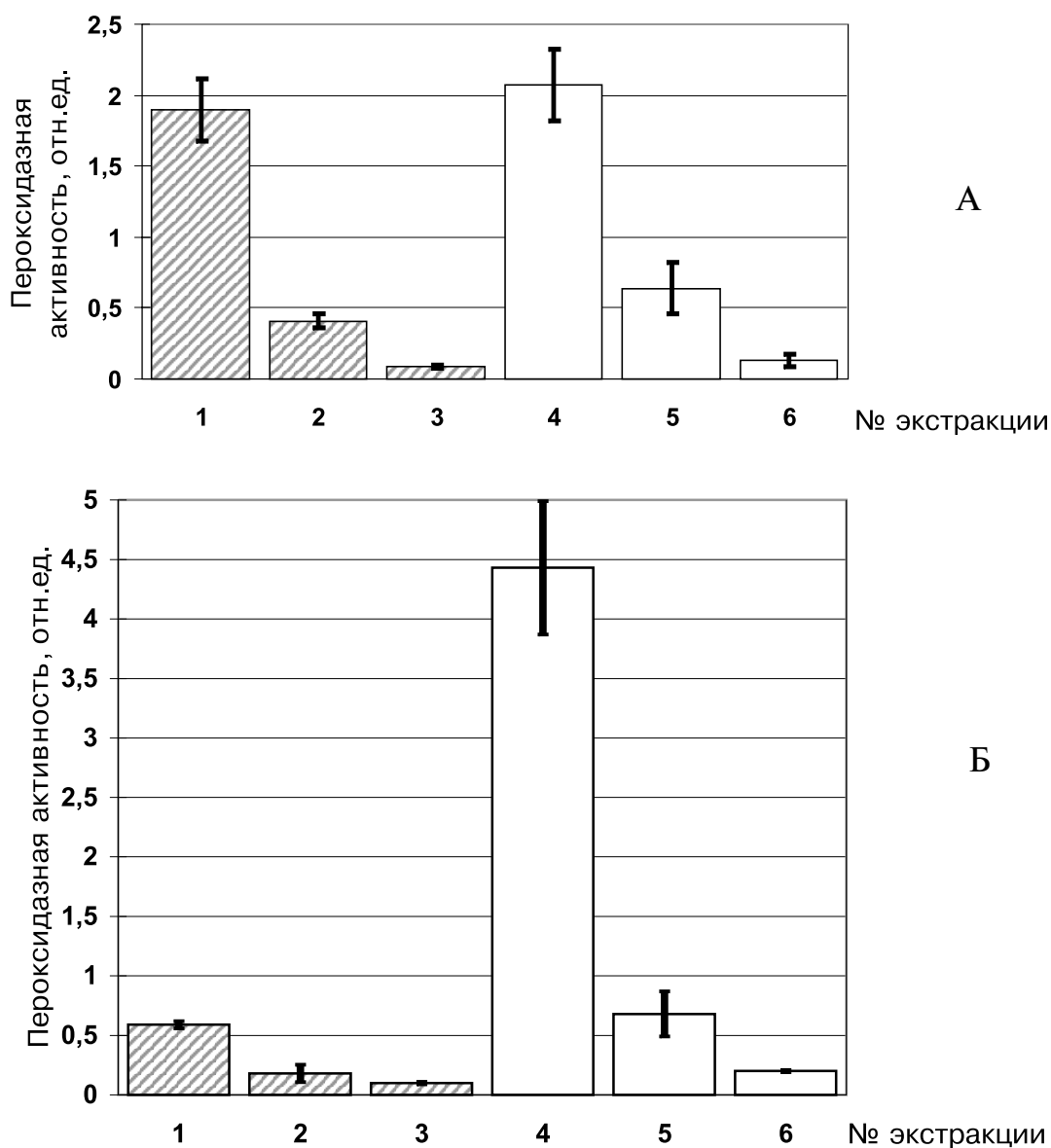


Рис. 1. Распределение пероксидазной активности по фракциям в клетках листьев *Fraxinus lanceolata* (А) и *Acer pseudoplatanus* (Б) (в изменении оптической плотности за 1 сек. на 1 г сырого вещества); 1-3 - свободная фракция, 4-6 - ионосвязанная фракция

увеличению доли свободной фракции пероксидазной активности от 39 до 57 %. (рис 2, А). Поскольку существенных изменений общей пероксидазной активности не обнаружено, можно констатировать, что под влиянием фенола в клетках листьев *F. lanceolata* происходит перераспределение пероксидазы между фракциями. Увеличение активности свободной фракции фермента сопровождается снижением активности ионосвязанной, что может свидетельствовать о высвобождении части мембраносвязанной пероксидазы вследствие разрушения биомембранных комплексов токсикантом. В клетках листьев *A. pseudoplatanus* под влиянием токсического действия фенола доля свободной фракции в общей пероксидазной активности увеличивается от 10 до 24 %, наряду с этим общая пероксидазная активность снижается на 30 % (рис. 2, Б). Таким образом, изменение активности пероксидазы в клетках листьев *A. pseudoplatanus* не ограничивается перераспределением между фракциями и в значительной степени обусловлено ингибированием ферментативной активности в более чувствительной в данном случае ионосвязанной фракции, что можно объяснить высоким уровнем аккумуляции фенола

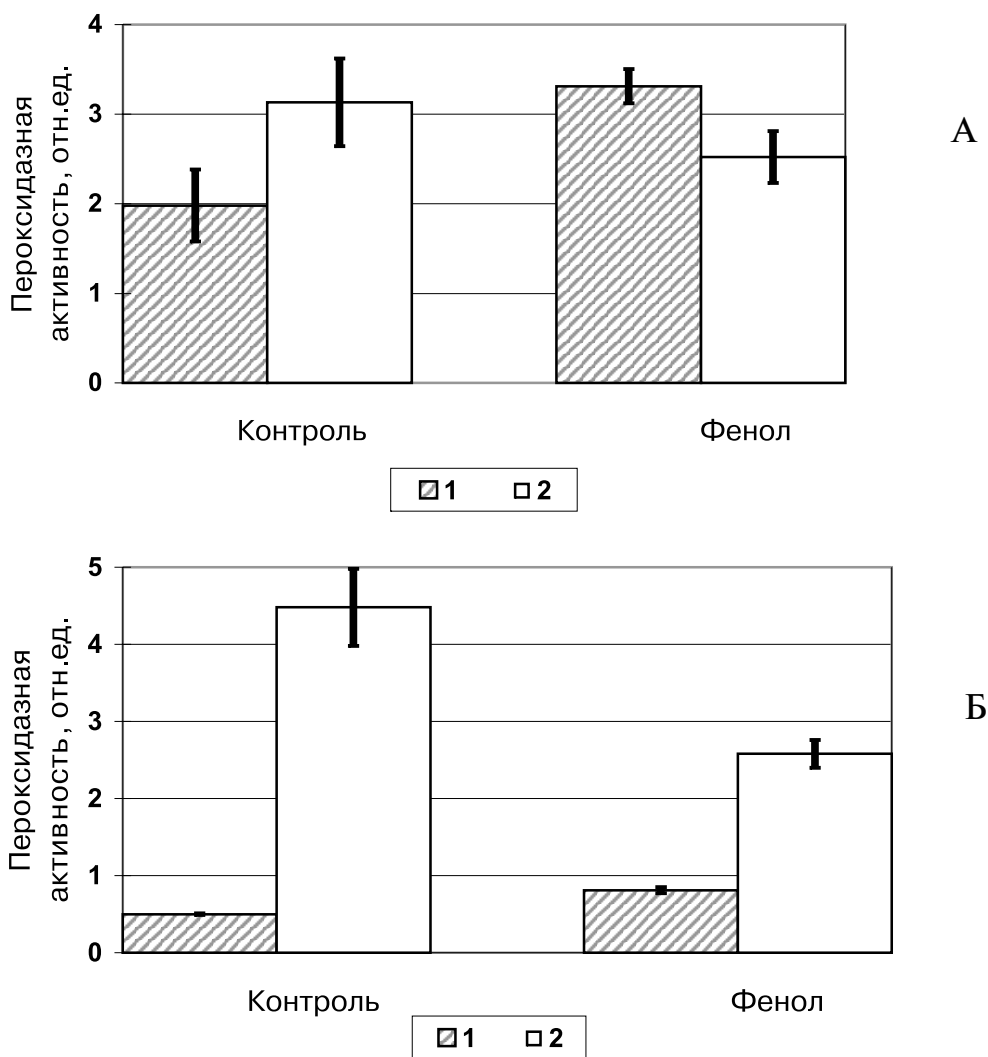


Рис. 2. Распределение пероксидазной активности по фракциям в клетках листьев *Fraxinus lanceolata* (А) и *Acer pseudoplatanus* (Б) под влиянием фенола; 1 – свободная фракция, 2 – ионсвязанная фракция

в клетках листьев *A. pseudoplatanus*. Следует отметить, что и после фумигации фенолом ионсвязанная фракция пероксидазы в клетках листьев *A. pseudoplatanus* значительно превышает свободную, в отличие от пероксидазы листьев *F. lanceolata*.

Исследование пероксидазной активности в тканях листьев *A. pseudoplatanus* и *F. lanceolata*, в различной степени поврежденных выбросами коксохимического завода, также выявило одинаковую направленность изменений у обоих исследованных видов (рис. 3). Отмечен всплеск пероксидазной активности в преднекротической зоне поврежденных листьев, более выраженный у *A. pseudoplatanus*. Так, если в данной зоне листьев *F. lanceolata* (рис. 3, А) пероксидазная активность в свободной фракции увеличивается на 50%, ионсвязанной фракции – на 34%, то в клетках листьев *A. pseudoplatanus* (рис. 3, Б) активность фермента увеличивается в 14,5 и 12,7 раз соответственно. В некротической зоне листьев исследуемых растений пероксидазная активность обеих фракций существенно снижается, достигая более низких значений по сравнению с листьями, не имеющими видимых повреждений, за исключением свободной фракции фермента листьев *A. pseudoplatanus*. В литературе есть данные о повышении активности пероксидазы в визуально неповрежденных тканях и увеличении её по мере приближения к некротической зоне листьев растений под влиянием аэрополлютантов [10]. В некротических тканях листьев растений выявлено существенное ингибирование активности перокси-

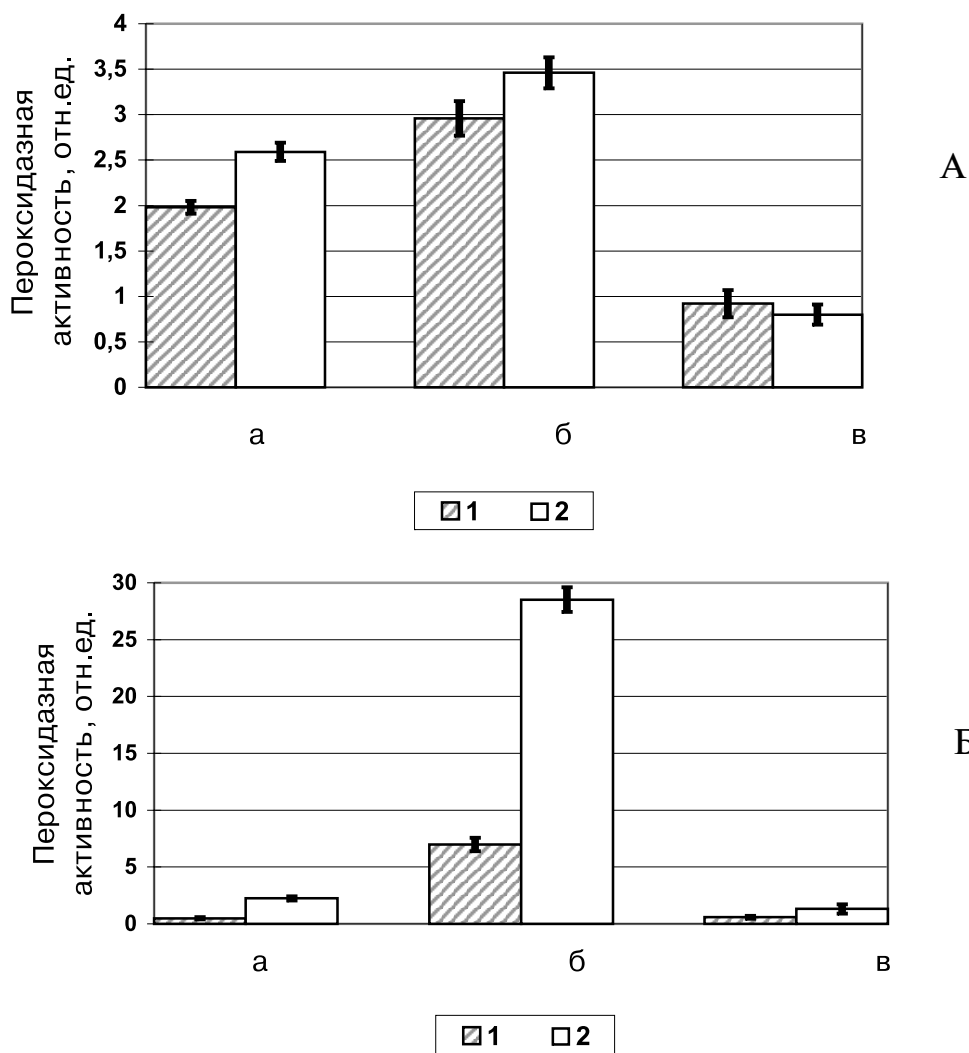


Рис. 3. Распределение пероксидазной активности по фракциям в клетках листьев *Fraxinus lanceolata* (А) и *Acer pseudoplatanus* (Б), повреждённых выбросами Авдеевского коксохимического завода; а – листья, не имеющие видимых повреждений, б – преднекротическая зона повреждённых листьев, в – зона некроза повреждённых листьев; 1 – свободная фракция, 2 – ионсвязанная фракция

дазы вплоть до полной инактивации, что в какой-то мере можно объяснить частичной денатурацией белка, наблюдающейся в омертвевших участках ткани листа. [10].

Хроническое повреждающее действие выбросов коксохимического завода также вызывает перераспределение пероксидазы между фракциями в клетках листьев обоих исследованных видов. По мере увеличения степени повреждения листа увеличивается доля свободной фракции фермента, доля связанной, соответственно, уменьшается. Активность пероксидазы в свободной фракции в листьях *F. lanceolata*, не имевших видимых повреждений, составляет 43 %, в преднекротической зоне повреждённых листьев – 46 %, а в зоне некроза – 53 % от общей активности фермента. В клетках листьев *A. pseudoplatanus* активность фермента в свободной фракции составляет соответственно 18, 20 и 31 % от общей пероксидазной активности, т.е. и в наиболее поврежденных участках листьев активность ионсвязанной фракции пероксидазы значительно выше, чем свободной.

Таким образом, большая часть пероксидазы устойчивого к техногенным воздействиям *A. pseudoplatanus* связана ионными связями с биомембранами клетки, в отличие от пероксидазы неустойчивого *F. lanceolata*, ионсвязанная фракция которой составляет

около половины общей активности. Под влиянием фумигации фенолом, а также хронического повреждающего действия выбросов коксохимического завода, наряду с изменением общей пероксидазной активности, происходит перераспределение фермента между фракциями, часть мембраносвязанной фракции пероксидазы переходит в свободную. Однако и в последствии аэрополлютантов активность ионосвязанной фракции пероксидазы листьев *A. pseudoplatanus* превышает активность свободной фракции. Полученные данные подтверждают необходимость оценки изменения пероксидазной активности только после полной экстракции фермента. Результаты, полученные на одной фракции (как правило, свободной), в значительной степени отражают изменение экстрагируемости фермента в результате влияния стрессового фактора.

1. *Веселовский В. А., Джанумов Д. А.* Изучение биофизическими методами адаптационных реакций растений в связи с проблемой устойчивости // Тр. Московск. о-ва испыт. природы. - 1974. - 50. - С. 89-98.
2. *Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина А. М.* Большой практикум по физиологии растений. - М.: Высш. шк. - 1975. - 391 с.
3. *Гамбург К. З., Подолякина Л. А., Ситнева В. М.* Изучение активности пероксидазы и ИУК-оксидазы в суспензионных культурах тканей табака и сои // Физиология растений. - 1977. - 24, вып.3. - С 542-548.
4. *Коршиков И. И., Котов В. С., Михеенко И. П., и др.* Взаимодействие растений с техногенно загрязнённой средой. - Киев.: Наук. думка - 1995. - 190 с.
5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. - М.: Высш. шк. - 1973. - 343 с.
6. *Савич И. М.* Пероксидазы - стрессовые белки растений // Успехи соврем. биологии. - 1989. - 107, № 3. - С. 406-417.
7. *Садаквасова Г. Г., Кунаева Р. М.* Некоторые физико-химические и физиологические свойства пероксидазы растений // Физиология и биохимия культ. растений. - 1987. - 19, № 2. - С 107-119.
8. *Сарсенбаев К. Н., Полимбетова Ф. А.* Роль ферментов в устойчивости растений. - Алма-Ата: Наука. - 1986. - 180 с.
9. *Тарабрин В. П., Кондратьев Е. Н., Башкатов В. Г. и др.* Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. - Киев.: Наук. думка. - 1986. - 216 с.
10. *Karolewski P.* Effect of sulphur dioxide on peroxidase activity in leaves of *Weigela* rooted cuttings // Arbor. Kor. - 1984. - 28 - P. 113-127.
11. *Mader M., Meyer Y., Boop M.* Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zell-Wander von *Nicotiana tabacum* L. // Planta. - 1975. - 122, № 3. - P. 259-268.

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Получено 17. 04. 2006

УДК 577.158:581.45:934.942:632.15

ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЛИСТЬЕВ *FRAXINUS LANCEOLATA* BORKH. И *ACER PSEUDOPLATANUS* L. В СВЯЗИ С ИХ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ВЫБРОСАМ КОКСОХИМИЧЕСКОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

Е. Н. Виноградова

Донецкий ботанический сад НАН Украины

Изучено соотношение свободной и ионосвязанной фракций пероксидазной активности в листьях растений *Fraxinus lanceolata* Borkh. и *Acer pseudoplatanus* L. Выявлено, что в листьях более устойчивого к выбросам коксохимического завода *A. pseudoplatanus* активность мембраносвязанной фракции фермента значительно выше, чем свободной фракции, в листьях неустойчивого *F. lanceolata* она составляет около половины суммарной активности. Под влиянием фумигации фенолом и хронического повреждающего действия выбросов коксохимического завода происходит высвобождение части мембраносвязанной пероксидазы и переход её в свободную фракцию.

UDC 577.158:581.45:934.942:632.15

PEROXYDASE ACTIVITY IN CELLS OF *FRAXINUS LANCEOLATA* BORKH. AND *ACER PSEUDOPLATANUS* L. LEAVES IN CONNECTION WITH THEIR TOLERANCE TO COKE-CHEMICAL PLANT EMISSIONS

Ye.N. Vinogradova

Donetsk Botanical Gardens, Nat. Acad. Sci. of Ukraine

Correlation of free and ion-combined fractions of peroxydase activity in leaves of *Fraxinus lanceolata* Borkh. and *Acer pseudoplatanus* L. was studied. It is revealed that in leaves of more tolerant to coke-chemical plant emissions *A. pseudoplatanus* activity of membrane-combined enzyme fraction is considerably higher than the free one; in leaves of non-tolerant *F. lanceolata* it makes up about half of summary activity. Under phenol fumigation impact and chronic injurious activity of coke-chemical plant emissions releasing of the part of membrane-combined peroxydase and its change into free fraction takes place.