

УДК 582.746.56:582.632.2:577.15:002.637

**ФУНКЦІОНУВАННЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ
СИСТЕМИ В ЛИСТКАХ РОСЛИН ГІРКОКАШТАНА ЗВИЧАЙНОГО І
КАШТАНА ЇСТІВНОГО В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ
ТА ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ**

Ю. В. ЛИХОЛАТ, доктор біологічних наук

Г. С. РОССИХІНА-ГАЛИЧА, молодший науковий співробітник

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

О. С. ТРОХАНЯК, аспірантка*

І. П. ГРИГОРІЮК, доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: creadle_of_death@mail.ru

Висвітлено динаміку активності ферментів антиоксидантного захисту, зокрема каталази, пероксидази, супероксиддисмутази і вмісту ТБК-активних продуктів у листках рослин гіркокаштана звичайного та каштана їстівного впродовж вегетаційного періоду у техногенно забруднених умовах Ботанічного саду Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара.

Ключові слова: *гіркокаштан звичайний, каштан їстівний, забруднення токсикантами, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза, ТБК-активні продукти*

Одним із визначальних антропогенних чинників м. Дніпропетровська, який порушує функціонування систем життєдіяльності рослин, є вихлопні гази автотранспорту та промислові викиди підприємств. В результаті атмосферне повітря наповнюється пилом, аерозолями, димом та твердими частками. За таких несприятливих умов деревні види рослин, які оптимізують міське середовище, виступають фітофільтрами, терморегуляторами, виконують санітарно-гігієнічну, естетичну, ландшафтну та рекреаційну функції, що використовують для моніторингу антропогенних компонентів.

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України І. П. Григорюк

Значна кількість шкідливих компонентів викидів, які надходять до рослин, зумовлюють широкий спектр процесів метаболізму, які можна характеризувати як стрес-індуковані [6, 7, 9]. Одним з найнебезпечніших проявів їх дії на живий організм вважають розвиток окиснювального стресу, який виступає як індуктор захисних реакцій і чинник пошкодження біомакромолекул й мембранних структур. Обов'язковою умовою його виникнення є надмірне утворення в органах рослин активних форм кисню [7].

В екстремальних умовах важливим механізмом стійкості рослин проти стресових чинників є активізація багаторівневої фізіолого-біохімічної системи антиоксидантного захисту, до якої входить значна кількість компонентів. Особливе місце серед них займають ферменти антиоксидантного захисту, зокрема каталаза (КАТ), пероксидаза (ПК) і супероксиддисмутаза (СОД) [3, 7, 9, 17], активність яких і вміст ТБК-активних продуктів є найчутливішими критеріями до впливу стресових чинників середовища.

За дії автотранспортних викидів і дефіциту вологи відбувається порушення фізіолого-біохімічних процесів у рослинах гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.) і каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.), які використовують для озеленення міських територій та населених пунктів в Україні. Так, гіркокаштан звичайний висаджують для створення алеї і рядових посадок уздовж доріг, оскільки щільна і потужна крона влітку глибоко затінює та стримує потоки забрудненого токсикантами повітря.

Мета дослідження – порівняльна оцінка активності ферментів антиоксидантного захисту і зміни вмісту ТБК-активних продуктів у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного впродовж вегетаційного періоду в техногенно забруднених умовах Ботанічного саду Дніпропетровського національного університету (ДНУ) імені Олеся Гончара.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктами дослідження слугували 25-30-річні рослини гіркокаштана звичайного (слабкостійкий до водного дефіциту) і каштана їстівного (стійкий до водного дефіциту), які зростають в аналогічних екологічних умовах Ботанічного саду ДНУ імені Олеся Гончара, що

розташований на головній автомагістралі на проспекті Гагаріна. Вид гіркокаштана звичайного належить до таксономічного роду Гіркокаштан (*Aesculus* L.), а каштана їстівного – Каштан (*Castanea* Mill.).

Відбір листків з нижнього, середнього і верхнього ярусів рослин проводили з травня до серпня у 2013-2014 рр., з яких отримували екстракти і центрифугували 20 хв за 16000 об./хв., після чого в супернатантах вимірювали активність ферментів антиоксидантного захисту з використанням фотоелектроколориметра КФК-2МП. Паралельно в листках рослин визначали кількість ТБК-активних продуктів у нмоль/г сирової речовини маси \times хв [11]. Реакційна суміш містила 2 мл супернатанту і 2 мл розчину 2-тіобарбітурової кислоти, яку інкубували 30 хв за температури 100 °С, охолоджували і вимірювали оптичну густина за довжини хвилі 532 нм.

Активність СОД (КФ 1.15.1.1) встановлювали за рівнем гальмування процесу відновлення нітросинього тетразолію в присутності НАДН і феназинметасульфату [12]. Реакційна суміш містила 1,2 мл Na-фосфатного буфера, 0,1 мл розчину феназинметасульфату, 0,3 мл розчину нітросинього тетразолію та 0,3 мл супернатанту. Реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл НАДН і зупиняли 1 мл льодяної оцтової кислоти. Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали в ум.од./г сирової речовини маси \times хв.

Активність ПК (КФ 1.11.1.7) визначали за колориметричним методом [4]. У реакційну суміш, яка містила 0,2 мл супернатанту й 0,8 мл ацетатного буфера, додавали 1мл 0,1М розчину бензидину. Зміну оптичної густини реєстрували за довжини хвилі 470 нм, а активність ПК виражали в ум.од./г сирової речовини маси \times хв.

Вимірювання активності КАТ (КФ 1.1.1.6) проводили титриметричним методом [13] із розчином перманганату калію після інкубування супернатанту протягом 30 хв за температури 25 °С з пероксидом водню і виражали в ммоль H_2O_2 / хв \times сирової речовини маси. Повторність дослідів – чотириразова.

Статистичну обробку результатів виконували за допомогою пакету Microsoft Statistica 6.0. Розбіжності між вибірками вважали значущими за $p \leq 0,05$.

Результати досліджень. Нами встановлено, що водний денний дефіцит у листках гіркокаштана звичайного протягом вегетаційного періоду коливався у межах 15,6 - 24,2 %, а каштана їстівного – 8,8 – 16,2 %. В умовах забруднення середовища токсикантами і дефіциту вологи у листках рослин відбувалась інтенсифікація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ). У результаті його дії утворюються гідропероксиди і малоновий діальдегід, які спричиняють пошкодження мембран, гальмування процесів росту та метаболізму рослин [5]. За умов індукції ПОЛ прискорюється пусковий механізм «фліп-флоп», підвищується гідроліз окиснених ліпідів фосфоліпазами і зменшення відношення фосфоліпід / білок у клітинних мембранах [2, 5]. Виявлено, що найбільш високий вміст ТБК-активних продуктів був притаманний листкам рослин каштана їстівного, який у травні становив 8,2 нмоль/г сирої речовини маси. У червні прослідковувалось достовірне зростання їх концентрації порівняно з травнем на 85 %. У липні і серпні відбувалось підвищення нагромадження вмісту продуктів ліпопероксидації у листках наявних видів рослин на 12 і 47 %, ніж у попередні місяці (рис. 1).

Стає очевидним, що комплекс несприятливих умов Ботанічного саду ДНУ імені Олеся Гончара зумовлював окисний стрес, який виявлявся впродовж вегетаційного періоду внаслідок збільшення кількості вторинних продуктів ПОЛ у листках гіркокаштана звичайного та каштана їстівного. Водночас, процеси ліпопероксидації відбувалися інтенсивніше у листках рослин каштана їстівного, ніж гіркокаштана звичайного, що підтверджує наявність активної захисної системи проти несприятливих умов.

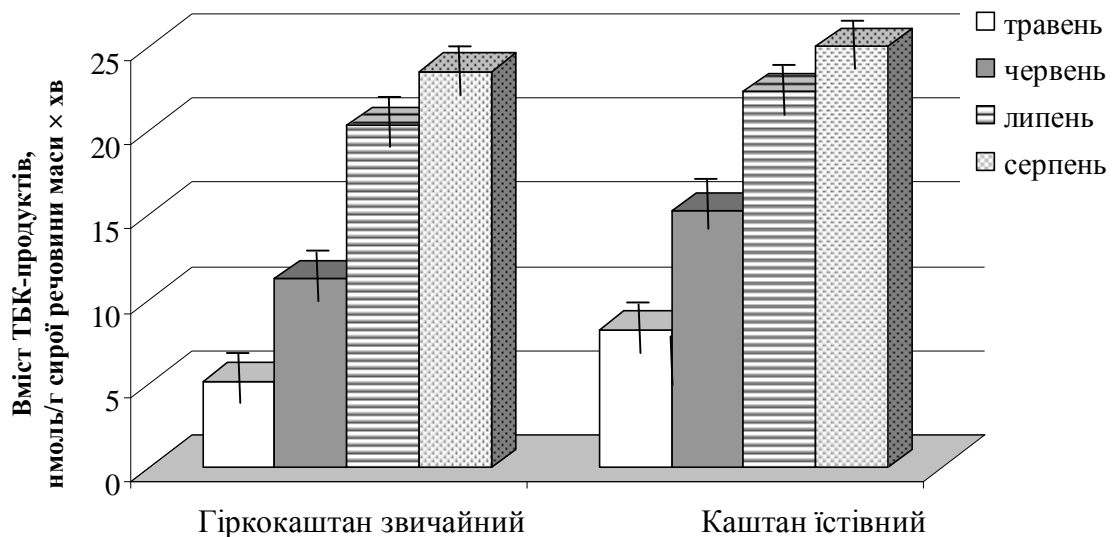


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного

В реалізації захисних реакцій рослин регуляторну роль відводять СОД-специфічному ферменту, який запобігає пошкодjuвальній дії супероксиданіона-радикала кисню на біологічні структури і перетворює його на пероксид водню [16].

Встановлено, що у травні активність СОД у листках рослин гіркокаштана звичайного становив 1,5 ум.од./г сирі речовини маси, а каштана їстівного – на 73 % більше (рис. 2). За умови переходу від травня до червня місяця у листках гіркокаштана звичайного і каштана їстівного нами визначено зростання активності СОД. Так, у червні в листках рослин гіркокаштана звичайного виявлено інтенсифікацію активності ферменту СОД на 132 % порівняно з травнем. В активно фотосинтезуючих тканинах листків каштана їстівного цей показник був вищим у травні на 62 %. У липні зареєстровано максимальний рівень акумуляції СОД відносно червня на 198 % у листках гіркокаштана звичайного та 200 % каштана їстівного. Перехід рослин до фази фізіологічного спокою (серпень) супроводжувався збільшенням активності ферменту СОД у листках лише на 13 та 21 %. Визначене зростання активності СОД підтверджує її активну участь у підтриманні прооксидантно-антиоксидантної

рівноваги в листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного протягом вегетаційного періоду.

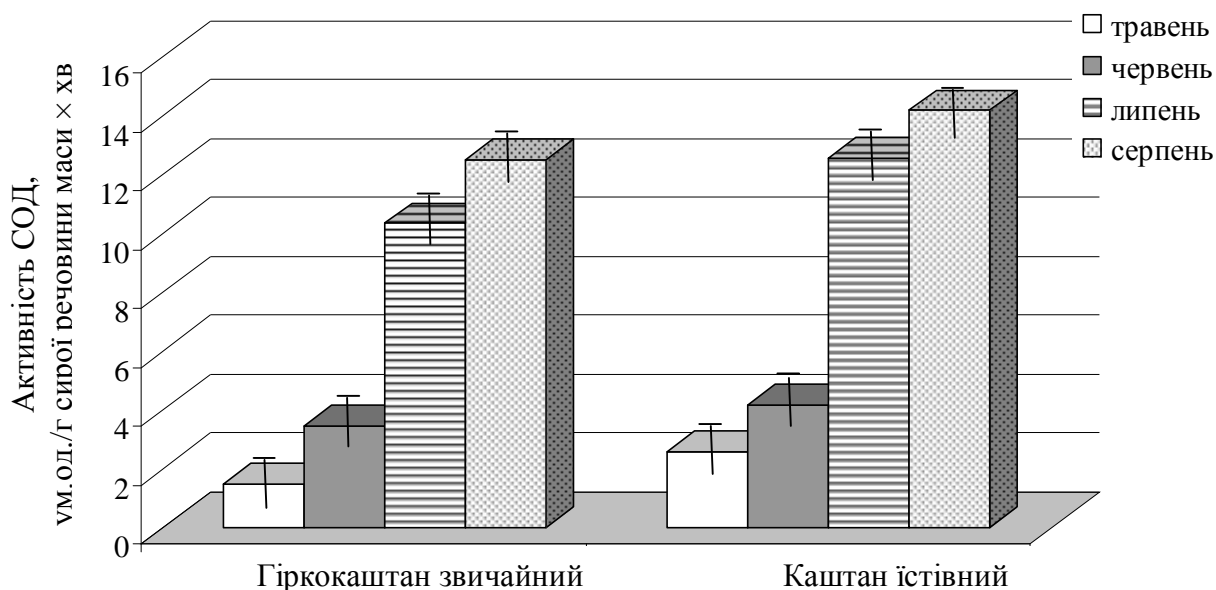


Рис. 2. Активність ферменту супероксиддимутази у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного

Доведено, що ПК здатна реагувати на широкий спектр абіо- і біотичних стресових чинників, які порушують гомеостаз у рослинному організмі. Зокрема, вони змінюють свою активність зі збільшенням ступеня техногенного навантаження на рослини, що дозволяє припустити їх взаємну обумовленість [1, 10, 15].

На етапі активного росту (травень-червень) активність ПК у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного складала 21,9 - 23,9 та 23,1 - 25,2 ум.од./г сирієї речовини маси (рис. 3). У фазі вторинного росту (липень) відбувалось зниження активності ПК у листках рослин відносно травня на 20 – 23 %. Мінімальні значення величин активності ферменту зареєстровано на початку фази спокою (серпень).

Отже, у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного динаміка змін активності ПК була подібною. Найвищі її значення

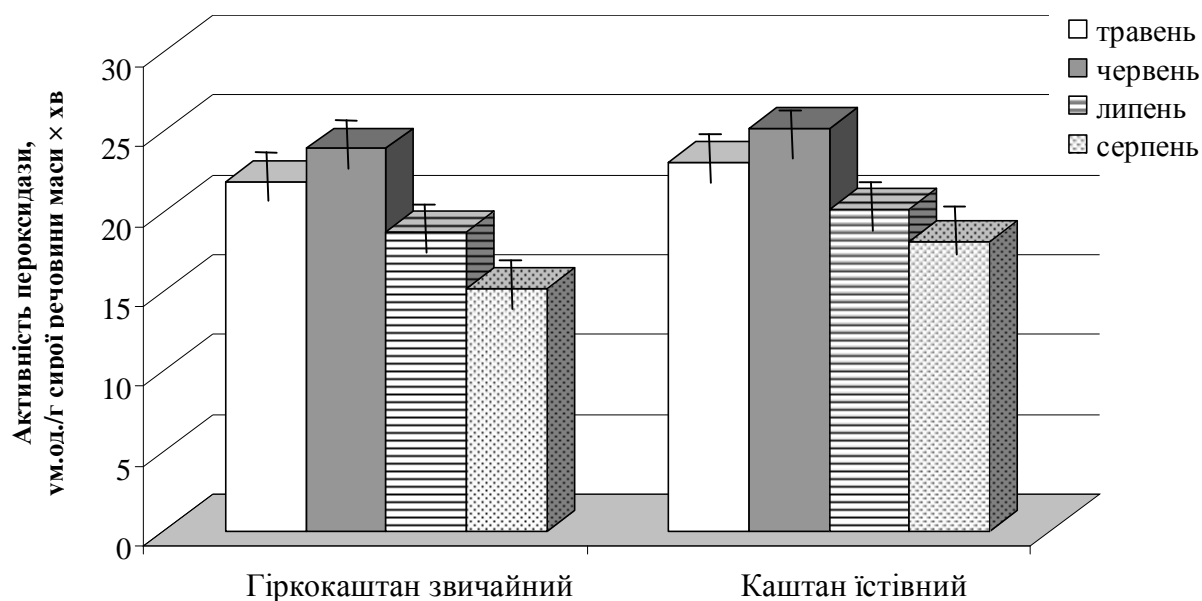


Рис. 3. Активність ферменту пероксидази у листках гіркокаштана звичайного і каштана їстівного

співпадали з періодом найінтенсивніших метаболічних процесів, які відбуваються під час цвітіння і плодоношення рослин [8]. Відміни в абсолютних значеннях активності ПОД у листках досліджуваних видів рослин спричинені, очевидно, їх генетичним потенціалом. Фермент ПК бере участь у регуляції процесів метаболізму на різних системних рівнях їх організації і зумовлює швидке пристосування рослин до змінених умов середовища [14].

Нами показано, що за ступенем активності КАТ листки рослин суттєво відрізняються. Найбільш високий рівень її активності був притаманний листкам рослин каштана їстівного протягом вегетаційного періоду. У травні активність КАТ дорівнювала 0,00032 ммоль/г сирової речовини маси × хв. У червні динаміка її активності поступово збільшувалась, але була вищою, ніж у попередньому місяці (травень) на 156 % (рис. 4).

На етапі вторинного росту (липень) активність ферменту КАТ збільшувалась на 77 %. Максимальні її значення прослідковувались за умов переходу рослин до фази початку спокою (серпень), рівень якої підвищувався лише на 5 %.

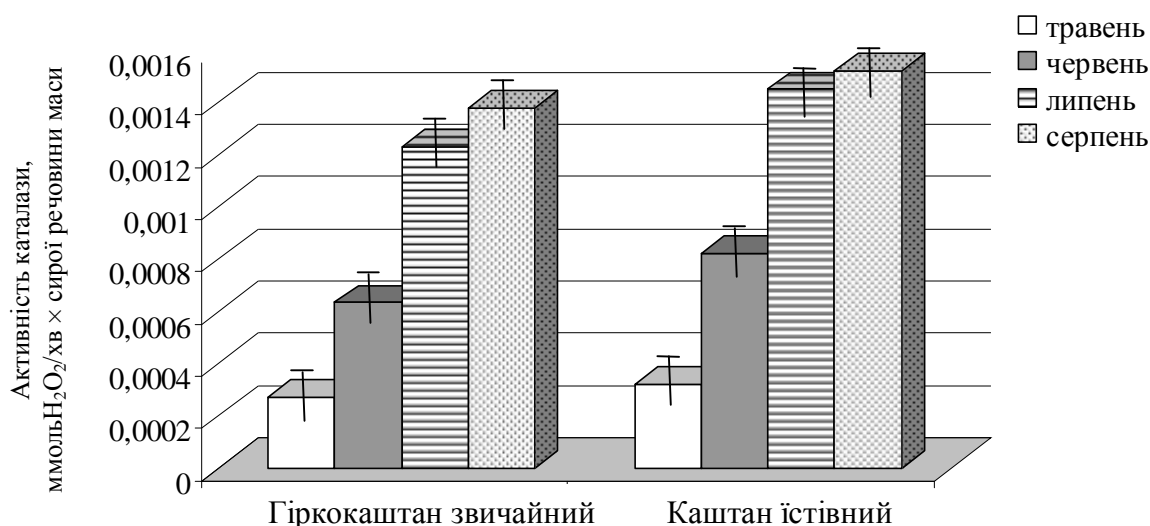


Рис. 4. Активність каталази у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного

Динаміка активності КАТ у листках рослин гіркокаштана звичайного мала аналогічний характер, яка упродовж даного періоду наростала, і у серпні коливалась від 12 до 156 % (рис. 4).

Висновки

1. Листки рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного у техногенно забруднених умовах Ботанічного саду ДНУ імені Олеся Гончара відрізняються за рівнем активності ферментів антиоксидантного захисту та вмістом ТБК-активних продуктів. У листках рослин каштана їстівного у першій половині вегетаційного періоду визначено суттєву інтенсифікацію процесів ПОЛ і збільшення кількості ТБК-АП порівняно з гіркокаштаном звичайним. Установлено зростання активності ферментів СОД і КАТ у листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного включно до серпня.

2. Активність ферменту ПК в листках рослин гіркокаштана звичайного і каштана їстівного була максимальною у період найінтенсивніших метаболічних процесів (травень-червень). В другій половині вегетаційного періоду прослідковувалось гальмування активності ПК у листках рослин.

3. Виявлено достовірні відміни в абсолютних значеннях активності ферментів СОД, КАТ і ПК у листках рослин гіркокаштана звичайного й каштана їстівного, що

спричинено видовими, міжродовими особливостями та інтенсивністю формування адаптивних реакцій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Активність ферментів антиоксидантної системи в листках деревних видів рослин за умов підтоплення [Електронний ресурс] / О. Г. Філімоніхіна, Ю. В. Лихолат, І. П. Григорюк, О. І. Серга // Наукові доповіді НУБіП. – 2013. - №5 (41). – Режим доступу: http://www.nbu.gov.ua/j-pdf/Nd_2013_5_2.pdf
2. Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран / В. Ф. Антонов. – М.: Наука, 1982. – 150 с.
3. Активність ферментів антиоксидантної системи в листках рослин різних видів барбарису (*Berberis L.*) за дії важких металів [Електронний ресурс] / О. М. Боброва, Ю. В. Лихолат, І. П. Григорюк, О. І. Серга, П. П. Яворовський // Наукові доповіді НУБіП. – 2010.- №5 (10). – [http:// www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd2010-1/10bomahm.pdf](http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd2010-1/10bomahm.pdf).
4. Бояркин А. Н. Колориметрическое определение активности пероксидазы / А. Н. Бояркин // Биохимия. – 1961. – 16, № 2. – С. 252–254.
5. Бурлакова Е. Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова // Успехи химии. – 1985. – 54, №9. – С. 1540-1558.
6. Воскресенский В. С. Экологические особенности древесных растений в урбанизированной бреде: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.16 «Экология» / В. С. Воскресенский. - Казань, 2011. – 23 с.
7. Гарифзянов А.Р. Исследование антиоксидантной системы древесных растений в условиях промышленного загрязнения: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.16 «Экология» / А. Р. Гарифзянов. – Пушкино, 2011. – 23 с.
8. Жукова Л. А. Морфологические и физиологические особенности онтогенеза календулы лекарственной (*Calendula officinalis L.*) в посевах разной

плотности / Л. А. Жукова, М. Г. Половникова, О. Л. Воскресенская // Экология. – 1996. – Т. 2. – С. 104–110.

9. Коршиков И. И. Взаимодействие растений с техногенно загрязненной средой. Устойчивость. Фитоиндикация. Оптимизация / И. И. Коршиков, В. С. Котов, И. П. Михеенко. – К.: Наук. думка, 1995. – 190 с.

10. Лихолат Ю. В. Вплив умов шахтних територій на активність оксиредуктаз квітково-декоративних рослин / Ю. В. Лихолат, Г. С. Россихіна-Галича, Н. С. Найданова // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – Вип. 30. – 2011. – С. 178 – 182.

11. Мусієнко М. М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М. М. Мусієнко, Т. В. Паршикова, П. С. Славний. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 200 с.

12. Переслегина И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей / И. А. Переслегина // Лабораторное дело. – 1989. - № 11. – С. 20-23.

13. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – М.: Колос, 1968. – 183 с.

14. Половникова М. Г. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды / М. Г. Половникова, О. Л. Воскресенская // Физиология растений. – 2008. – 55, № 5. – С. 777–785.

15. Романова Е. В. Ферменты в антиокислительной системе растений: супероксиддисмутаза / Е. В. Романова // Агро XXI. – 2008. – № 7–9. – С. 27–30.

16. Россихина-Галича Г. С. Активность ферментов антиоксидантной защиты растений кукурузы, произрастающих в условиях гербицидной обработки / Г. С. Россихина-Галича, Ю. В. Лихолат, О. М. Винниченко // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2014. – 10, № 4. – С. 30 – 34.

17. Хромих Н. О. Сезонна динаміка активності захисних ферментів у листі *Robinia pseudoacacia* L. за умов урбоценозів / Н. О. Хромих, Г. С.

**ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ
КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО И КАШТАНА
СЪЕДОБНОГО В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ И
ВОДНОГО ДЕФИЦИТА**

**Ю. В. Лихолат, Г. С. Россихина-Галича, Е. С. Троханяк,
И. А. Григорюк**

Освещена динамика активности ферментов антиоксидантной защиты, в частности каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы и содержания ТБК - активных продуктов в листьях растений конского каштана обыкновенного и каштана съедобного в течение вегетационного периода в техногенно загрязненных условиях Ботанического сада Днепропетровского национального университета имени Олеса Гончара.

Ключевые слова: каштан конский обыкновенный, каштан съедобный, загрязнение токсикантами, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза, ТБК-активные продукты

**OPERATION PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN LEAVES OF
THE HORSE CHESTNUT ORDINARY AND CHESTNUTS IN THE
CONDITIONS OF TECHNOGENIC POLLUTION AND WATER SCARCITY**

Yu.V. Lykholat, A. S. Rossikhina-Galicha, O.S. Trokhaniak, I. P. Hrygoryuk

Allocated the dynamics of the activity of antioxidant enzymes, such as catalase, peroxidase and superoxidedismutase and content of TBA-active products in leaves of Horse chestnut and Horse chestnut edible during the vegetation period in the technogenic polluted conditions of the Botanical Garden of Dnepropetrovsk National University of Oles Gonchar.

Keywords: *Horse chestnut, Horse chestnut edible, pollution by toxicants, catalase, peroxidase, superoxidedismutase, TBA-active products*