

УСТОЙЧИВОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ К ДЕЙСТВИЮ ПИРИДИНА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Е.Н. Виноградова

Государственное учреждение «Донецкий ботанический сад», Донецк, Украина,
donetsk-sad@mail.ru

Аннотация. Выявлено снижение сродства к субстратам и чувствительности к пиридину, ингредиенту эмиссий, пероксидазы *Populus deltoides* техногенных насаждений, что может быть одним из механизмов адаптации, который заключается в защитных модификациях молекул ключевых ферментов. Снижение чувствительности к пиридину пероксидазы семенного потомства *Bromopsis inermis* техногенной популяции свидетельствует об определенной генотипической дифференциации, что проявляется в наследовании устойчивости к токсикантам.

Ключевые слова: пероксидаза, устойчивость, техногенное загрязнение, пиридин, механизмы адаптации

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1038-1042

Растения популяций, формирующихся на загрязненных территориях, могут проявлять более высокую устойчивость к основным ингредиентам загрязнения среды [Игошина, Косицын, 1990; Фазлиева, 2012]. Дифференциация растительности и изменение структуры популяций может происходить за счет ослабления роста и снижения конкурентоспособности наиболее чувствительных видов и особей, то есть загрязнение среды, действуя как фактор отбора, способствует формированию устойчивых генотипов [Rout Gyana, 2000]. В реализации адаптивного потенциала растений важную роль играют качественные изменения ключевых ферментных систем, обеспечивающих возможность существования в условиях техногенного загрязнения. Одним из возможных физиолого-биохимических механизмов адаптации может быть снижение чувствительности отдельных ферментов к прямому действию токсикантов. [Игошина, Косицын, 1990; Феник, 1995]. Не исключено формирование подобных механизмов адаптации и в процессе онтогенеза в клетках древесных растений, произрастающих в зоне влияния промышленных предприятий.

В этой связи представляется актуальным исследование чувствительности ключевых ферментов, выделенных из листьев растений техногенных экотопов, к прямому влиянию ингредиентов промышленных эмиссий. К таким ферментам относится пероксидаза, которой принадлежит значительная роль в адаптивных реакциях растений, поскольку она способна обезвреживать токсичные перекисные соединения, образующиеся в клетке при воздействии стрессовых факторов [Scandalios, 2005]. Данный фермент принимает участие во многих процессах жизнедеятельности растений, поэтому его изучению уделяется пристальное внимание [Рогожин, 2004; Passardi, 2005]. Однако в большинстве публикаций анализируется изменение активности и компонентного состава фермента, механизмы регуляции его активности при поступлении в клетки растений токсичных веществ в полной мере не определены и остаются предметом исследований.

Анализировали устойчивость к влиянию пиридина, одного из органических компонентов выбросов химических и коксохимических производств, а также субстратную специфичность пероксидазы, выделенной из листьев тополя дельтовидного (*Populus deltoides* Marsh.), насаждения которого произрастали в санитарно-защитных зонах коксохимического (КХЗ) и фенольного (ФЗ) заводов.

Уступая в валовом объеме промышленных выбросов таким аэрополлютантам, как оксиды азота и серы, органические токсиканты часто являются наиболее опасными в экологическом плане [Тарабрин и др., 1986]. В модельных экспериментах изучали устойчивость к пиридину пероксидазы, выделенной из листьев трехнедельных проростков бромопсиса безостого (*Bromopsis inermis* (Leys.) Holub), выращенных из семян, собранных с растений популяции, нормально развивающейся в условиях действия выбросов коксохимического завода. Контролем служили растения *P. deltoides*, произрастающие в условиях фонового уровня загрязнения, и семенное потомство *B. inermis* популяции залежной степи. Анализировали влияние пиридина на активность пероксидазы в условиях *in vitro*, поскольку закономерности, полученные при действии поллютантов на интактные растения, могут быть вызваны не только прямым, но и опосредованным их действием [Гуральчук, 1994]. Для удаления эндогенных соединений, способных связывать и, таким образом, инактивировать пиридин, проводили очистку пероксидазы с помощью высаливания сульфатом аммония и последовательных гель-фильтраций на сефадексах G-25 (*P. deltoides*) или G-50 (*B. inermis*) и G-100. Сродство фермента к пероксиду водорода, а также к эндогенному (хлорогеновая кислота) и синтетическому (гваякол) фенольным соединениям оценивали по значениям константы Михаэлиса (K_m), равной концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной. Для определения устойчивости к пиридину очищенные препараты фермента инкубировали с водными растворами токсиканта в диапазоне концентраций 0,25–2,50 М (*P. deltoides*) и 0,60–4,40 М (*B. inermis*). Пиридиновые основания, проникая в растительную клетку, связываются с такими внутриклеточными рецепторами, как кислоты, вода и атомы переходных металлов, в том числе и входящие в активные центры ферментов [Тарабрин и др., 1986]. Способность пиридина связываться с водой в значительной степени снижает его токсичность и объясняет факт достижения ингибирующего эффекта на растения лишь при достаточно высоких концентрациях токсиканта. Устойчивость определяли по значению коэффициента устойчивости (K_y), который равен отношению активности фермента в пробе с токсикантом к активности контрольной пробы [Игошина, Косицин, 1990]. Достоверность результатов оценивали по стандартным методикам с использованием программ Excel.

Для пероксидазы, выделенной из листьев растений *P. deltoides*, подверженных в ходе онтогенеза влиянию техногенных эмиссий, K_m выше, соответственно, сродство по отношению к исследованным субстратам ниже, по сравнению с ферментом контрольных растений. Изменение субстратной специфичности возможно вследствие структурных перестроек активного центра или всей молекулы фермента. Для осуществления ферментативного катализа необходимы конформационные переходы молекулы белка, связанные с изменением слабых взаимодействий его пространственной структуры [Лютова, 1995]. Определенные конформационные перестройки молекул ферментов, в том числе и пероксидазы, могут происходить при действии на растения стрессовых факторов [Савич, 1989; Лютова, 1995].

Модификации пероксидазы из листьев растений техногенных насаждений, вызывающие снижение субстратсвязывающей способности фермента, вероятно, могут способствовать снижению его чувствительности к прямому влиянию аэрополлютантов. Для проверки данного предположения была проанализирована устойчивость пероксидазы *P. deltoides* техногенных и контрольных насаждений к действию пиридина в условиях *in vitro*. Выявлена четкая концентрационная зависимость снижения под влиянием пиридина активности пероксидазы из листьев растений всех исследованных насаждений. Для всего градиента концентраций токсиканта K_y был минимальным для фермента контрольных растений, а максимальным – для фермента растений,

испытывавших в ходе онтогенеза влияние выбросов ФЗ (рис. 1). Статистическая достоверность более высоких значений K_y пероксидазы растений ФЗ по сравнению с контролем подтверждена для всех исследованных концентраций пиридина, за исключением минимальной. Для пероксидазы растений КХЗ устойчивость к действию пиридина больше, чем в контроле, при действии концентраций токсиканта свыше 1 М. Максимальная концентрация пиридина снижает K_y пероксидазы контрольных растений на 77%, растений КХЗ – на 58% и ФЗ – на 55%.

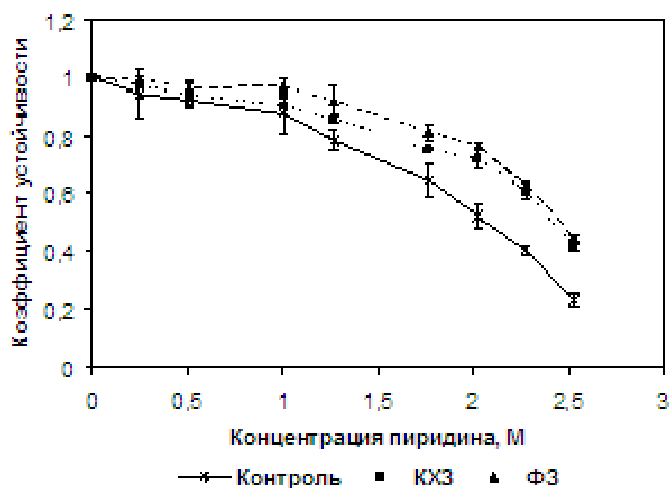


Рис. 1. Устойчивость к влиянию пиридина пероксидазы, выделенной из листьев растений *Populus deltoides* Marsh. произрастающих в условиях фонового уровня загрязнения (контроль), коксохимического (КХЗ) и фенольного (ФЗ) заводов.

Выявленная более высокая устойчивость к действию пиридина пероксидаз *P. deltoides* промышленных насаждений может быть результатом адаптивных изменений, происходящих в органах растений в ходе онтогенеза в условиях хронического действия эмиссий. Поскольку инактивация пероксидазы пиридином может осуществляться путём связывания с ее активным центром, возможные механизмы адаптации могут быть связаны с модификациями, способствующими защите активного центра фермента от прямого действия поступающих в клетку токсикантов, что одновременно вызывает уменьшение его субстратсвязывающей способности. Учитывая, что экспрессия изопероксидаз может меняться в процессе онтогенеза растений, наряду с изменением свойств ферментов на функциональном уровне, возможен также синтез изоформ с новыми свойствами [Nair, 1996].

При изучении влияния пиридина на пероксидазу, выделенную из листьев проростков *B. inermis*, выявлено, что начальные концентрации градиента вызывают повышение активности фермента, более существенное для потомства популяции, адаптированной к условиям эмиссий КХЗ (рис. 2). Так, активирование под влиянием пиридина пероксидазы потомства контрольной популяции наблюдалось только при минимальной его концентрации, а техногенной – и при более высоких концентрациях токсиканта (до 1,90 М). Дальнейшее повышение концентрации пиридина в реакционной смеси вызывает снижение активности фермента. Для всех исследуемых концентраций токсиканта, за исключением минимальной, более высокой устойчивостью характеризовалась пероксидаза проростков популяции КХЗ. Максимальная испытываемая концентрация пиридина вызывает снижение K_y фермента потомства контрольной популяции *B. inermis* на 74%, а техногенной – на 38%.

Повышенная устойчивость к ингредиентам эмиссий пероксидазы из листьев семенного потомства *B. inermis*, адаптированного к условиям промышленной площадки

предприятий, может быть одним из механизмов формирования устойчивых популяций на загрязненных территориях. Адаптация к условиям техногенного загрязнения происходит, вероятно, как за счёт элиминации чувствительных особей и отбора изначально устойчивых генотипов, так и за счет физиолого-биохимических изменений, расширяющих или смещающих диапазон нормы их реакции. Очевидно, что адаптивные модификации могут быть эффективными лишь до определённого уровня накопления токсиканта в клетках растений, превышение которого вызывает инактивирование фермента.

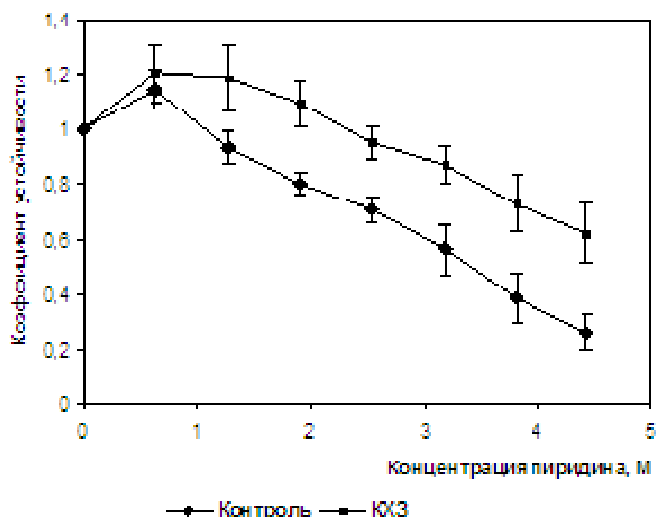


Рис. 2. Устойчивость к влиянию пиридина пероксидазы, выделенной из листьев семенного потомства популяции *Bromopsis inermis* (Leys.) Holub, адаптированной к условиям залежной степи (контроль) и эмиссий коксохимического завода (КХЗ).

Литература

- Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к тяжёлым металлам // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 207–217.
- Игошина Т.И., Косицин А.В. Устойчивость к свинцу карбоангидразы *Melica nutans* (Poaceae) // Ботанический журнал. – 1990. – Т. 75, № 8. – С. 1144–1150.
- Лютова М.И. Изменение термостабильности и кинетических свойств ферментов при адаптации растений к температуре // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 6. – С. 929–941.
- Рогожин В.В. Peroксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. – С.- Пб.: ГИОРД, 2004. – 240 с.
- Савич И.М. Peroксидазы – стрессовые белки растений // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 107, вып. 3. – С. 406–417.
- Тарабрин В.П., Кондратюк Е.Н., Башкатов В.Г. и др. Фитотоксичность органических и неорганических загрязнителей. – Киев.: Наук. думка, 1986. – 216 с.
- Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. Антиоксидантная активность листьев *Melilotus albus* и *Trifolium medium* из техногенно нарушенных местообитаний Среднего Урала при действии меди // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 3. – С. 369–375.
- Феник С.И., Трофимьяк Т.Б., Блюм Я.Б. Механизмы формирования устойчивости растений к тяжёлым металлам // Успехи современной биологии. – 1995. – Т. 11, № 3. – С. 231–275.
- Nair A.R., Showalter A.M. Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1996. – V. 226. – P. 254–260.

Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunandi C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // *Plant Cell Reports*. – 2005. – V. 24, No. 5. – P. 255–265.

Rout Gyana R., Samantaaray Sanghamitra, Premananda Das. Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L.) Link // *Chemosphere*. – 2000. – V. 40, No. 8 – P. 855–859.

Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Braz. J. Med. and Biol. Res.* – 2005. – V. 38, No. 7. – P. 995–1014.

THE STABILITY OF PEROXIDASE FROM THE LEAVES OF PLANTS IN TECHNOGENIC ECOTOPES TO THE ACTION OF PYRIDINE *IN VITRO*

E.N. Vinogradova

Public Institution "Donetsk Botanical garden», Donetsk, Ukraine, donetsk-sad@mail.ru

Abstract. The decrease of affinity to substrates and sensitivity to pyridine, emission ingredient, and peroxidase of *Populus deltoides* of man-made plantations was revealed, which may be one of the adaptation mechanisms that consisting in protective modifications of molecules of key enzymes. The decrease in sensitivity to pyridine peroxidase of the seed offspring of the *Bromopsis inermis* of the technogenic population indicates its achievement of the genotypic differentiation manifested in the inheritance of resistance to toxicants.

Keywords: *peroxidase, resistance, technogenic pollution, pyridine, adaptation mechanisms*