

ПІСЛЯДІЯ ГЕРБІЦИДІВ НА ГВАЯКОЛ-ЗАЛЕЖНУ ПЕРОКСИДАЗНУ СИСТЕМУ ПАРОСТКІВ КУКУРУДЗИ

Ткаліч Ю. І., доктор сільськогосподарських наук;

Матюха В. Л., кандидат сільськогосподарських наук

ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН України

Богуславська Л. В.

Науково-дослідний інститут біології Дніпропетровського національного університету ім. Олеса Гончара

У модельному експерименті визначено співвідношення фракцій пероксидази в корінцях та паростках кукурудзи після дії на них гербіцидів. Встановлено, що переважна частина ферменту перебуває у зв'язаному стані. Можливо, більш висока активність зв'язаних фракцій пероксидази в клітинах корінців і паростків кукурудзи певною мірою пояснюється стійкістю їх до гербіцидного навантаження.

Ключові слова: *пероксидаза, фракції, стрес, гербіциди, кукурудза.*

У сучасному світовому сільському господарстві застосовується значна кількість хімічних препаратів для захисту рослин від шкідників та хвороб, проте у виробничих умовах ці реагенти потребують правильного використання. Зокрема, актуальним є вивчення кінетики деградації гербіцидів та ступеня забруднення продуктів рослинництва даними речовинами. Відомо, що стигле зерно кукурудзи, вирощене на ділянках оброблених гербіцидами, містить деяку кількість цих препаратів [1]. Захисні механізми рослинного організму базуються на саморегуляції біохімічних процесів, які йдуть через зміни активності каталітичних властивостей ферментних систем [2]. Пероксидаза – фермент, який в першу чергу реагує на різні негативні впливи і виконує знешкоджувальну функцію щодо токсичних перекисних сполук та відіграє важливу роль в стійкості рослин [2]. Відомо, що ізоферменти пероксидази локалізуються в різних компартментах рослинної клітини [2–5]. Залежно від місця локалізації та рівня зв'язку з іншими компонентами клітини розрізняють вільну (розчинну), іонозв'язану та ковалентно зв'язану з гваяколом (субстрат) фракції пероксидази [4, 6–8]. Згідно з літературними даними вільна фракція пероксидази переважно локалізована в міжклітинному просторі, цитоплазмі, вакуолях, на клітинній стінці, а зв'язана – на мембранах та клітинній стінці [2, 7, 9].

Різні фракції ферменту пероксидази мають неоднакову чутливість до дії несприятливих факторів середовища [5, 6, 9, 10]. Найбільш висока активність та чутливість до дії стресу характерна для вільної та іонозв'язаної фракцій [6, 11]. За дії стресових факторів на клітину відбуваються зміни її субмолекулярної організації, які спричиняють розпадання слабких зв'язків надмолекулярних структур, що призводить до вивільнення частини упорядковано вбудованих у них білків. Унаслідок цих процесів змінюється співвідношення вільної та зв'язаних форм ферментів [10].

Існують відомості, що після фумігації рослин SO₂ частина зв'язаних компонентів пероксидази переходить в розчинну форму [2]. Можливо, подібні зміни локалізації пероксидази в рослинній клітині мають місце і за дії інших токсикантів. Отже, без дослідження взаємозв'язку ферментів з компартментами клітини важко отримати повні дані щодо їх ролі у стійкості рослин до стресорів.

Польові дослідження проводили у дослідному господарстві "Дніпро" Інституту сільського господарства степової зони.

Згідно з «Переліком пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні», селективний досходовий ґрунтовий гербіцид харнес вносили наприкінці квітня під передпосівну культивуацію (3–5 см) з негайною заробкою в ґрунт; післясходові – (аденго, стеллар, діален супер) – в фазі 3–5 листків у кукурудзи, наприкінці травня – на

початку червня 2012–2013 рр. В цей час у бур'янів відмічалася фаза 2–3 листків, тобто «розетки».

Гербицид харнес (діюча речовина – ацетохлор – 900 г/л) вносили проти однорічних злакових та деяких видів дводольних бур'янів в дозі 2,5 л/га. Після внесення препарат зосереджується у верхньому шарі ґрунту і діє на бур'яни, що проростають, шляхом надходження до тканин стебла та коренів, активно гальмуючи ріст та поділ клітин і тим самим порушуючи в них білковий та ліпідний обмін. У наших дослідах цей препарат контролював такі бур'яни, як: види щириці – на 83,7 %; амброзія полинолиста – на 78,3 %; портулак городній – на 70,2 %; види горцю – на 67,7 %, лобода біла – на 62,4 %.

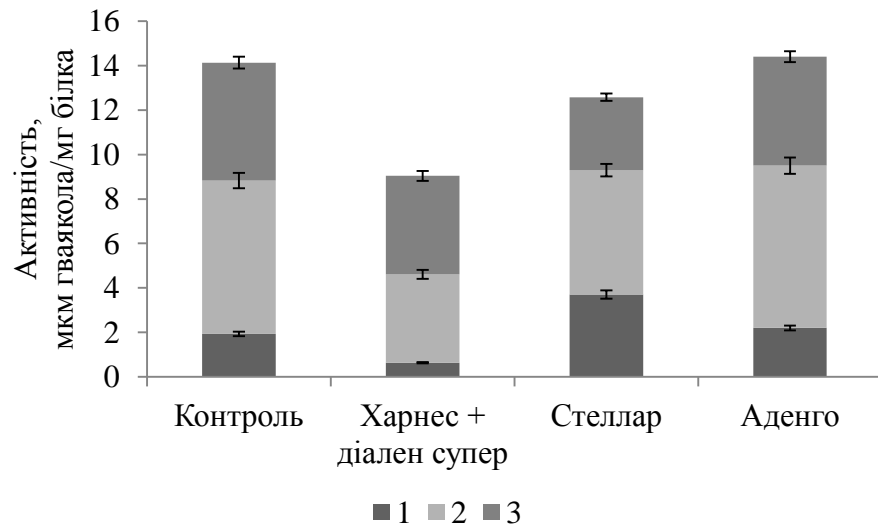
Препарат діален супер (464 SL) швейцарської фірми "Сингента" використовували у дозі 1,0 л/га як страховий по сходах кукурудзи на ділянках з гербицидом харнес. Його ефективність проявляється в знищенні злісних коренепаросткових багаторічників – осоту рожевого польового (знищує або пошкоджує до 82,7 % сходів цього бур'яну). До складу препарату входить 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (амінна сіль 2,4-Д), 344 г/га + дикамба, 120 г/га, чим і пояснюється його ефективна дія саме проти вищезгаданого багаторічника.

Гербицид стеллар (діюча речовина топрамезон – 50 г/л + дикамба – 160 г/л) вносили в дозі 1,25 л/га з прилипачем метолат – 1,25 л/га. Препарат значною мірою уможливує використання генетичного потенціалу кукурудзи, особливо за несприятливих погодних умов, і в першу чергу – за рахунок ефективної дії на важковикорінювані бур'яни (відзначається частковою ґрунтовою дією). У дослідах його вносили в фазі 3–5 листків у культурі, а в бур'янів у цей час відмічалися ранні фази розвитку.

Гербицид аденго (46,5 % SC, к. е.) – інноваційний досходовий та ранньопісляходовий гербицид системної дії проти однорічних широколистих та злакових бур'янів у посівах кукурудзи. Препарат подвійної дії. Одна з діючих речовин – ізоксафлютол (225 г/л) – добре поглинається переважно корінням та паростками бур'янів і діє як інгібітор біосинтезу каротиноїдів. Його дія на меристемні клітини бур'янів викликає знебарвлення молодих рослин. Інша діюча речовина – тіенкарбазон-метил, 90 г/л + ципросульфамід, 150 г/л – швидко потрапляє через листя та кореневу систему до організму бур'янової рослини.

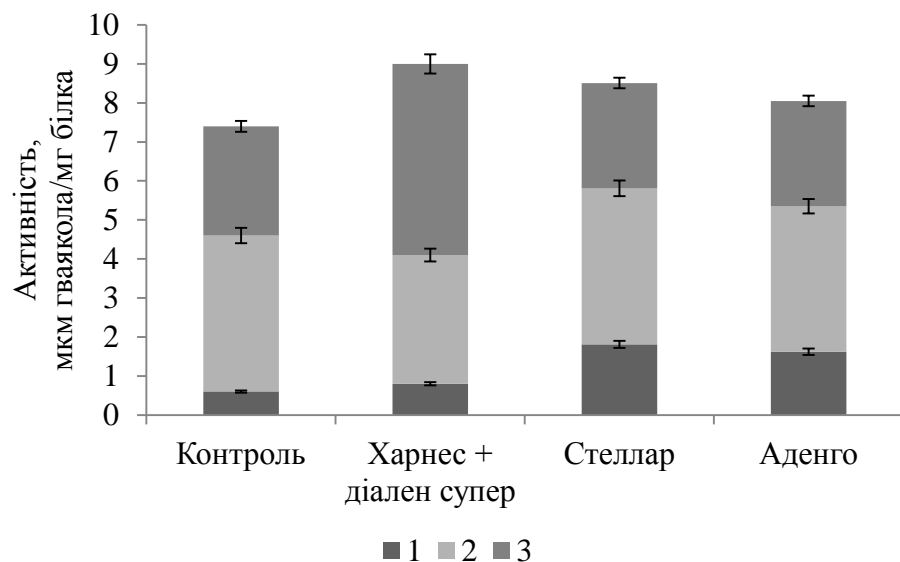
Дослідження проводили у модельному експерименті на п'ятидобових проростках середньораннього простого модифікованого гібрида кукурудзи Оржиця 237 МВ. Відібране насіння після польового експерименту замочували протягом 4-х годин в дистильованій воді, потім його переносили до термостату, де пророщували протягом 5-ти діб при температурі 27 ± 2 °С. Гомогенізацію та екстракцію рослинного матеріалу проводили за Н. І. Шевяковою [13]. Визначення активності вільної, іоно- та ковалентно зв'язаної з гваяколом форми пероксидаз у корінцях та паростках кукурудзи проводили за методом I. Ridge, модифікованим Н. І. Шевяковою із співавторами та подавали у мкм (мікромолях) гваякола/мг білка [13]. Дослідження здійснювали у триразовій повторності, отримані цифрові дані обробляли за допомогою t-критерію Стьюдента на 95 % рівні значущості [14].

У результаті дослідження активності фракції вільної пероксидази у корінцях паростків кукурудзи за дії гербицидів стеллар та аденго встановлено її збільшення на 92 та 14 % відповідно, а за сумісного впливу харнесу та діалену супер – зниження на 67 % (рис. 1).



1 – вільна фракція, 2 – іонозв'язана фракція, 3 – ковалентно зв'язана фракція

Рис. 1. Активність фракцій гваякол-пероксидази у корінцях 5-добових паростків кукурудзи (різниця вірогідна при $p < 0,05$).



1 – вільна фракція, 2 – іонозв'язана фракція, 3 – ковалентно зв'язана фракція

Рис. 2. Активність фракцій гваякол-пероксидази у 5-добових паростків кукурудзи (різниця вірогідна при $p < 0,05$).

Аналіз активності іонозв'язаної з гваяколом фракції ферменту корінців паростків кукурудзи виявив її зниження після дії стеллару, харнесу + діалену супер відповідно на 42 та 19 %, підвищення цього показника було на 6 % після дії аденго. За результатами дослідження активності ковалентно зв'язаної з гваяколом фракції ферменту встановлено її зменшення в усіх зразках порівняно з контролем.

Активність вільної фракції пероксидази паростків кукурудзи підвищувалась після дії всіх гербіцидів: на 33 % – після дії харнесу + діалену супер, а після впливу стеллару та аденго – у 2 рази (рис. 2).

Аналіз іонозв'язаної з гваяколом фракції ферменту показав підвищення її активності на 18 та 7 % за дії гербіцидів харнес + діален супер та аденго відповідно, за дії стеллару цей показник залишався на рівні контролю. Суттєве підвищення активності

ковалентно зв'язаної з гваяколом фракції пероксидази визначено як після дії комбінації гербіцидів (на 75 %), так і двох інших препаратів – на 4 %. Таким чином, після впливу гербіцидів спостерігався пере-розподіл пероксидази між гваякол-залежними фракціями в клітинах корінців та 5-добових паростків кукурудзи. Встановлено, що більша частина ферменту залишається у зв'язаному стані. Можливо, більш високий рівень активності зв'язаних з гваяколом фракції пероксидази в клітинах корінців і паростків кукурудзи деякою мірою пояснюється їхньою стійкістю до гербіцидного навантаження.

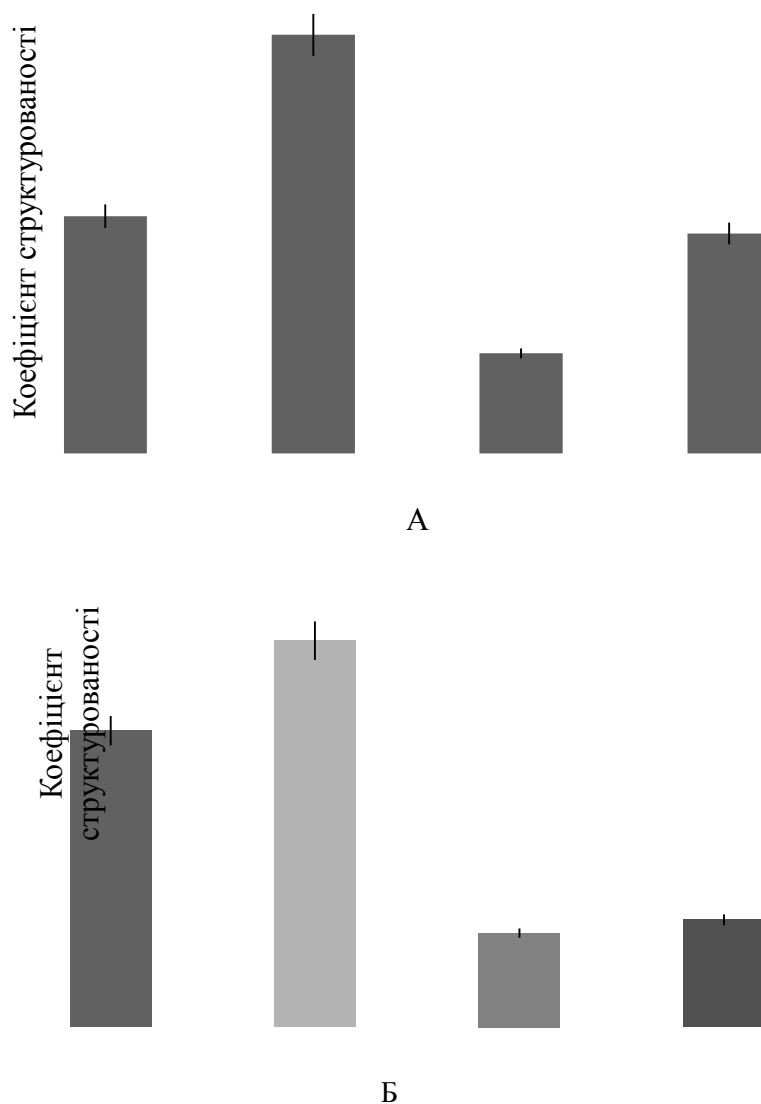


Рис. 3. Структурованість пероксидази в корінцях (А) та паростках (Б) кукурудзи після дії гербіцидів.

Для оцінки рівня зв'язку ферменту з мембранним матріксом використовують коефіцієнт структурованості, який дорівнює відношенню активності іонозв'язаної фракції до активності вільної [2]. Найбільший рівень зв'язку пероксидази з компарментами клітини виявлено в корінцях і паростках кукурудзи після сумісної дії гербіцидів порівняно з іншими варіантами досліду (див. рис. 3).

Найвищі значення коефіцієнта структурованості пероксидази встановлені після дії стеллару в паростках та корінцях, а аденго лише у паростках.

Відомо, що різні фракції пероксидази мають неоднаковий компонентний склад, але найбільша гетерогенність характерна для вільної фракції [2, 6]. Фракції ферменту можуть виконувати в клітині різну фізіологічну функцію. Так, вільну фракцію пероксидази вважають багатофункціональним ферментом [10]. Серед науковців не існує єдиної точки

зору щодо ролі іонозв'язаної фракції в захисних реакціях рослинної клітини. Дана фракція ферменту бере участь у процесах лігніфікації клітинних стінок та специфічних механізмах утилізації пероксиду водню. Зокрема, виявлена кореляція між збільшенням вмісту H_2O_2 і зниженням активності іонозв'язаної фракції пероксидази при інфікуванні та старінні рослин пшениці [2, 6]. У той же час іонозв'язана фракція, можливо, генерує активні форми кисню, які можуть бути сигнальними месенджерами, що індукують захисні реакції клітини [2, 12].

У результаті дослідження в корінцях паростків кукурудзи виявлено підвищення активності вільної фракції гваякол-залежної пероксидази після дії гербіцидів стеллар і аденго та іонозв'язаної з гваяколом фракції після впливу аденго. Активність ковалентно зв'язаної з гваяколом фракції пероксидази знижувалась після дії всіх гербіцидів. Активність гваякол-залежних фракцій пероксидази в паростках кукурудзи підвищувалась за дії гербіцидів. При пророщуванні насіння після дії гербіцидів найбільш чутливими до них виявилися корінці ростків кукурудзи.

Таким чином, в корінцях та паростках кукурудзи після дії гербіцидів змінюється співвідношення фракцій ферменту пероксидази. Більша частина пероксидази зв'язана іонними зв'язками з мембранами клітини, що проявляється у підвищенні активності іонно-та ковалентно зв'язаної фракцій пероксидази. Отримані результати співпадають з даними інших авторів [2] і свідчать, що для об'єктивної оцінки змін пероксидазної активності у рослин внаслідок дії гербіцидів необхідно враховувати вільну і зв'язану фракції ферменту.

Бібліографічний список

1. Хромых Н. А. Накопление и детоксикация ацетохлора в спелом зерне кукурузы и последствие гербицида / Н. А. Хромых // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. ["Геобиологические и биологические проблемы северного причерноморья"], (Тирасполь, 2001 р.). – Тирасполь, 2001. – С. 332–333.
2. Виноградова Е. Н. Сезонная динамика пероксидазной активности в листьях *Populus deltoids* Marsh. насаждений техногенно загрязненных территорий / Е. Н. Виноградова, И. И. Коршиков // Промышленная ботаника. – 2012. – Вып. 12. – С. 161–166.
3. Газарян И. Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидазы растений / И. И. Газарян, Д. М. Шушупульян, В. И. Тишков // Успехи современной химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303 – 322.
4. Veljovic-Jovanovic S. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica* / S. Veljovic-Jovanovic, B. Kukavica, B. Stevanovi // J. Exp. Bot. – 2006. – Т. 57. – Р. 1759–1768.
5. Gill S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S. S. Gill, N. Tuteja // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 48. – Р. 909–930.
6. Юсупова З. Р. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk. / З. Р. Юсупова, Р. М. Аруллин, И. В. Максимов // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 910–917.
7. Mika A. Localization der Peroxidase-Isoenzyme in protoplasten und Zell-Wander von *Nicotiana tabacum* L. / A. Mika, S. Lüthje // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 132, № 3. – Р. 1489–1498.
8. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth / [B. M. Kukavica, S. D. Veljovic-Jovanovic, L. Mentschkoff, S. Lüthje] // Journal of Experimental Botany. – 2014. – Vol. 63. – Р. 3–15.
9. Ghamsari L. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting / L. Ghamsari, E. Keyhani, S. Golkhoo // Iranian Biomedical Journal. – 2007. – Vol. 11, № 3. – Р. 137–146.
10. Колупасев Ю. С. Стресові реакції рослин: молекулярно-клітинний рівень / Ю. С. Колупасев; ХДАУ ім. В. В. Докучаєва. – Х., 2001. – 173 с.

11. *Холодова В. П.* Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрус-тальной 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.
12. *Колупаев Ю. Е.* Кальций и стрессовые реакции растений / *Ю. Е. Колупаев* // Вісн. Харківського нац. аграр. ун-ту. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 24–41. – (Серія Біологія).
13. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. *Вл. В. Кузнецова, В. В. Кузнецова, Г. А. Романова.* – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.
14. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / *Г. Ф. Лакин.* – М: Высш. шк., 1990. – 351 с.