

Актуальные вопросы защиты хвойных насаждений от корневых гнилей // Защита хвойных насаждений от вредителей и болезней.— Каунас, 1978.— С. 231—234. [13]. Фридерикс К. Экологические основы прикладной зоологии и энтомологии.— М.; Л.: Госиздат, 1932.— 650 с. [14]. Blanchard R. O., Shortle W. C. Mechanism relating cambial electrical resistance to periodis growth rate of balsamfir // Canadian J. of Forest Research — 1983 — Vol. 13, N 3.— P. 472—480. [15]. Klaus J., Christian T. Vitalitätsmessungen an Fichten und Kiefern mittels Digitalströmungsmessgeräten und Zusammenhänge mit ertragshundlichen Messgrossen // Allgem. Vol. 95, N 10.— S. 305—306. [16]. Tattar T. A., Forstzeitung.— 1984.— Blanchard R. O. Electrical techniques for disease diagnosis // J. of Arboricultur.— 1977.— Vol. 3, N 2.— P. 21—24.

Поступила 23 августа 1985 г.

УДК 581.1 : 577.150.4

ИЗМЕНЕНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ СПЕКТРОВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ СЕЯНЦЕВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОМА

Е. В. ЕРЕМКА, С. Ф. НЕГРУЦКИЙ

Донецкий государственный университет

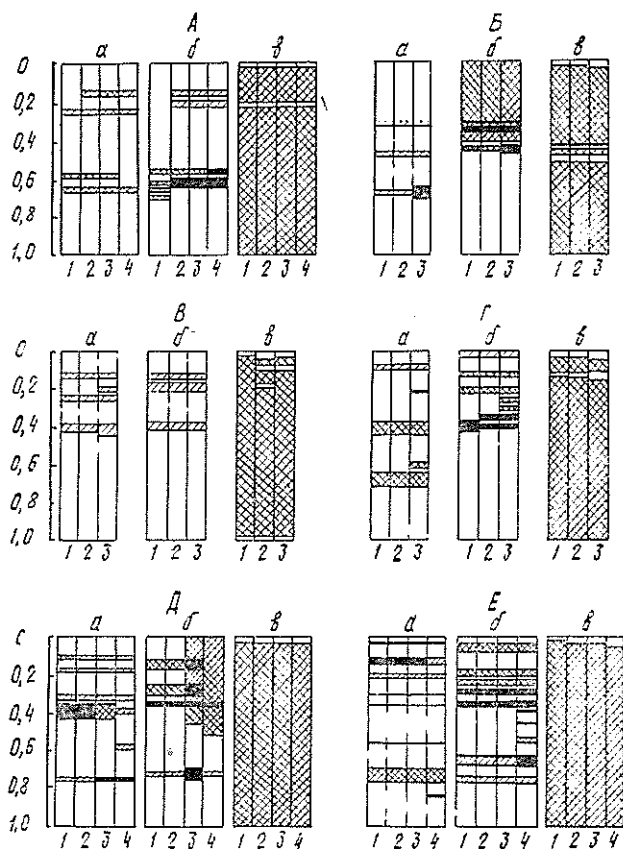
Основная роль в приспособлении растений к неблагоприятным факторам среды принадлежит ферментативным системам. В обеспечении нормального хода окислительных процессов в условиях промышленного загрязнения огромную роль играют полифенолоксидаза, пероксидаза, каталаза, обладающие высокой чувствительностью к фитотоксикантам.

Устойчивость к газообразным фитотоксикантам, как известно [2—4], проявляется в изменении активности пероксидазы, полифенолоксидазы и каталазы, которые дают возможность добывать растениям энергию, необходимую для поддержания жизнедеятельности. Изменение активности названных ферментов отражает проявление защитных свойств растений, свидетельствует о патологических сдвигах в общей системе дыхания. Имеются литературные сведения об изменении активности окислительных ферментов под воздействием тяжелых металлов [7]. Среди тяжелых металлов — компонентов промышленных выбросов шестивалентный хром в силу высокой химической активности обладает наибольшей фитотоксичностью [6].

Для исследования был избран электрофоретический метод, позволяющий выявить как качественные, так и количественные изменения в изоферментных спектрах оксидоредуктаз под воздействием различного рода фитотоксикантов, в том числе и тяжелых металлов.

Объектом исследований являлись полуторамесячные сеянцы робинии обыкновенной (*Robinia pseudoacacia* L.), сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.), ели европейской (*Picea excelsa* Link.), спиреи средней (*Spiraea media* Schmidt.), аморфы кустарниковой (*Amorpha fruticosa* L.) и жимолости татарской (*Lonicera tatarica* L.). Двухнедельные проростки названных растений пересаживали на питательную среду Кнопа, содержащую бихромат калия в следующих концентрациях по вариантам: I вариант опыта — $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, II — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л и III — $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. В контрольный вариант фитотоксикант не вводили. Наблюдения за состоянием растений вели в течение месяца. Выявлено, что токсическое действие хрома находится в прямой зависимости от его концентрации в среде, а также зависит от биологических особенностей видов. Так, сеянцы робинии обыкновенной, жимолости татарской и аморфы кустарниковой погибли на 3—5-й день после пересадки их на питательную среду с максимальным содержанием металла ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), в то время как сеянцы сосны обыкновенной, ели европейской и спиреи средней сохраняли жизнеспособность в этом варианте опыта. Учитывая высоту надземной части исследуемых растений, независимо от видовой принадлежности, их можно расположить в такой последовательности по вариантам: $K > I$ ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) $> II$ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) — для всех видов $> III$ ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) — для сеянцев спиреи, сосны и ели.

Изоферментные спектры оксидаз определяли методом электрофореза по В. И. Сафонову и М. П. Сафоновой [5]. На каждую электрофоретическую трубочку наносили



Схемы электрофореграмм изоферментов полифенолоксидазы (а), пероксидазы (б) и каталазы (в) семян спирей средней (А), аморфы кустарниковой (Б), жимолости татарской (В), акации белой (Г), сосны обыкновенной (Д) и ели европейской (Е): 1 — контроль; 2 — концентрация хрома в питательной среде $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 3 — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 4 — $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л

по 250 мкг белка. Количество белка определяли по Лоури [1, с. 275—276]. Электрофорез проводили при напряжении 600 В и силе тока на каждую электрофоретическую трубочку 4 мА в течение 80 мин.

Данные об электрофоретических исследованиях изоферментов полифенолоксидазы, пероксидазы и каталазы семян древесно-кустарниковых пород, подвергавшихся действию повышенных концентраций шестивалентного хрома, представлены в виде схем электрофореграмм (см. рисунок).

Электрофоретический спектр изоферментов полифенолоксидазы контрольных семян спирей средней (А, а, 1) состоял из трех белковых компонентов с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) 0,25; 0,58 и 0,65. В первом варианте опыта (А, а, 2), где содержание хрома в питательной среде было минимальным — $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, наблюдалось образование новой белковой зоны с ОЭП 0,15. Увеличение концентрации металла до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (А, а, 3) приводило к усилению окраски фракций с ОЭП 0,15 и 0,25. Максимальная доза фитотоксиканта $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л (А, а, 4) вызывала ослабление окраски указанных зон, а белковый компонент с ОЭП 0,58 исчезал. При определе-

нии изоферментов пероксидазы семян спиреи средней в контрольном варианте (*A, б, 1*) было обнаружено четыре изоформы этого энзима с ОЭП 0,57; 0,62; 0,65 и 0,70. Во всех опытных вариантах (*A, б, 2, 3, 4*) наблюдалось образование двух новых зон с ОЭП 0,16 и 0,22, а компоненты с ОЭП 0,65 и 0,70 исчезали, окраска белка с ОЭП 0,62 переходила в интенсивную, значительно возрастала ее ширина. Усиление окраски происходило и у белковой фракции с ОЭП 0,57 в III варианте опыта (*A, б, 4*). Электрофореграммы изоферментов каталазы контрольных и опытных семян спиреи средней содержали две белковые фракции с ОЭП 0,01 и 0,23. Ширина белковых зон в контроле и опытных вариантах сохранялась постоянной.

В контрольных семенах аморфы кустарниковой (*B, а, 1*), а также опытных (*B, а, 2, 3*) обнаружены три молекулярные формы белка полифенолоксидазы с ОЭП 0,33; 0,48 и 0,68. Ширина и окраска белковых зон в контроле и опытных вариантах вариационных отличий не имели, за исключением белковой фракции с ОЭП 0,68 (*B, а, 3*), где под воздействием фитотоксиканта возрастала ее ширина и усиливалась окраска. Электрофореграммы изоферментов пероксидазы семян аморфы кустарниковой как в контроле, так и в опыте имели весьма своеобразный характер (*B, б, 1, 2, 3*). На гелях имелись обширные окрашенные участки, на которых четко просматривались белковые зоны с ОЭП 0,33 и 0,36. Белковая фракция с ОЭП 0,44 в контроле имела интенсивную окраску (*B, б, 1*). В первом варианте опыта (*B, б, 2*) ширина ее не изменялась, но окраска значительно слабела. Во втором варианте опыта (*B, б, 3*) увеличивалась ее ширина и окраска из слабой переходила в интенсивную. Электрофоретические исследования изоферментов каталазы контрольных и опытных семян аморфы позволили обнаружить три изоформы белка с ОЭП 0,01; 0,45 и 0,50 (*B, в, 1, 2, 3*), размеры которых сохранялись постоянными, за исключением белкового компонента, расположенного на линии старта, ширина которого увеличивалась, что влекло за собой увеличение значения ОЭП — 0,03 (*B, в, 3*).

Изоферментный спектр контрольных семян жимолости татарской (*B, а, 1*) состоял из трех изоформ полифенолоксидазы с ОЭП 0,13; 0,25 и 0,40. Аналогичная картина прослеживалась на гелях первого варианта опыта (*B, а, 2*). Во втором варианте опыта (*B, а, 3*) наблюдалось появление новой белковой фракции с ОЭП 0,20, возрастала ширина компонента с ОЭП 0,40. В контрольном (*B, б, 1*), а также опытных вариантах (*B, б, 2, 3*) обнаружено три изоформы белка пероксидазы с ОЭП 0,13; 0,18 и 0,39, ширина и окраска которых под воздействием фитотоксиканта не изменялась. Две молекулярные формы белка каталазы с ОЭП 0,01 и 1,00 прослеживались на электрофореграмме контрольных семян жимолости татарской (*B, в, 1*). При минимальном содержании фитотоксиканта в среде (*B, в, 2*) были обнаружены две новые белковые зоны с ОЭП 0,08 и 0,18. Значение ОЭП белка, расположенного на линии старта, несколько сместилось (0,03) вследствие увеличения его ширины. Во втором варианте опыта (*B, в, 3*) наблюдалось сужение стартовой зоны, исчезла фракция с ОЭП 0,18.

При определении изоферментов полифенолоксидазы на электрофореграмме контрольных семян акации белой (*Г, а, 1*), а также первого варианта опыта (*Г, а, 2*) обнаружены три белковые зоны с ОЭП 0,08; 0,40 и 0,66. Увеличение дозы фитотоксиканта до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л (*Г, а, 3*) способствовало появлению новых компонентов с ОЭП 0,21 и 0,60. Четыре изофермента пероксидазы с ОЭП 0,02; 0,12; 0,20 и 0,39 выявлены на электрофореграмме контрольных семян акации белой. В первом варианте опыта (*Г, б, 2*) наблюдалось уменьшение ширины зоны с ОЭП 0,39 и появление нового компонента с ОЭП 0,34. Новые белковые фракции с ОЭП 0,27 и 0,32 появлялись во втором опытном варианте (*Г, б, 3*).

В контрольных и опытных сеянцах акации белой обнаружены две изоформы белка каталазы с ОЭП 0,02 и 0,12 (*Г, в, 1, 2, 3*). В I варианте опыта (*Г, в, 2*) под воздействием минимальной концентрации металла происходило увеличение ширины белковой фракции с ОЭП 0,12. Дальнейшее увеличение концентрации хрома (*Г, в, 3*) приводило к расширению обеих зон.

В контрольных сеянцах сосны обыкновенной (*Д, а, 1*) выявлено пять изоформ полифенолоксидазы, обладающих следующей ОЭП: 0,11; 0,18; 0,32; 0,39 и 0,74. В первом варианте опыта (*Д, а, 2*) наблюдался переход окраски из средней в слабую у зоны с ОЭП 0,11, а во II варианте (*Д, а, 3*) из интенсивной в среднюю у фракции с ОЭП 0,39 и из слабой в интенсивную у компонента с ОЭП 0,74. Максимальное содержание хрома в питательной среде (*Д, а, 4*) приводило к уменьшению ширины зоны с ОЭП 0,39 и ослаблению ее окраски, а также к образованию новой белковой фракции, обладающей ОЭП 0,58. Изоферментный спектр пероксидазы контрольных сеянцев сосны обыкновенной (*Д, б, 1*) включал четыре формы белка с ОЭП 0,15; 0,28; 0,36 и 0,72. Аналогичная картина наблюдалась и на проявленных гелях первого опытного варианта (*Д, б, 2*). На электрофореграмме второго опытного варианта (*Д, б, 3*) появлялся обширный окрашенный участок с белковыми зонами, встречающимися и в предшествующих вариантах. Слабая окраска фракции с ОЭП 0,72 переходила в интенсивную, увеличивалась ее ширина. В третьем варианте опыта (*Д, б, 4*) размеры окрашенного участка возрастали и оставалась выраженной лишь белковая зона с ОЭП 0,36. Слабела окраска фракции с ОЭП 0,72, уменьшалась ее ширина. В гелях сеянцев сосны обыкновенной белок каталазы располагался на линии старта и вариационных различий не имел (*Д, в, 1, 2, 3*). ОЭП белка равнялась 0,02.

Семь белковых зон с ОЭП 0,03; 0,13; 0,20; 0,30; 0,35; 0,55 и 0,73 обнаружено на электрофореграммах изоферментов полифенолоксидазы в контрольных сеянцах ели европейской (*Е, а, 1*), а также первом (*Е, а, 2*) и втором (*Е, а, 3*) опытных вариантах. Максимальная концентрация фитотоксиканта вызывала образование новой белковой фракции с ОЭП 0,83, а окраска белка с ОЭП 0,13 переходила из интенсивной в слабую. Энзимogramмы контроля (*Е, б, 1*), а также первого (*Е, б, 2*) и второго (*Е, б, 3*) вариантов опыта имели по семь пероксидазных зон, обладающих следующей ОЭП: 0,05; 0,18; 0,23; 0,28; 0,35; 0,65 и 0,75. В третьем опытном варианте (*Е, б, 4*) под воздействием максимальной концентрации металла происходило образование трех новых белковых компонентов с ОЭП 0,38; 0,45 и 0,55, значительно усиливалась окраска белка с ОЭП 0,65. В контроле (*Е, в, 1*) и всех вариантах опыта (*Е, в, 1, 2, 3*) белок каталазы располагался на линиях старта. С увеличением дозы металла ширина его возрастала, что приводило к некоторому смещению значений ОЭП: в контроле — 0,01, в первом и втором вариантах опыта — 0,03, в третьем — 0,04.

Выполненные исследования показали, что под воздействием повышенных концентраций шестивалентного хрома происходят изменения в изоферментных спектрах полифенолоксидазы, пероксидазы и каталазы: варьируют ширина и интенсивность окраски белковых зон, исчезают одни и появляются другие изоформы оксидаз. Этот процесс генетически обусловлен и носит защитный характер.

Белки изоферментов полифенолоксидазы, синтезированные под влиянием хрома, обладают различной электрофоретической подвижностью — низкой, средней и высокой, пероксидазы — низкой и средней, каталазы — низкой, что, очевидно, связано с приспособлением растений к неблагоприятным факторам среды, повышением их жизнеспособности.

ЛИТЕРАТУРА

- [1]. Ермаков А. И. Методы биохимического исследования растений.— Л.: Колос, 1972.— 456 с. [2]. Илькун Г. М. Газоустойчивость растений.— Киев: Наукова думка, 1971.— 146 с. [3]. Николаевский В. С. Роль некоторых окислительных систем в дыхании и газоустойчивости растений // Физиол. раст.— 1968.— Т. 15, № 1.— С. 110—115. [4]. Рачковская М. М., Ким Л. О. Изменение активности некоторых оксидаз как показатель адаптации растений к условиям промышленного загрязнения // Газоустойчивость растений.— Новосибирск: Наука, 1980.— С. 117—126. [5]. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений.— М.: Наука, 1971.— С. 113—136. [6]. Conttenc A., Dhaese A., Camerlynek R. Plant quality response to up take of poluting // Qual. plant.— 1976.— N 1—3.— P. 293—319. [7]. Flückiger M., Flückiger-Keller H., Oertli J. J. Der Einfluss verkehrsbedingter Luftverunreinigungen auf die Peroxydaseaktivität, das ATR-Bildungsvermögen isolierter Chloroplasten und das Längenwachstum von Mais // Z. Pflanzkrankh. und Pflanzenschutz., — 1978.— 85, N 1.— S. 41—47.

Поступила 10 ноября 1984 г.