

УДК 581.19; 577.012:632.9

ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СПЕКТР АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЗЛАКОВ И КАРТОФЕЛЯ

А.М. Манадилова, А.К. Турсунова, А.Ш. Утарбаева

*Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,
ул. Досмухамедова, 86, Алматы, 050012, Казахстан
man_alija@mail.ru*

АБСТРАКТ

Изучено влияние гербицидов (Глифосат, Гранстар) и фунгицидов (Тилт, Фундазол) на изоферментный профиль основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза.

Пестициды относятся к неспецифическим соединениям, действующим после прорастания растений и широко используемым для уничтожения сорняков, как на сельскохозяйственных, так и на несельскохозяйственных землях. Они используются повсюду, где требуется общий контроль за растительностью. Пестициды проникают в растения, главным образом, через зеленые части, но могут абсорбироваться коллоидами почвы и дальше поглощаться корнями растений.

Показано, что обработка растений пшеницы и картофеля пестицидами (Гранстар, Глифосат, Фундазол, Тилт) не оказывает существенного воздействия на изменение изоферментного спектра супероксиддисмутаза и каталазы; более чувствительной к обработке пестицидами оказалась пероксидаза. После обработки растений пшеницы Тилдом и Глифосатом (24 часа) происходит индуцированный синтез новых изоформ пероксидазы. Изучаемые растения оказались чувствительны к используемым ксенобиотикам.

Анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что исследуемые ферменты-антиоксиданты (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) способны адаптивно менять свою активность под влиянием пестицидов. При этом, в растительных организмах, для поддержания метаболизма кислорода на оптимальном уровне, клетками используются несколько путей приспособления к изменяющимся условиям, например, изменение некоторых физико-химических свойств ферментов-антиоксидантов, изменение их изоферментных спектров, а также изменение скоростей биосинтеза и распада СОД, КАТ и ПО. Это позволяет предполагать, что все изучаемые нами ферменты могут быть, по-видимому, отнесены к «стресс-специфичным» ферментам, но в большей степени растворимая пероксидаза.

Ключевые слова: пестициды, изоферментный спектр, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, пшеница, картофель.

THE EFFECT OF PESTICIDES ON ISOENZYME SPECTRUM OF CEREAL AND POTATO ANTIOXIDANT ENZYMES.

A.M. Manadilova, A.K. Tursunova, A.Sh. Utarbayeva

*The Institute of Molecular Biology and Biochemistry after M.A. Aitkhozhin, 86
Dosmukhamedova str., Almaty, 050012, Kazakhstan
man_alija@mail.ru*

ABSTRACT

The effect of herbicides (Glyphosate, Granstar) and fungicides (Tilt, Fundasol) on the isoenzyme profile of principal antioxidant enzymes: superoxidizedismutase, catalase and peroxidase, was studied.

Pesticides are related to nonspecific compounds that act after plants are grown and widely used to destroy pest both on agricultural and non-agricultural lands. Pesticides are commonly used when general control over vegetation is required. Pesticides get into plants mostly through green parts but may be absorbed by soil colloids and further taken in through plant roots.

It is shown that the treatment of wheat and potato plants with pesticides (Granstar, Glifosat, Fundazol, Tilt) does not significantly impact the change of isoenzyme spectrum of superoxide dismutase and catalase. More sensitivity to pesticide treatment was demonstrated by peroxidase. The treatment of wheat plants with Tilt and Glifosat (24 hours) results in the induced synthesis of new peroxidase isoforms.

The analysis of obtained results and studied literature allows to conclude that the studied enzymes-antioxidants (superoxide dismutase, catalase and soluble peroxidase) can adaptively change their activity under the influence of pesticides. At that, for oxygen metabolism maintained at optimum level, the plant organism cells use several ways to adapt to changing conditions. Among them are change of some physical and chemical properties of enzyme-antioxidants, change of their isoenzyme spectrums and change of biosynthesis and disintegration speed of SOD, CAT and PO. It allows assuming that all the enzymes being studied may apparently be related to stress-specific enzymes, particularly soluble peroxidase.

Key words: pesticides, isoenzyme spectrum, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, wheat, potato.

ВВЕДЕНИЕ

На культивируемые растения воздействует большое количество различных ксенобиотиков, в т.ч. пестициды. В результате их действия в растениях возникает дисбаланс между образованием активированных форм кислорода (АФК), возможностью их ликвидации и скоростью репарационных процессов в клетках, т.е. развивается окислительный стресс. В последнее время считается общепринятым, что в ответ на действие повреждающих факторов в растениях происходит интенсивная генерация активных форм кислорода (АФК), включая пероксид водорода (H_2O_2), супероксид (O_2), синглетный кислород ($O_2\bullet$) и гидроксил-радикал ($\bullet OH$). АФК вызывают денатурацию белков и нуклеиновых кислот, а также перекисное окисление липидов (ПОЛ). Усиленное образование АФК является одной из ранних реакций растения на повреждающее воздействие [1].

В растениях существует многоступенчатая система защиты от чрезмерного образования АФК, которая включает неферментативные антиоксидантные соединения и антиоксидантные ферменты – супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза (ПО), каталаза (КАТ) и др.) [2].

СОД (КФ1.15.1.1.) является ключевым ферментом, лимитирующим процессы превращения супероксидного радикала в другие активные формы кислорода (прооксиданты), т.к. катализирует реакцию образования перекиси водорода из супероксидного анион-радикала. Характерной особенностью клеток растений является наличие трех изоформ СОД – $CuZnCO_2$, $MnCO_2$, $FeCO_2$. Отличительной особенностью растительной СОД является множественность изоформ разных форм СОД. Так, в клетках листьев кукурузы обнаружено 9 изоформ СОД [3], позднее полиморфные СОД были обнаружены в таких растениях как овес, горох, ячмень, соя, причем в каждой из них выявлено разное количество форм СОД. Все изоформы объединяет функция дисмутации супероксидных радикалов [4, 5].

КАТ (КФ 1.11.1.6) представляет собой гемосодержащий фермент с M_r около 250 кДа, катализирующий разложение H_2O_2 на воду и молекулярный кислород. Этот фермент является одним из важнейших в системе антиоксидантной защиты большинства организмов [6, 7]. КАТ – компонент комплексной ферментативной защиты организма от токсичных соединений кислорода. У подавляющего большинства видов растений наблюдается множественность форм КАТ, хотя для фасоли и чечевицы идентифицирована единственная каталаза. У кукурузы идентифицировано три электрофоретически отличных изофермента КАТ; пять каталитически активных фермента обнаружены у хлопчатника, у тыквы выделены два типа мономерных субъединиц и восемь изоферментных форм каталазы, отличающихся по заряду и молекулярной массе, обнаружены в семядолях подсолнуха [8].

Особая роль в защитной реакции растительной клетки на патогенез принадлежит пероксидазам [9, 10]. Одной из главных функций пероксидазы при патогенезе является утилизация активных форм кислорода (АФК), образующихся при окислительном взрыве.

ПО (КФ 1.11.1.7) – оксидоредуктаза является ключевым ферментом окислительно-восстановительного обмена, широко распространена в органах растений и обладает разнообразной субстратной специфичностью. ПО является полифункциональной, гетерогенной по изоэнзимному составу и подвергается значительной изменчивости под действием неблагоприятных условий среды [11, 12].

Ферменты антиоксидантной защиты СОД, КАТ, ПО действуют как сильные радиопротекторы, принимая участие в изъятии кислородных метаболитов и свободных радикалов.

Пестициды – одна из групп соединений, которые человек в последнее время все шире применяет в сельскохозяйственных целях. Из-за чрезмерного и научно необоснованного использования они выступают одними из важных факторов загрязнения окружающей среды. Поступая в организм с водой, воздухом и пищей, пестициды воздействуют на ход обменных процессов, вызывая патологические изменения функций [13].

Гербициды представляют класс ксенобиотиков, которые обычно используются для управления ростом и воспроизведением нежелательной растительности. Это структурно неоднородная группа, оказывающая неблагоприятное действие после проникновения в растение. Однако механизмы действия гербицидов, принадлежащих к различным группам, существенно разнятся, и неизвестно, все ли гербициды оказывают такой оксидативный эффект на растения. Поэтому изучение ответных реакций нецелевых (культурных) растений на обработку гербицидом позволит выяснить вклад систем антиоксидантной защиты в механизм избирательности [14].

Характеристика используемых гербицидов (Глифосат, Гранстар) и фунгицидов (Тилт, Фундазол)

Глифосат (*N*-(фосфонометил) – глицин, $C_3H_8NO_5P$) – неселективный системный гербицид, использующийся для борьбы с сорняками, особенно многолетними. Глифосат является *N*-фосфонометильным производным аминокислоты глицина. Токсическое действие глифосата обусловлено тем, что этот гербицид ингибирует фермент растений 5-еноилпирувил-шкимаат-3-фосфат-синтазу. Глифосат оккупирует в активном центре фермента место фосфоенолпирувата и блокирует его активность. Поэтому при попадании глифосата на растение он проникает в клетки, блокирует синтез ряда необходимых соединений, и растение погибает [15].

Гранстар – системный гербицид, сульфонил мочевиновый, избирательного действия, послевсходовый. Препарат применяется в малых дозах и высоко эффективен при борьбе с широколиственными сорняками в посевах зерновых культур. Воздействует на ферменты, характерные только для растений (подавляет деление клеток), первые симптомы, в том числе хлороз, некроз, появляются через несколько дней после обработки, а через 1-2 недели сорняки погибают [16].

Тилт применяется на зерновых колосовых в борьбе с самыми вредоносными заболеваниями листьев, стебля и колоса. Тилт имеет наиболее широкий спектр фунгицидной активности, обеспечивает длительный защитный эффект при профилактическом опрыскивании на протяжении 3-4 недель. Действующее вещество – пропиконазол относится к группе триазолов, проявляет системную активность. Препарат поступает в растения через листья и стебли и перемещается акропетально. Он обладает продолжительным защитным, лечущим и истребительным действием на возбудителей болезни, прекращает их дальнейшее развитие и подавляет у них спорообразование [17].

Фундазол – многофункциональный системный фунгицид, обладает системными свойствами, эффективно подавляет многие грибные заболевания. Действующий компонент беномил, проникая в растение, частично преобразуется в карбендазим. Взаимодействие беномила и карбендазима останавливает процесс деления клеток патогенов. Поглощение препарата происходит через листья и корни культуры, с перемещением вверх [17].

Целью работы является сравнительное изучение воздействия пестицидов различных классов на развитие окислительного стресса (изменение изоферментного спектра) в побегах и корнях озимой пшеницы сорт Богарная 56 (*Triticumaestivum*), и пробирочных растений картофеля сорт Аксор (*Solanumtuberosum* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 3-недельные пробирочные растения картофеля Аксор (среда МС, высота побегов 8-10 см), длина корней 1-2 см и 4-дневные побеги и корни пшеницы Богарная 56.

Исследовали изоферментные спектры КАТ, СОД, ПО побегов и корней пшеницы и пробирочных растений картофеля до и после обработки пестицидами.

Концентрация гербицида Гранстар: Контроль – вода; 1 – 0,03 мг (норма); 2 – 0,09 мг (в 3 раза выше нормы); 3 – 0,01 мг (в 3 раза ниже нормы).

Концентрация гербицида Глифосат: Контроль, вода; 1 – 4 мл/м² (норма); 2 – 40 мл/м² (в 10 раз выше нормы); 3 – 0,4 мл/м² (в 10 раз ниже нормы).

Концентрация фунгицида Фундазол: Контроль, вода; 1 – 2 г/кг (норма); 2 – 4 г/кг (в 2 раза выше нормы); 3 – 1 г/кг (в 2 раз ниже нормы).

Концентрация фунгицида Тилт: Контроль, вода; 1 – 0,03 мг (норма); 2 – 0,09 мг (в 3 раза выше нормы); 3 – 0,01 мг (в 3 раза ниже нормы).

Подбор концентраций пестицидов проводили на основе литературных данных и практике практического использования [18, 19, 20].

Разделение изоформ ферментов проводили методом нативного электрофореза по модифицированному методу Laemmli [21]. Электродный буфер (рН 8,3) содержал 50 мМ Трис-НСl, 300 мМ глицина. В каждую лунку наносили 55 мкл белка. Электрофорез проводили при температуре 4°C и 120 V в течение 3 ч.

Визуализацию изоферментов супероксиддисмутазы проводили модифицированным методом Meratan A.A., Ghaffari S.M., Niknam V. [22]. После электрофореза гели промывали 2 раза бидистиллированной водой, затем выдерживали 45 мин в темноте в окрашивающем растворе, содержащем 0,2 М Трис (рН 8,0), 4 мг рибофлавина, 4 мг Na-EDTA, 20 мг NBT (нитросиний тетразолий хлорид). Затем гели промывали дистиллированной водой и освещали люминесцентной лампой при температуре 20-25°C до проявления полос СОД.

Визуализацию изоформ каталазы проводили модифицированным методом Rahnama H., Ebrahimzadeh H. [23]. После электрофореза гели промывали дистиллированной водой, а затем 10-15 мин обрабатывали 0,01% раствором перекиси водорода. Окрашивание гелей проводили в течение 10 мин в растворе, содержащем 2% FeCl₃ и 2% K₃Fe(CN)₆.

Электрофорез пероксидазы проводили в тех же условиях, что и для каталазы, но с модификациями Chen Zhong, Su Weiai, Tang Zhangcheng [24].

Изоэлектрофокусирование проводили с помощью амфолинов в диапазоне рН 4,0–9,0 в ультратонких 7% пластинках ПААГ [25].

Все определения проводили в трех независимых опытах, состоявших из 3-х биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пестицидов на изоферментный состав СОД в растениях пшеницы и картофеля

Идентификация изоформ СОД в побегах и корнях пшеницы, проводимая методом ПААГ-электрофореза, показала присутствие в контрольных и опытных растениях двух изоформ СОД (рис. 1).

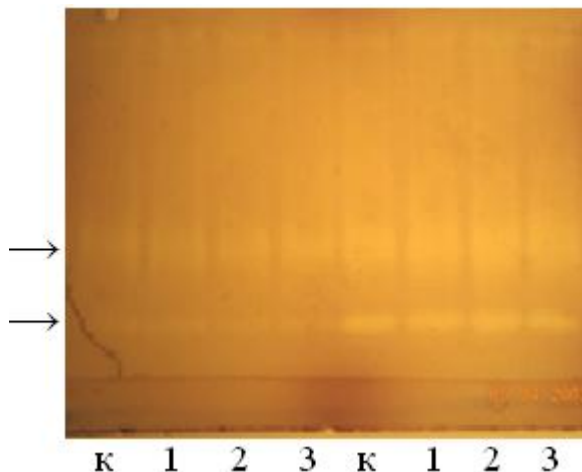


Рис. 1. Электрофорез ПААГ после проявки на активность СОД через 3 часа после обработки пшеницы Гранстаром; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни; контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; 1, 2, 3 – соответствует концентрации пестицида (см. выше)

Fig. 1. Electrophoresis in PAAG after detection of SOD in a 3 hour after treatment of wheat with Grantstar; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots; contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts

Анализ изоферментного спектра пшеницы, после обработки Гранстаром, выявил в побегах две хорошо выраженные изоформы; в корнях – две слабо выраженные изоформы. Обработка гелей перекисью водорода, инактивирующей Cu, Zn-СОД и Fe-СОД, показала, что изоформы 1-2 представляют собой изоферменты Mn-СОД. Сходные по изоферментному составу белковые профили получены в контроле и в опытном варианте.

Авторами [26] на ячмене и пшенице были также изучены две формы СОД, обусловленные двумя локусами: Sod S и Sod F, контролирующими фермент в медленно- и быстроподвижной зоне зимограммы.

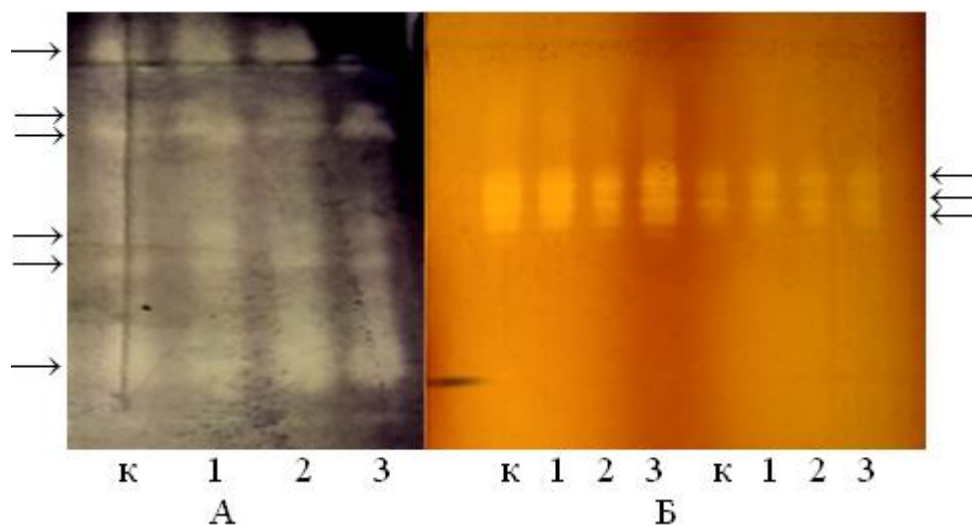


Рис. 2. Электрофорез ПААГ после проявки на активность СОД через 3 часа после обработки пшеницы (А) и картофеля (Б) Фундазолом; контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 2. Electrophoresis in PAAG after detection of SOD in a 3 hour after treatment of wheat(A) and potato (B) with Fundasol; contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

Сходные по изоферментному составу белковые профили получены в контроле и после обработки побегов пшеницы Фундазолом (рис. 2). Методом электрофореза выявлено 6 изоформ как в контроле, так и в образцах; при концентрации пестицида в 3 раза ниже нормы происходит уменьшение состава изоформ. Анализ изоферментного спектра СОД в картофеле (Б) показал наличие трех изоформ. В побегах активность полос выше, чем в контроле, но различий между контролем и опытными вариантами не выявлено.

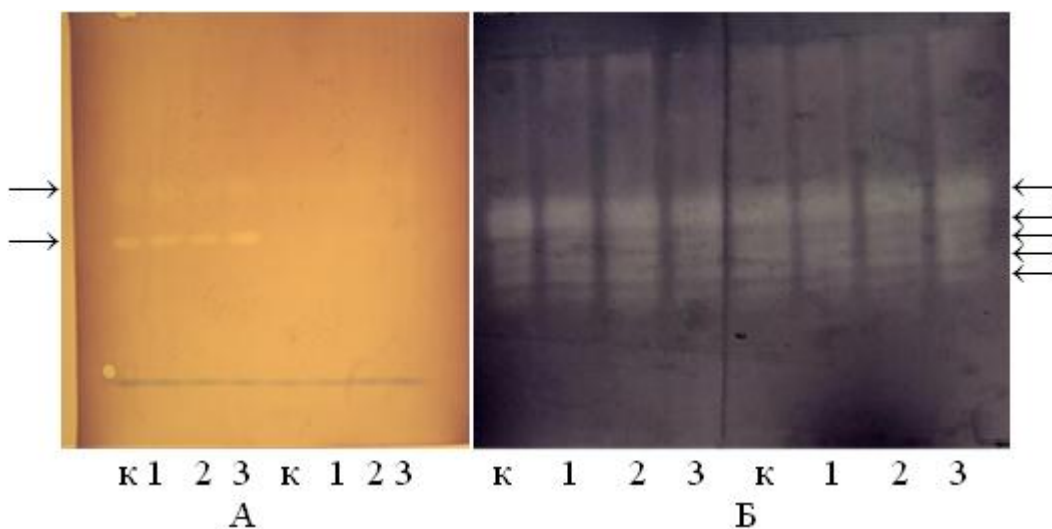


Рис. 3. Электрофорез ПААГ после проявки на активность СОД через 24 часа после обработки пшеницы Глифосатом (А), и картофеля (Б) Гранстаром, 6 часов; контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 3. Electrophoresis in PAAG after detection of SOD in a 24 hour after treatment of wheat with Glyphosate (A) and potato (B) with Grantstar, 6 hour; contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

Опрыскивание проростков пшеницы Глифосатом выявило в побегах 2 изоформы, одна из которых с высокой активностью, различий между вариантами нет; в корнях изоформы не выявлены.

Белковые профили картофеля, полученные в контроле и в вариантах, обработанных гербицидом Гранстар, во всех вариантах совершенно идентичны; выявлено пять изоформ.

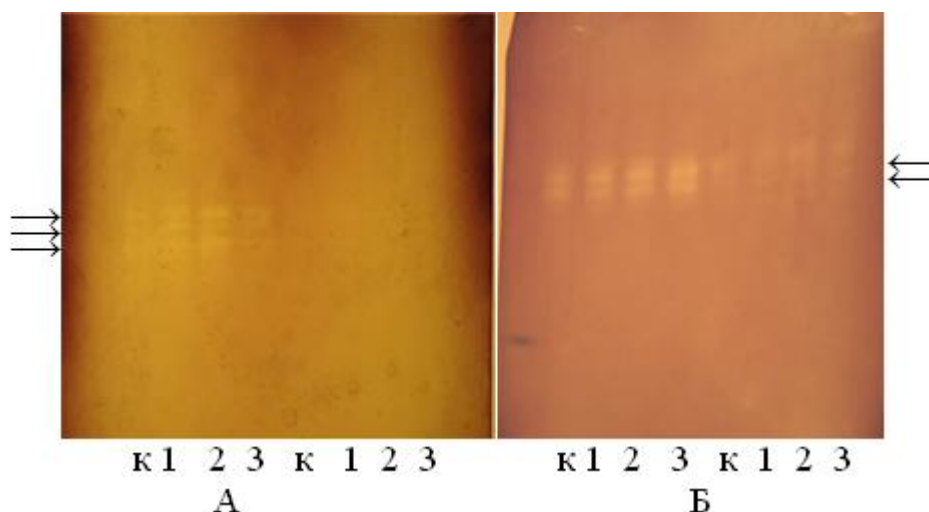


Рис. 4. Электрофорез ПААГ после проявки на активность СОД картофеля, после обработки Гранстаром (А) и Тилтом (Б), 3 часа; контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 4. Electrophoresis in PAAG after detection of SOD after treatment of potato with Grantstar (A) and Tilt (B); contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

При обработке растений картофеля Гранстаром в побегах появляются три изоформы, в контроле очень слабо выражены. При обработке растений Тилтом в побегах проявилось две хорошо выраженные полосы, в корнях очень слабые.

Идентификация изоформ СОД в проростках и корнях пшеницы показала, что при обработке пшеницы гербицидами в побегах проявляются хорошо активные две изоформы фермента; после обработки фунгицидом Фундазол выявлено шесть полос с хорошей активностью как в побегах, так и в корнях. В растениях картофеля обработка Фундазолом и Гранстаром ведет к активированию изоформ в побегах и корнях; под действием Тилта происходит активирование изоформ только в побегах. Различий с контрольными растениями не выявлено.

Таким образом, изоферментный спектр злаковых и картофеля (в контрольном и опытном вариантах) существенно не меняется после обработки пестицидами, однако наличие изозимов СОД обеспечивает стрессовую устойчивость растений, и защитная роль изучаемых ферментов проявляется, скорее всего, в повышении их активности.

СОД играет важную роль в защите клеток и тканей от окислительных повреждений при действии неблагоприятных факторов. Однако при работе СОД образуется пероксид водорода, который является ингибитором фермента. Поэтому эффективное функционирование СОД в значительной степени определяется функционированием других компонентов системы защиты, в частности тех, которые удаляют пероксид углерода (КАТ, ПО).

Литературные данные о роли каталазы в формировании взаимоотношении растение – пестицид противоречивы. Сообщалось о различных ответных реакциях каталазы у устойчивых растений; от сильной активации овса при заражении ржавчиной до снижения активности у пшеницы, пораженной стеблевой ржавчиной.

Влияние пестицидов на изоферментный состав КАТ в растениях пшеницы

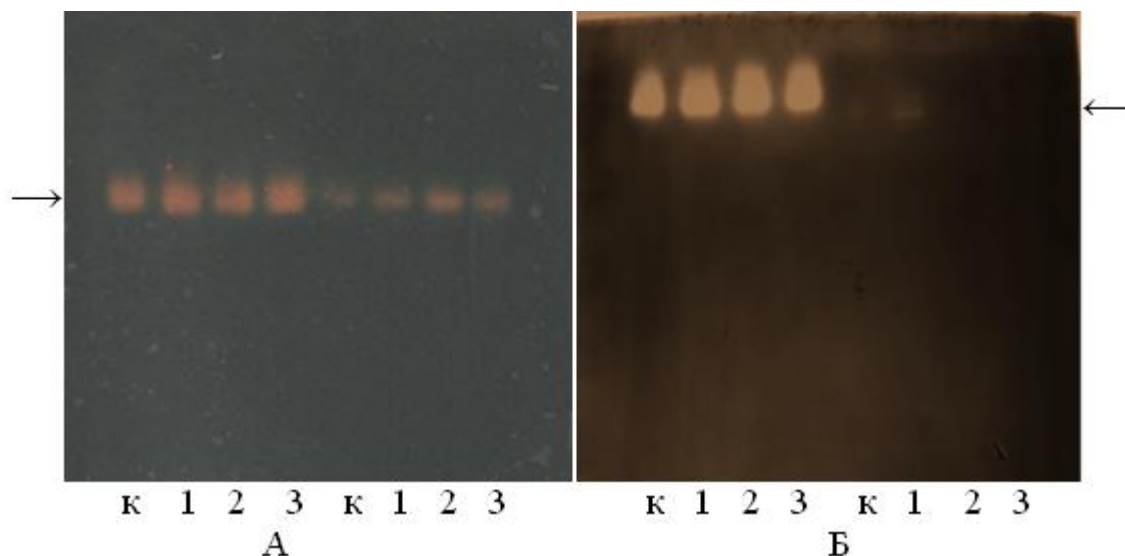


Рис. 5. Электрофорез ПААГ после проявки на активность каталазы в пшенице, обработанной Гранстаром, 24 часа (А) и Тилтом, 6 часов (Б); контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 5. Electrophoresis in PAAG after detection of CAT of wheat after treatment with Grantstar, 24 hour (A) and potatowith Tilt, 6 hour (B); contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

В побегах пшеницы, обработанной Гранстаром, обнаружена одна изоформа, различий между образцами нет; в корнях – также одна изоформа, активность которой выше во втором образце, где концентрация пестицида в три раза выше нормы. В побегах пшеницы, обработанных Тилтом, проявилась очень хорошо одна изоформа; в корнях – очень слабо одна изоформа в варианте при нормальной концентрации раствора.

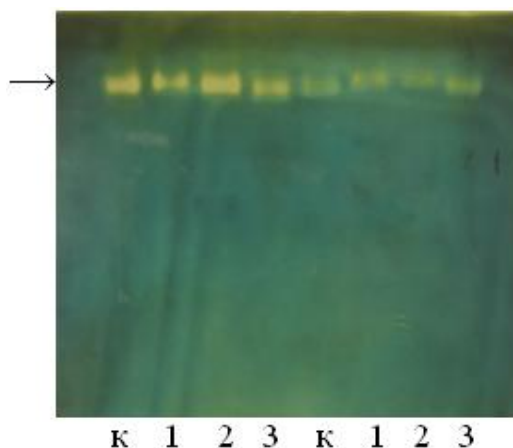


Рис. 6. Электрофорез ПААГ после проявки на активность каталазы в пшенице, обработанной Глифосатом, 6 часов; контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 6. Electrophoresis in PAAG after detection of CAT of wheat after treatment with Glyphosate, 6 hour; contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

Обработка пшеницы Глифосатом выявило одну изоформу; наибольшая активность отмечается в варианте при концентрации фунгицида выше нормы.

Таким образом, обработка пшеницы пестицидами выявила в побегах одну хорошо выраженную изоформу каталазы; в корнях пшеницы влияние пестицидов менее выражено. Существенного различия по активности каталазы после обработки разными пестицидами не отмечено, различия наблюдаются только по органам растения. При анализе изоферментного состава каталазы во всех вариантах выявлена одна изоформа, что соответствует литературным данным [27].

Влияние пестицидов на изоферментный состав ПО в растениях пшеницы и картофеля

Одним из наиболее важных антиоксидантных ферментов, являющихся показателем неспецифического иммунитета, является пероксидаза, активность и спектры изоформ которой меняются под действием биологических и небиологических агентов.

Пероксидаза является полифункциональной, гетерогенной по изозимному составу и подвергается значительной изменчивости под действием неблагоприятных условий среды.

Отдельные изоформы этого фермента по-разному отзываются на обработку пестицидами.

Изоферментный спектр пероксидазы пшеницы, здоровых и обработанных Фундазолом, почти идентичен, в корнях появляется новая изоформа с рI 4.9 (рис. 7).

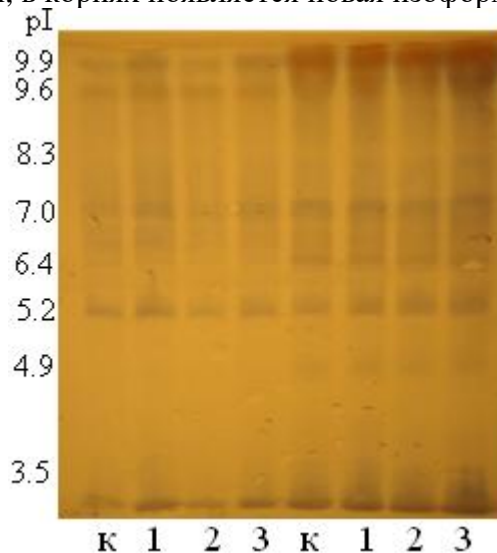


Рис. 7. Изоферментные профили растворимой пероксидазы в побегах пшеницы, обработанных Фундазолом, контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 7. Isoenzyme s profiles of solvent peroxidase in wheat after treatment with Fundasol, contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

Обработка пшеницы Фундазолом показала повышение активности щелочных изоформ в побегах (норма и ниже нормы); в корнях в опытных вариантах активируются нейтральные и щелочные формы.

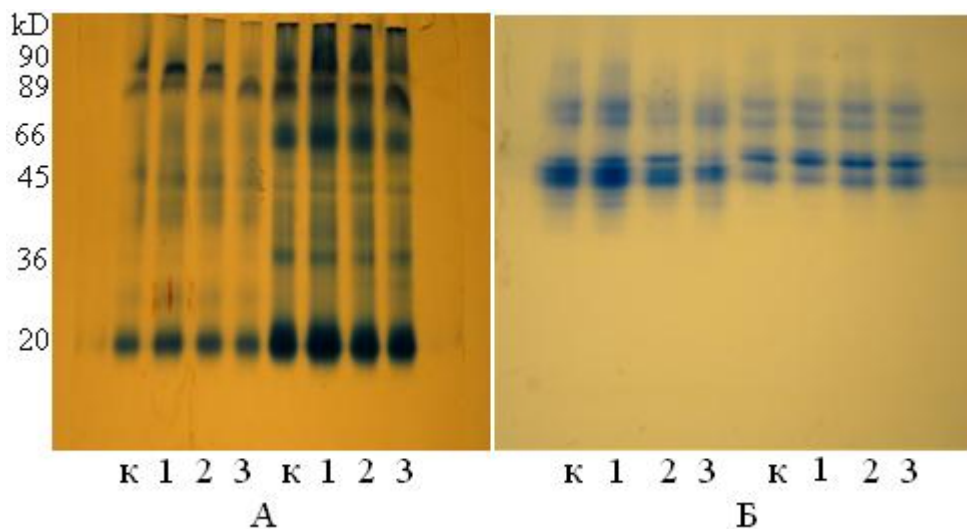


Рис. 8. Электрофорез ПААГ после проявки на активность растворимой пероксидазы в пшенице (А), обработанной Тилтом, и в картофеле, обработанном Фундазолом (Б), 24 часа; контр. – контр. – побеги; 1 – побеги; 2 – побеги; 3 – побеги; контр. – корни; 1 – корни; 2 – корни; 3 – корни

Fig. 8. Electrophoresis in PAAG after detection of solvent peroxidase in wheat(A) after treatment with Tilt, 24 hour (A) and potato after treatment with Fundasol, 6 hour (B); contr. – sprouts; 1 – sprouts; 2 – sprouts; 3 – sprouts; contr. – roots; 1 – roots; 2 – roots; 3 – roots

Обработка растений пшеницы Тилтом усилила активность как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных пероксидаз в побегах (норма и выше нормы); а в корнях изоферментный спектр во всех вариантах идентичен.

Анализ изоферментов пробирочных растений картофеля (Б) выявил наличие только высокомолекулярных форм пероксидазы, как в побегах, так и в корнях. Хотя спектры изопероксидаз побегов картофеля при обработке фунгицидом мало отличаются как в побегах, так и в корнях, однако активность анионных пероксидаз в побегах (норма) несколько выше по сравнению с необработанными растениями. Об этом можно судить по возрастанию интенсивности окрашивания изоформ.

ВЫВОДЫ

Анализ полученных результатов и данных литературы позволяет сделать заключение о том, что исследуемые ферменты-антиоксиданты (супероксиддисмутаза, каталаза, растворимая пероксидаза) способны адаптивно менять свою активность под влиянием пестицидов. При этом в растительных организмах для поддержания метаболизма кислорода на оптимальном для клеток уровне клетками используются несколько путей приспособления к изменяющимся температурным условиям, например, изменение некоторых физико-химических свойств ферментов-антиоксидантов, изменение их изоферментных спектров, а также изменение скоростей биосинтеза и распада СОД, КАТ и ПО.

Суммируя вышеприведенные результаты, можно заключить, что обработка растений пшеницы и картофеля пестицидами не оказывает существенного воздействия на изменение изоферментного спектра супероксиддисмутазы и каталазы; отмечаются некоторые различия в активности и изоферментном спектре пероксидазы.

Нашими исследованиями было выявлено различие по действию пестицидов на изоферментный спектр ферментов. Так, после обработки пшеницы Гранстаром отмечено появление 2 изоформ СОД в побегах, и 6 полос после обработки Фундазолом.

Опрыскивание пробирочных растений картофеля Гранстаром ведет к появлению 3-х изоформ через 3 часа после обработки, и 5 полос после 6 часов. Различия в изоферментном составе КАТ после обработки разными пестицидами не были выявлены.

Показано, что обработка растений пшеницы и картофеля пестицидами приводит к изменению изоферментного спектра ПО, но не оказывает существенного влияния на КАТ и СОД.

Несмотря на важную роль ферментов в детоксикации АФК при стрессах различной этимологии, стоит признать, что энзиматическая антиоксидантная система не обеспечивает стопроцентной защиты клетки от гибели. Это связано, прежде всего, с тем, что ферменты расположены в различных тканевых структурах и клеточных компартментах, имеют разную субстратную специфичность и сродство к активным формам кислорода. Кроме того, при действии стрессов на растения наблюдается быстрая инактивация конститутивного пула антиоксидантных ферментов. Эти данные обусловили появление точки зрения о том, что низкомолекулярные органические антиоксиданты в ряде случаев способны более эффективно осуществлять защиту метаболизма от АФК [28].

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта 25/ГФ1 «Молекулярно-биологические, биохимические и технологические основы для повышения продовольственной безопасности» на 2012-2014 гг. Задание: «Разработка биохимической тест-системы для скрининговой оценки безопасности пестицидов в продуктах питания».

ЛИТЕРАТУРА

1. Сошкина Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Theilingiella salicifolia* при окислительном стрессе // *Физиология растений*. – 2013. – Т. 60, №1. – С. 47-60.
2. Sbartai H., Djebbar M.R., Rouabhi R. et al. Antioxidative Response in Tomato Plants *Lycopersicon esculentum* L. Roots and Leaves to Zinc // *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. – 2011. – №3. – P. 41-46.
3. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // *Цитология*. – 2006. – Т. 48, №6. – С. 465-474.
4. Романова Е.В. Изоферментный состав и подвижность супероксиддисмутазы амаранта // *Объединенный научный журнал. Сельское хозяйство*. – 2005. – №9(137). – С. 79-80.
5. Bakalova S., Nikolova A., Nedeva D. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by stress and ABA during germination of wheat seeds // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 30(1-2). – P. 64-77.

6. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Регуляция активности каталазы в колеоптилях пшеницы: возможная роль ионов Ca^{2+} и кальмодулина // Вестник Харьковского Национального Аграрного Университета. Серия Биология. – 2008. – Вып. 1(13). – С. 15-21.
7. Beauchamp C. Superoxide dismutase // *Analytical Biochemistry*. – 1971. – Vol. 44. – P. 276-287.
8. Мирошниченко О.С. Биогенез. Физиологическая роль и свойства каталазы // *Биополимеры и клетка*. – 1992. – Т. 8, №6. – С. 6-21.
9. Минабаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность экстракционной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // *Физиология растений*. – 2003. – Т. 50, №3. – С. 459-464.
10. Huckelboven R., Kogel K.H. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance // *Planta*. – 2003. – №6. – P. 891-902.
11. Андреева В.А. Ферментпероксидаза. – М.: Наука, 1988. – 130 с.
12. Almagro L., Gómez Ros V., Belchi-Navarro S. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions // *Life Sciences Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol. 60, Issue 2. – P. 377-390.
13. Максимов И.В., Валеев А.Ш., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г. Продукция активных форм кислорода в листьях пшеницы, инфицированных разновидулетными штаммами *S. Nodorum Berk* // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2009. – Т. 46, №4. – С. 481-486.
14. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Яковец О.Т. Оценка избирательности действия пестицидов на растения. – Минск: БГУ, 2011. – 68 с.
15. Schönbrunn E. et al., Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail, *PNAS*. – 2001. – №98. – P. 1376-1380.
16. Лунев М.И. Пестициды и охрана агрофитоценозов. – М.: Колос, 1992. – 269 с.
17. Кириан С.А., Сементьева Л.Ш., Контор Е.А., Тюрина Е.А. Структурно-функциональные характеристики различных типов пестицидов // *Агрехимия*. – 2008. – №2. – С. 22-25.
18. Гарькова А.Н., Русяева М.М., Нуштаева О.В., Аросланкина Ю.Н., Лукаткин А.С. Обработка гербицидом Гранстар вызывает окислительный стресс в листьях злаков // *Физиология растений*. – 2011. – Т. 58, №6. – С. 935-943.
19. Спиридонов Ю.Я., Жемчужин С.Г. Современные проблемы изучения гербицидов (2006-2008 гг.) // *Агрехимия*. – 2010. – Т. 27. – P. 429-438.
20. Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1977. – Vol. 25. – P. 517-528.
21. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
22. Meratan A.A., Ghaffari S.M., Niknam V. In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum* // *Biologia plantarum*. – 2009. – №53(1). – P. 5-10.
23. Rahnama H., Ebrahimzadeh H. Antioxidant Isozymes Activities in potato plant (*Solanum Tuberosum L.*) under salt stress // *Journal of Science, Islamic Republic of Iran*. – 2006. – Vol. 17(3). – P. 225-230.
24. Chen Zhong, Su Wei ai, Tang Zhangcheng. Heat protective role and mechanism of heat shock protein Hsc60 // *Chinese Science Bulletin*. – 2000. – Vol. 45, №2. – P. 161-164.
25. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М., 1971. – С. 309-310.
26. Racchi M.L. et al. Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and in vitro micropropagated oak (*Quercus robur L.*) // *PL CELL REP*. – 2001. – №2. – P. 169-174.

27. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygendepressive stress: a review // *Annals of Botany*. – 2003. – Vol. 91. – P. 179-194.

28. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: Образование и возможные функции // *Вестник Харьковского Национального Аграрного Университета. Серия Биология*. – 2007. – Вып. 3(12). – С. 6-26.

REFERENCES

1. Soshinkova T.N., Radjukina N.L., Korol'kova D.V., Nosov A.V. Prolin i funkcionirovanie antioksidantnoj sistemy rastenij i kultiviruemyh kletok *Thellungiellalsuginea* pri okislitel'nom stresse [Prolin and function of antioxidant system of plants and cultivate cells of *Thellungiellalsuginea* by oxidizing stress]. *Fiziologijarastenij–Plant Physiology*, 2013, vol. 60, no. 1, pp. 47-60.

2. Sbartai H., Djebar M.R., Rouabhi R. et.al. Antioxidative Response in Tomato Plants *Lycopersiconesculentum* L. Roots and Leaves to Zinc. *American. Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 2011, no. 3, pp. 41-46.

3. Baranenko V.V. Superoksiddismutaza v kletkah rastenij [Superoxide dismutase in plant cells]. *Citologija–Cytology*, 2006, vol. 48, no. 6, pp. 465-474. doi: 16893051.

4. Romanova E.V. Izofermentnyj sostav i podvizhnost' superoksiddismutazy amaranta [Isozyme profiles and mobility of amaranth superoxide dismutase]. *Obedinennyj nauchnyj zhurnal. Se'skoehozjajstvo - J. Agriculture*, 2005, no. 137, pp. 79-80.

5. Bakalova S., Nikolova A., Nedeva D. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by stress and ABA during germination of wheat seeds. *Bulg. J. Plant Physiol*, 2004, vol. 30, no. 2, pp. 64-77. PbMID 4943714.

6 Kolupaev Ju.E., Karpec Ju.V. Reguljacija aktivnosti katalazy v koleoptiljah pshenicy: vozmozhnaja rol ionov Ca^{2+} i kalmodulina [Regulation of catalase activity in wheat coleoptile: possible role of Ca^{2+} and calmodulin] *Vestnik Harkovskogo Nacional'nogo Agrarnogo Universiteta. Serija Biologija – Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University*, 2008, vol. 1, no. 13, pp. 15-21.

7. Beauchamp C. Superoxidedismutase. *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 44, pp. 276-287. PbMID 4943714 // [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).

8. Miroshnichenko O.S. Biogenez. Fiziologicheskaja rol i svojstva katalazy [Physiological role and properties of catalase]. *Biopolimery i kletka – Biopolymers and cell.*, 1992, vol. 8, no. 6, pp. 6-21.

9. Minibaeva F.V., Gordon L.X. Produkcija superoksida i aktivnostj ekstra kletchoj peroksidazy v rastitel'nyh tkanjah pri stresse [Superoxide production and extracellular peroxidase activity in plant tissues under stress]. *Fiziologijarasteni j– Plant Physiology*, 2003, vol. 50, no. 3, pp. 459-464.

10. Huckelboven R., Kogel K.H. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance. *Planta*, 2003, no. 6, pp. 891-902. doi: 12687357.

11. Andreeva V.A. Ferment peroksidaza [Enzyme of peroxidase]. *Moscow, Science*, 1988, 130 p.

12. Almagro L., Gómez Ros V., Belchi-Navarro S. et. al. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Life Sciences Journal of Experimental Botany*, 2009, vol. 60, Issue 2, pp. 377-390. 10. 1093/jxb/ern277. PbMID 19073963.

13. Maksimov I.V., Valeev A.Sh., Cherepanova E.A., Jarullina L.G. Produkcija aktivnyh form kisloroda v listjah pshenicy, inficirovannyh raznovirulentnymi shtammami *S. Nodorum* Berk [Production of oxygenactive types in wheat leaves, infected with strains of *S. Nodorum* Berk with various virulence]. *Prikladnaja biohimija I mikrobiologija – Applied Biochemistry and Microbiology*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 481-486.

14. Jurin V.M., Ditchenko T.I., Jakovec Ocenka izbiratelnosti dejstvija pesticidov na rastenija [Rating of selective effect of pesticides on plants]. Minsk: BGU, 2011, 68 p.
15. Schönbrunn E. et al., Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail, PNAS, 2001, no. 98, pp. 1376-1380.
16. Lunev M.I. Pesticidy i ohrana agrofитocenozov [Pesticides and agrophytocenosis protection]. Moscow, 1992, 269 p.
17. Kirian S.A., Sement'eva L.Sh., Kontor E.A., Tjurina E.A. Strukturno-funkcionalnye karakteristiki razlichnyh tipov pesticidov [Structure-functional characteristic of different class pesticides]. Agrohimiya–Agrochemistry, 2008, no. 2, pp. 22-25.
18. Garkova A.N., Rusjaeva M.M., Nushtaeva O.V., Aroslankina Ju.N., Lukatkin A.S. Obrabotka gerbicidom Granstar vyzyvaet okislitelnyj stress v listjah zlakov [Treatment with herbicide Granstar induces oxidative stress in cereal leaves]. Fiziologijarastenij – Plant Physiology, 2011, vol. 58, no. 6, pp. 935-943.
19. Spiridonov U.I., Zemchuzin S.G., Spiridonov Ju.Ja., Zhemchuzhin S.G. Sovremennye problem izuchenija gerbicidov (2006-2008) [Current problems of study herbicides (2006-2008)]. Agrohimiya – Agricultural chemistry, 2010, vol. 27, pp. 429-438.
20. Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, vol. 25, pp. 517-528. PMID 1789205.
21. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 1970, vol. 227, pp. 680-685. doi: 5432063.
22. Meratan A.A., Ghaffari S.M., Niknam V. In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum* *Biologiaplantarum*, 2009, vol. 53, no. 1, pp. 5-10. doi: 5432063. PMID 19073963.
23. Rahnama H., Ebrahimzadeh H. Antioxidant Isozymes Activities in potato plant (*Solanum Tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Science, Islamic Republic of Iran*, 2006, vol. 17, no. 3, pp. 225-230. doi: 12509339.
24. Chen Zhong, Su Wei ai, Tang Zhangcheng. Heat protective role and mechanism of heat shock protein Hpc60. *Chinese Science Bulletin*, 2000, vol. 45, no. 2, pp. 161-164. PMID 12509339.
25. Kochetov G.A. Practical manual of enzymology [Prakticheskoe rukovodstvo po jenzimologii]. Moscow, 1971, pp. 309-310.
26. Racchi M.L. et al. Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and in vitro micropropagated oak (*Quercus robur* L.). *PL CELL REP*, 2001, vol. 4, no. 2, pp. 169-174.
27. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivative stress: a review. *Annals of Botany*, 2003, vol. 91, pp. 179-194. PMID 2509339.
28. Kolupaev Ju.E. Aktivnye formy kisloroda v rastenijah pri dejstvii stressorov: Obrazovanie i vozmozhnye funkcii [Active types of oxygen in plants under stressors influence: Generation and possible functions]. *Vestnik Harkovskogo Nacionalnogo Agrarnogo Universiteta. Serija Biologija – Bulletin of Kharkov National Agrarian University. Biology Series*, 2007, Issue 3, no. 12, pp. 6-26.

ТҮЙІН

Негізгі антиоксиданттық ферменттер – супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазаның изоферменттік спектріне гербицидтер (Глифосат, Гранстар) мен фунгицидтердің (Тилт, Фундазол) әсері зерттелді.

Пестицидтер өсімдік өнгеннен кейін әрекет ететін, ауыл шаруашылығы жерлерінде де, сол сияқты және ауыл шаруашылығына жатпайтын жерлерде де арамшөптерді жою үшін, кеңінен пайдаланылатын арнайы емес қосылыстарға жатады. Олар өсімдіктерді жалпы бақылауды қажет ететін барлық жерлерде қолданылады. Пестицидтер негізінен өсімдіктерге жасыл бөліктері арқылы енеді, сонымен қатар топырақтың коллоидтарымен сіңіріледі және өсімдіктердің тамырларына етеді.

Бидай және картоп өсімдіктерін пестицидтермен (Гранстар, Глифосат, Фундазол, Тилт) өңдеу, супероксиддисмутазалар мен каталазалардың изоферменттік спектрінің өзгеруіне елеулі әсерін тигізбейтіні анықталды;

пестицидтермен өңдеуге неғұрлым сезімтал пероксидаза болып шықты. Бидай өсімдіктерін Тилт және Глифосатпен (24 сағат) өңдегеннен кейін пероксидазаның жаңа изоформаларының индуцирленген синтезі жүреді. Зерттелетін өсімдіктер пайдаланылатын ксенобиотиктерге сезімтал болып шықты.

Алынған нәтижелердің анализі зерттелетін фермент-антиоксиданттар (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза) пестицидтердің әсерінен өз белсенділігін бейімді түрде өзгертуге қабілетті деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді. Бұл ретте, өсімдік ағзаларындағы оттегі метаболизмінің оңтайлы деңгейде сақталуы үшін, жасушалар өзгермелі жағдайларға бірнеше бейімделу жолдарын пайдаланады, мысалы, кейбір фермент-антиоксиданттардың физикалық-химиялық қасиеттерінің өзгеруі, олардың изоферментті спектрлерінің өзгеруі, сонымен қатар СОД, КАТ және ПО биосинтезі мен ыдырау жылдамдығының өзгеруі. Бұл біз зерттейтін ферменттердің барлығы шамасы «стресс-арнайы» ферменттерге, бірақ көбінесе ерігіш пероксидазаға жатқызылуы мүмкін деген болжам жасауға мүмкіндік береді.

Кілтті сөздер: пестицидтер, изоферментті спектр, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, бидай, картоп.