

УДК 577.1

О. М. Василюк, П. В. Гриценко

Дніпропетровський національний університет

ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ПЕРЕАМІНУВАННЯ В ЛИСТІ ТА КОРЕНЯХ *SALIX ALBA*

Проаналізовано вплив регуляторів росту рослин на активність ферментів АЛТ та АСТ в листках і коренях живців *Salix alba* (L.) за умов різного субстратного пророщування. Спостерігали наявність кореляційних зв'язків між фізіологічними та біохімічними показниками в листках і коренях живців *Salix alba* (L.).

O. M. Vasilyuk, P. V. Grytsenko

Dnipropetrovsk National University

INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS ON ACTIVITY OF TRANSAMINATION ENZYMES IN LEAVES AND ROOTS OF *SALIX ALBA*

The influence of growth regulators on ALT and AsT enzymatic activity in the leaves and roots of *Salix alba* (L.) saplings under conditions of different substrates was analysed. The correlation between physiological and biochemical indices in the leaves and roots was observed.

Вступ

Регулятори росту рослин (РРР) природного походження набувають великого значення. Емістим С – унікальний біорегулятор широкого спектра дії з епіфітів коріньців цілющих рослин. Технологія застосування передбачає обробку рослин спільно із засобами захисту. Чаркор – стимулятор укорінення зелених і здерев'янілих живців, створений на базі Емістиму С. РРР підсилюють обмінні процеси на рівні клітин і організму, доповнюють органічні мінеральні добрива в системі, підвищують коефіцієнт використання поживних елементів. За своєю ефективністю доза РРР на гектар прирівнюється до кількості *NPK* 20–30 кг/га діючої речовини, що відповідає 80–90 кг ваги аміачної селітри та подвійного суперфосфату, 40 % калійної солі. Під дією РРР на 20–30 % підвищується захисний рівень рослин проти хвороб, активно рубцюється пошкоджений листовий апарат, підвищується виділення нектару та пилку у соняшника та багаторічних трав. Доведено, що РРР поліпшують гормональний статус рослин, підвищують фізіологічну стійкість до стресових факторів [1; 8; 14; 16; 19].

В умовах радіаційного забруднення встановлено, що вміст ^{90}Sr та ^{137}Cs у зерні ячменю та силосній масі кукурудзи зменшувався на 18–35 % при застосуванні Емістиму С та Зеастимуліну. Кращими РРР за умов недостатнього забезпечення ґрунтів поживними речовинами визнано ті, що створені в Україні і рекомендовані до застосування як обов'язковий агрозахід. Розрахунками інституту “Агроресурси” Міністерства аграрної політики доведено, що використання РРР дозволяє додатково отримати продукції при вкладенні однієї гривні в технологію: пшениці – на 16,0 грн., яч-

меню – на 9,8 грн., кукурудзи – 12,3 грн., цукрових буряків – 63,3 грн., картоплі – 197,0 грн. Використання PPP для деревних культур із метою відновлення водоохоронних зон і лісів по урізу води та перешкоджання заростання повітряно-водною рослинністю малих степових річок з утворенням небажаного вектора зміни біогеоценозу та його гідробіологічних складових недостатньо, тому науковий пошук у даному напрямку набуває великого практичного значення.

Об'єкт досліджу – верба біла (*Salix alba* (L.)), невибаглива деревна культура. Мета роботи – оцінити активність аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспаратамінотрансферази (АСТ) у листках і коренях живців, для вкорінення яких використовували воду та пісок із внесенням PPP. Відомо, що у білковому обміні рослин значну роль відіграють реакції переамінування аспарагінової та глютамінової кислот. В умовах дії чинників навколишнього середовища відбувається зміна вектора білкового синтезу, пов'язаного із ферментами переамінування АЛТ та АСТ. У зв'язку з цим необхідно визначити роль ферментів переамінування в адаптації рослин до зміни факторів середовища. Вивчення адаптивної реакції трансфераз на зміни умов довкілля на цій культурі, порівняно з іншими, проведене недостатньо детально [2–5; 9; 10; 11; 21–28].

Матеріал і методи досліджень

В умовах лабораторного досліджу визначали активність ферментів переамінування АЛТ та АСТ у листках і коренях живців верби білої. Досліди виконували за наступною схемою: К1 – контроль (вода), 2 – Емістим С (вода), 3 – Чаркор (вода), 4 – Чаркор + Емістим С (вода), 5 – контроль (пісок), 6 – Емістим С (пісок), 7 – Чаркор (пісок), 8 – Чаркор + Емістим С (пісок).

АЛТ та АСТ є частиною ферментної системи, за допомогою якої утилізується аспарат. Оксалооцтова кислота (ООК), що отримується в результаті реакції кетокислоти та пірувату, утворює забарвлені сполуки з 2,4-динітрофенілгідразином, які визначаються фотометрично при довжині хвилі 546 нм [6; 7; 10; 12; 13; 18].

Унаслідок переамінування за участю АЛТ (2.6.1.2) утворюються глютамінова та піровиноградна кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі утворюється забарвлений гідразон піровиноградної кислоти, забарвлення якого пропорційне активності ферменту. У результаті переамінування за участю АСТ (2.6.1.1) утворюються глютамінова та оксалооцтова кислоти. При внесенні 2,4-динітрофенілгідразину ензиматичний процес зупиняється й у лужному середовищі утворюються забарвлені гідразони оксалооцтової та піровиноградної кислот (гідразон піровиноградної кислоти утворюється за умов спонтанного декарбоксілювання оксалоацетату, має більшу оптичну густину).

Для роботи використовували наступні стандартні розчини: 1а) для визначення активності АСТ – 0,1 М фосфатний буфер (pH 7,4), 0,1 М *L*-аспарат, 2 мМ α -кетоглутарат; 1б) для визначення активності АЛТ – 0,1 М фосфатний буфер (pH 7,4), 0,2 М *DL*-аланін, для визначення активності АЛТ – 2 мМ α -кетоглутарат; 2) 1 мМ 2,4-динітрофенілгідразин; 3) 0,4 Н *NaOH*.

Активність ферментів АЛТ та АСТ визначали методом В. В. Польового та Г. Б. Максимова [18]. Активність A_1 визначали в мікромолях піровиноградної кислоти в 1 мл розчину за хвилину. Активність A_2 виражали в мікромолях піровиноградної кислоти за хвилину на 1 г сухої речовини, питому активність A_3 – в мікромолях піровиноградної кислоти за хвилину на 1 мг білка. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд [23] та виражали у мг/мл розчину. Отримані результати оброблені статистично за допомогою кореляційного аналізу з 95 % рівнем значущості [15].

Результати та їх обговорення

В умовах лабораторного дослідження вивчали активність ферменту переамінування АЛТ в листках та коренях живців *Salix alba* (L.) (рис. 1). Слід зазначити, що питома активність АЛТ у листках набувала вищих абсолютних показників порівняно з коренями для всіх варіантів дослідження. Особливо істотні відмінності спостерігали при порівнянні серії дослідів і пророщуванні на воді (контроль 1) та піску (контроль 2). У варіантах 1–4 у листках живців, що пророщували на воді, питома активність АЛТ відповідно збільшується відносно контролю 1 на 8–13 %, тоді як питома активність АЛТ у коренях живців у варіантах дослідження із застосуванням Чаркору та комбінації Чаркору з Емістимом С була інгібована відносно контролю на 23 %.

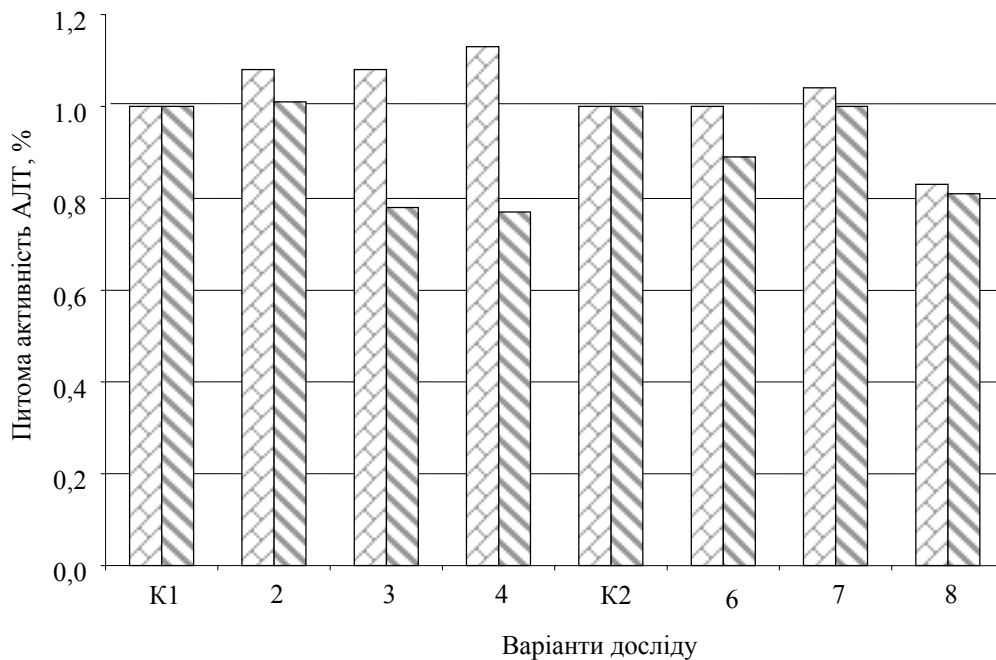


Рис. 1. Питома активність АЛТ (%) у листках і коренях живців *Salix alba* (L.) на фоні дії регуляторів росту:

K1 – контроль (вода), 2 – Емістим С (вода), 3 – Чаркор (вода), 4 – Чаркор + Емістим С (вода),
K2 – контроль (пісок), 6 – Емістим С (пісок), 7 – Чаркор (пісок), 8 – Чаркор + Емістим С (пісок);
▨ – у листі, ▩ – у корінні.

У серії дослідів, які проводили з піском, питома активність АЛТ у листках живців знижувалась за умов композиційного внесення регуляторів росту на 17 %. Подібну тенденцію зниження активності ферменту спостерігали й у корінні верби білої для всіх варіантів дослідження. Таким чином, активність АЛТ збільшувалась у листках живців при пророщуванні на воді, тоді як у коренях відбувався зворотний процес. Значних змін активності ферменту за умов пророщування на піску не спостерігалось.

В умовах модельного дослідження визначали питому активність АСТ у листі і корінні живців *Salix alba* (L.) (рис. 2). Слід зазначити, що питома активність АСТ в листках живців майже для всіх варіантів дослідження (за винятком варіанта 7) перевищувала цей показник для коріння. Максимальні значення питомої активності контролю 2 стосовно АСТ у листках живців реєстрували у варіанті зі внесенням композиційно

Емістиму С та Чаркору (дослід 4 – перевищення контролю 1 на 12 %), на відміну від максимальних показників АЛТ в аналогічних варіантах досліді. У варіантах досліді 2 та 3 значення показника від контрольних достовірно не відрізнялись. Активність АСТ у корінні живців проявляла тенденцію до зниження, що співпадає з динамікою активності АЛТ.

У варіантах досліді з пророщуванням на піску питома активність АСТ у листі знижена у варіанті зі спільним внесенням регуляторів росту (на 17 %), а в інших варіантах досліді наближена до контролю 2. У корінні спостерігали підвищення питомої активності АЛТ (на 14 % при внесенні Чаркору) та інгібування активності АСТ у варіантах 6 та 8 (на 8–9 % відповідно).

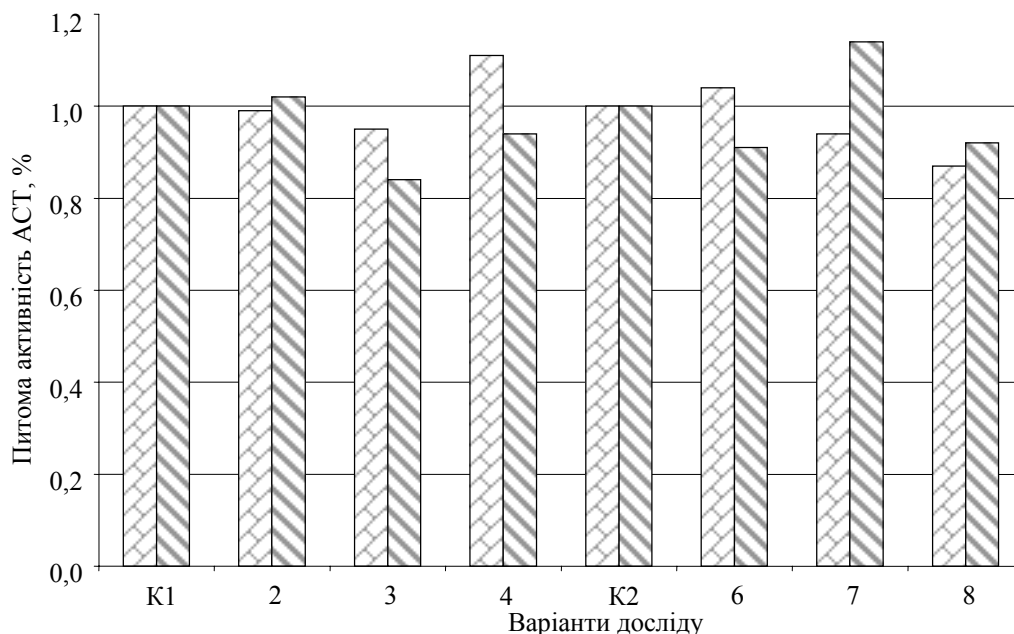


Рис. 2. Питома активність АСТ (%) у листках і коренях живців *Salix alba* (L.) на фоні дії регуляторів росту:

K1 – контроль (вода), 2 – Емістим С (вода), 3 – Чаркор (вода), 4 – Чаркор + Емістим С (вода), K2 – контроль (пісок), 6 – Емістим С (пісок), 7 – Чаркор (пісок), 8 – Чаркор + Емістим С (пісок);
 ▨ – у листі, ▩ – у корінні.

В умовах модельного досліді визначали концентрацію білка в листі та корінні живців *Salix alba* (L.) (рис. 3). У варіантах досліді з пророщуванням на воді та піску концентрація білка в листках живців достовірно від контрольних не відрізнялась. У корінні живців у варіантах досліді 3 та 4 концентрація білка перевищувала контроль 1 на 16–21 % відповідно. У серії досліді з пророщуванням на піску концентрація білку перевищувала контроль 2 у варіантах 6 та 8 на 15–18 %. Таким чином, у корінні живців концентрація білка коливалась залежно від варіантів досліді, тоді як у листі була наближена до контрольних показників.

Зміни питомої активності ферментів АЛТ та АСТ у листі та корінні живців (відповідно I та II), загальної концентрації білка та АЛТ (III), загальної концентрації білка та АСТ (IV) у дослідних пробах призводять до необхідності дослідити можливість існування кореляційних зв'язків між цими фізіологічними та біохімічними показниками (табл.). Між концентрацією АЛТ і АСТ у листі живців верби білої тільки

для варіантів із використанням РРР 7 (Чаркор) та 8 (Чаркор та Емістим С) за умов пророщування на піску виявили високі коефіцієнти кореляції (-0,88) та 0,74 відповідно, що доводить наявність існування залежності між показниками, які вивчали. У корнях живців спостерігали існування суттєвих зв'язків між активністю ензимів для всіх варіантів дослідів та виявили винятково позитивну кореляцію.

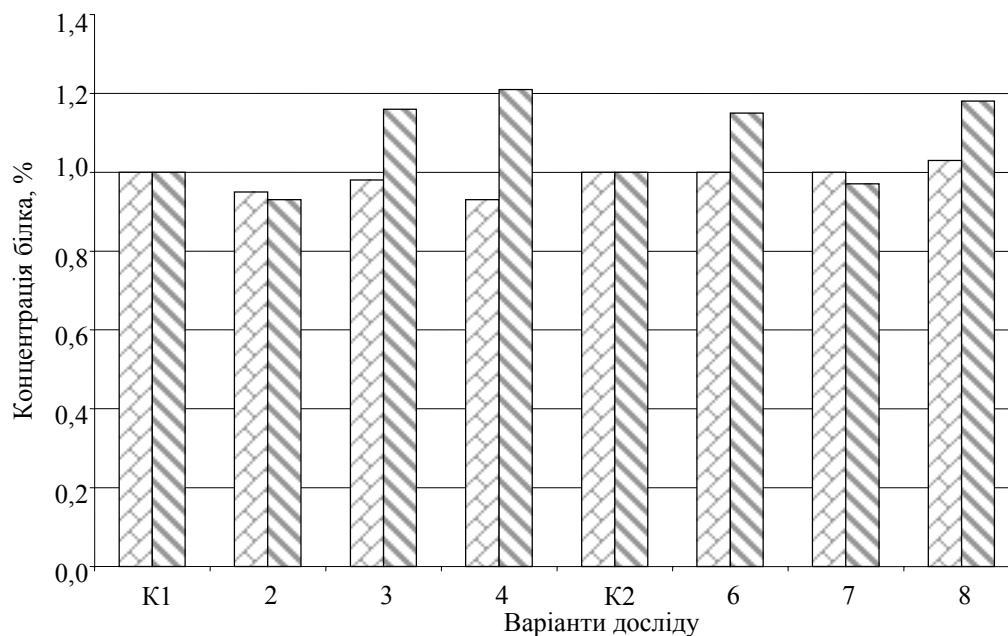


Рис. 3. Концентрація білка у листках і корнях живців *Salix alba* (L.) на фоні дії регуляторів росту:

K1 – контроль (вода), 2 – Емістим С (вода), 3 – Чаркор (вода), 4 – Чаркор + Емістим С (вода), K2 – контроль (пісок), 6 – Емістим С (пісок), 7 – Чаркор (пісок), 8 – Чаркор + Емістим С (пісок);
 ▨ – у листі, ▩ – у корінні.

Таблиця

Кореляційні зв'язки між активністю ферментів АЛТ і АСТ та концентрацією білка

Варіанти дослідів	I		II		III		IV	
	листя	коріння	листя	коріння	листя	коріння	листя	коріння
K1	0,63	0,84*	-0,72*	-0,68	-0,42	0,78*		
2	1,00	1,00*	-1,00*	1,0	1,00	1,00*		
3	-0,56	0,99*	-0,60	-0,44	0,69	0,36		
4	0,51	0,81*	-0,63	-0,50	-0,31	0,72		
K2	0,63	0,84*	-0,72	-0,68	-0,42	0,78*		
6	1,00	1,00*	1,00*	1,00*	-1,00*	1,00*		
7	-0,88*	0,80*	0,78*	0,94*	-0,59	-0,23		
8	0,74*	0,75*	-0,64	0,10	-0,87*	0,11		

Примітки: K1 – контроль (вода), 2 – Емістим С (вода), 3 – Чаркор (вода), 4 – Чаркор + Емістим С (вода), K2 – контроль (пісок), 6 – Емістим С (пісок), 7 – Чаркор (пісок), 8 – Чаркор + Емістим С (пісок).

Крім того, визначали можливість існування зв'язків між загальною активністю ферментів АЛТ, АСТ та концентрацією білка. Слід зазначити, що в листі живців спостерігали високі показники коефіцієнта кореляції між АЛТ та концентрацією білка,

тоді як у корінні дослідних варіантів 3 та 4, де застосовували РРР за умов пророщування на воді, спостерігали відсутність кореляційних ознак.

У листі живців спостерігали відсутність кореляції у контрольних пробах між АСТ і концентрацією білка, тоді як існував суттєвий зв'язок між ознаками у варіантах досліду 2, 6 та 8, де застосовували внесення РРР при вирощуванні як на воді, так і на піску. Відсутність кореляції за даними показниками в листках живців чергувалась з появою їх у коренях, що компенсувало розвиток біохімічних процесів для підтримки гомеостазу за умов зміни факторів зовнішнього середовища.

Висновок

Активність ферментів переамінування АЛТ та АСТ змінюється за умов впливу РРР, що свідчить про зміну білкового обміну в зазначених варіантах досліду. Процес адаптації рослин відбувається за рахунок активації аланінамінотрансферази і/або аспартамінонотрансферази, що нормалізує напрямок білкового обміну. Питома активність АЛТ та АСТ набувала більших показників у листі живців порівняно з корінням. АЛТ та АСТ, як ензими азотного метаболізму, чутливі до змін субстратного забезпечення та РРР. Спостерігали наявність кореляційних зв'язків між фізіологічними та біохімічними показниками в листі та корінні живців *Salix alba* (L.).

Бібліографічні посилання

1. **Анішин Д. А.** Біостимулятори для соняшника / Д. А. Анішин, С. П. Пономаренко // Захист рослин. – 1997. – № 4. – С. 14–15.
2. **Амінотрансферазна** активація постачання субстратів у цикл Кребса за умов стресу у щурів з різною резистентністю до гіпоксії і роль оксиду азоту / Н. М. Кургалюк, О. В. Інкерт, В. К. Рибальченко и др. // Доповіді НАНУ. – 2002. – № 9. – С. 182–188.
3. **Боечко Ф. Ф.** Основні біохімічні поняття, визначення і терміни / Ф. Ф. Боечко, Л. О. Боечко. – К.: Вища школа, 1993. – 528 с.
4. **Винниченко А. Н.** Эколого-физиологические механизмы адаптации растений к стрессам антропогенного происхождения / А. Н. Винниченко, Н. П. Коцюбинская // Устойчивое развитие: загрязнение окружающей среды и экологическая безопасность. Тез. Междунар. конф. – Д.: ДГУ, 1995. – Т. 2. – С. 5.
5. **Влияние** гербицидов на активность и полиморфизм аспартаминотрансферазы / А. Н. Винниченко, Н. П. Коцюбинская, В. С. Бильчук и др. // Бюлл. Ин-та кукурузы. – 1995. – № 80. – С. 14–19.
6. **Гудин Т.** Введение в биохимию растений / Т. Гудин, Э. Мерсер. – М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 392 с.
7. **Гудин Т.** Введение в биохимию растений / Т. Гудин, Э. Мерсер. – М.: Мир, 1986. – Т. 2. – 312 с.
8. **Ефективність** застосування регуляторів росту для інкрустації насіння кукурудзи / З. О. Безвенюк, В. М. Троян, В. М. Музика та ін. // Физиология и биохимия культурных растений. – 1995. – Т. 27, № 4. – С. 248–253.
9. **Коцюбинская Н. П.** Генетический контроль множественных форм аспартаминотрансферазы у высоколизиновых мутантов / Н. П. Коцюбинская, В. С. Бильчук, Л. В. Шупранова // Молекулярные механизмы генетических процессов. Тез. докл. VII Всесоюзн. симп. – М., 1990. – С. 155.
10. **Коцюбинская Н. П.** Характеристика ферментов переаминирования у мутантов кукурузы с измененным аминокислотным обменом / Н. П. Коцюбинская, В. С. Бильчук, Л. В. Шупранова // Проблемы азотистого метаболизма. Тез. докл. – Волгоград, 1990. – С. 52.
11. **Коцюбинская Н. П.** Эколого-биохимические аспекты адаптации культурных растений к антропогенным условиям среды. – Д.: ДГУ, 1995. – 172 с.
12. **Кротович В. Л.** Усвоение и метаболизм азота у растений. – М.: Наука, 1987. – 486 с.

13. **Кретович В. Л.** Переаминирование аспарагиновой и глутаминовой кислот в растении / В. Л. Кретович, А. А. Бундель // Доклады АН СССР. – 1949. – Т. 16, № 5. – С. 90–94.
14. **Курчий Б. А.** Функционально активные группы биорегуляторов // Физиология и биохимия растений. – 1993. – Т. 25, №1.
15. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 293 с.
16. **Немченко В. В.** Регуляторы роста для предпосевной обработки семян кукурузы / В. В. Немченко, Н. П. Иванов // Химизация сельского хоз-ва. – 1991. – № 1. – С. 91–93.
17. **Обякова Я.** Активность аминотрансфераз, содержание белка и витамина B_6 в связи с созреванием и прорастанием люпина: Автореф. дис. ... канд. с-х. наук. – Минск, 1974. – 18 с.
18. **Полевой В. В.** Методы биохимического анализа растений / В. В. Полевой, Г. Б. Максимов. – Л.: ЛГУ, 1978. – 192 с.
19. **Троян В. М.** Вплив передпосівної обробки насіння фізіологічно активними речовинами на генеративний розвиток кукурудзи / В. М. Троян, З. О. Безвенюк, Т. А. Листопад // Физиология и биохимия культурных растений. – 1993. – Т. 25, № 2. – С. 144–151.
20. **Ферменты азотного метаболизма и адаптация растений к антропогенным условиям среды** / А. Н. Винниченко, Н. П. Коцюбинская, В. С. Бильчук и др. // Вестник Днепропетр. ун-ета. Биология. – Д.: ДГУ, 1995. – Вып. 2. – С. 140–149.
21. **Экспрессия** одноцепочечной цепи антитела к аспартатаминотрансферазе P_2 в трансгенных растениях табака / В. Л. Метт, В. А. Метт, Д. Ч. Сонг, П. Х. С. Рейнолдс // Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – С. 27–36.
22. **Bilchuk V. S.** Identification of the lysine maize forms according to aspartate aminotransferase features / V. S. Bilchuk, N. P. Kotzubinskaya, Y. V. Donchenko // J. of Cellular Biochem. – 1990. – 14E. – P. 275.
23. **Bradford M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
24. **Headley C. L.** Factors influencing alanine aminotransferase activity in leaves of *Lalium temulenlum* / C. L. Headley, J. L. Standart // Exp. Bonany. – 1972. – Vol. 23. – P. 409–423.
25. **Hitoshi M.** Some properties of the amine oxidase in *Vicia faba* seedlings / M. Hitoshi, S. Jonezo // Plant and Cell Physiol. – 1977. – Vol. 118, N 5. – P. 1131–1137.
26. **Monteira A. M.** Activities of transaminases, anylases and proteases during endosperm degradation on normal and opaque-2 *Zea mays* L. / C. V. Maya, A. M. Monteiro, J. Metivier // Anals of Botany. – Vol. 52. – P. 535–541.
27. **Nitrogen** metabolism enzymes and serine protease inhibitors of high lysine maize / A. N. Vinnichenko, N. P. Kotzubinskaya, V. S. Bilchuk // Abs. XIX FEBS meeting. – Roma, 1989. – P. 196.
28. **Pilet P. E.** The regulation of activity aspartate aminotransferase in senescent root cekkes of lens culigris // Experientia. – 1971. – Vol. 27. – P. 880.

Надійшла до редколегії 11.02.2007