

CZU: 633.86+581.1:582.32

ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A SUBSTANȚELOR DIN MUGURII ARBORILOR STEJARULUI PUFOS (*QUERCUS PUBESCENS* WILLD.) CARE CRESC ÎN DIFERITE CONDIȚII STAȚIONALE

Gheorghe FLORENTĂ, Petru CUZA

Universitatea de Stat din Moldova

A fost determinată activitatea sumară a oxidazelor, catalazelor și a substanțelor reducătoare a extractelor din mugurii stejarului pufos prelevați primăvara de la arborii care cresc în diferite condiții staționale din sudul Republicii Moldova. În extracte se manifesta clar tendința de sporire a capacității sumare de utilizare a oxigenului datorită potențialului reductiv al substanțelor fenolice și activității oxidazelor la arborii care cresc mai la sud, ceea ce corespunde gradientului de sporire a temperaturii primăvara în direcția nord-sud. Această tendință s-a manifestat și pentru activitatea catalazelor, dar mai puțin pronunțat. Primăvara, în celulele mugurilor apicali schimbările componentelor care determină potențialul oxidoreductiv se manifestă mai timpuriu, în comparație cu cele din mugurii laterali. Această accelerare poate fi o cauză a eliminării mai timpurii a dormitării mugurilor apicali în comparație cu cei laterali.

Cuvinte-cheie: condiții staționale, *Quercus pubescens*, arbori, muguri, substanțe antioxidante.

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PUBESCENT OAK TREE BUDS (*QUERCUS PUBESCENS* WILLD.) WHICH GROW UNDER DIFFERENT STATIONARY CONDITIONS

It was determined the summary activity of oxidases, catalases and reducing substances of extracts from pubescent oak shoots taken in spring from trees growing in different stationary conditions in the southern part of the Republic of Moldova. In the extracts, the tendency to increase the overall capacity of oxygen use due to the reductive potential of the phenolic substances and the activity of the oxidases in trees growing southwards is clearly manifested, which corresponds to the gradient of increasing the spring temperature in the north-south direction. This trend also manifested itself in the catalase activity, but less pronounced. In apical buds, in spring, the changes in the components that determine the oxidoreductive potential are manifested earlier, compared to those in lateral buds. This acceleration may be a reason of the early removal of dormancy apical buds comparative with the lateral buds.

Keywords: stationary conditions, *pubescent oak*, trees, buds, antioxidant substances.

Introducere

Supraviețuirea populațiilor arborilor în condițiile temperaturilor schimbătoare ale perioadei de trecere de la un anotimp la altul depinde de procesele oxidoreductive, care se desfășoară în țesuturile plantelor, în special în cele ale mugurilor. Din cauza că mugurii sunt rezistenți la temperaturile excesive, plantele intră în starea de repaus, ceea ce evită posibilitatea ca acestea să fie vătămate. Anume mugurii asigură regenerarea arborilor afectați de înghețurile târzii de primăvară [1]. Supraviețuirea arborilor care se găsesc în condiții de stres termic depinde de două grupe de factori. În primul rând, supraviețuirea arborilor este condiționată de rezistența țesuturilor și organelor care se află în stare fiziologică activă. Capacitatea plantelor de a rezista la acțiunea temperaturilor excesive asigură creșterea și dezvoltarea lor în anumite condiții de mediu. În al doilea rând, supraviețuirea arborilor depinde de rezistența mugurilor față de influența temperaturilor negative. În cazul în care frunzele și ramurile tinere au fost afectate de temperaturile înalte, regenerarea plantelor poate fi realizată pe seama mugurilor aflați în repaus, care, ieșind din starea de dormitare, asigură continuitatea creșterii ramurilor și a frunzelor.

Problema abordată este actuală reieșind din faptul că tendința de încălzire globală a climei divine tot mai evidentă [2]. Cele mai multe previziuni sugerează ideea că media curentă a concentrației de CO₂, care constituie 355 μL·L⁻¹, se va dubla spre sfârșitul secolului al XXI-lea [3]. Sporirea concentrațiilor de CO₂ și ale altor gaze cu efect de seră va contribui efectiv la creșterea temperaturii medii și va produce schimbări esențiale în modelele de previziune a precipitațiilor [3]. Modelele climatice oferă posibilitatea de a prezice pe scară largă perioadele de secetă în timpul verii în latitudinile de nord și mijlocii, în care disponibilitatea apei constituie unul dintre cei mai importanți factori care determină categoric diversitatea structurii taxonomice din limitele regnului vegetal și, respectiv, productivitatea plantelor [4].

În contextul subiectului abordat este de menționat că cercetările științifice asupra speciilor privind determinarea stării fiziologice și rezistența față de factorii de stres termic, având ca obiect de studiu speciile forestiere, sunt foarte limitate. În schimb, au fost realizate multiple cercetări științifice având ca obiect de studiu plantele horticole. În baza rezultatelor obținute s-a putut demonstra că în zona temperată mugurii floralii ai pomilor fructiferi, inclusiv la măr, sunt depuși în anul care precede înflorirea. Toamna târziu mugurii intră în perioada de repaus vegetativ, numit endodormitare [5]. În această perioadă s-a constatat că în țesuturile mugurilor nu se manifestă o activitate vizibilă. Cu toate acestea, mugurii sunt activi din punct de vedere metabolic [5], continuându-și dezvoltarea pe parcursul întregii ierni [6]. Ritmul de dezvoltare a mugurilor în timpul iernii depinde de genotip, fiind controlat de mai mulți factori [7]. Pentru a întrerupe hibernarea, este necesară o anumită perioadă de influență a temperaturilor joase, a cărei durată variază în funcție de genotip. După expunerea la temperaturi joase și eliminarea stării de endodormitare, mugurii pot rămâne încă latenți o anumită perioadă de timp din cauza condițiilor nefavorabile ale factorilor de mediu. Mugurii își reîncep creșterea doar atunci când condițiile mediului devin favorabile desfășurării proceselor de creștere.

Material și metode

În pădurile naturale de vârstă preexploatabilă ale stejarului pufos (*Quercus pubescens* Willd.) din sudul Republicii Moldova au fost selectate arborete de productivitate ridicată. În sectoarele reprezentative din interiorul acestor arborete au fost delimitate și amenajate șase suprafețe experimentale. Câte o suprafață experimentală a fost amplasată în arboretele din teritoriul ocoalelor silvice Nisporeni și Zloți, pădurile cărora din punct de vedere geografic se găsesc la periferia de sud a Podișului Moldovenesc. De asemenea, a fost amenajată câte o suprafață experimentală în spațiul de activitate al ocoalelor silvice Cărpineni, Talmază, Băiuș și Baimaclia, arboretele cărora se află teritorial în Câmpia de Sud. La mijlocul lunii aprilie, de la 10 arbori de stejar pufos de pe fiecare suprafață experimentală au fost recoltați muguri apicali și laterali. Mugurii din arborii diferitelor suprafețe experimentale au fost recoltați în aceeași zi de pe ramurile care se găseau în partea sudică a părții inferioare a coroanei.

În laborator a fost efectuată analiza biochimică a mugurilor apicali și laterali colectați. După fărâmițarea la rece în mortar de porțelan a 0,1g de muguri, materialul obținut a fost extras timp de 30 de minute la temperatura de 25°C în 2 ml de soluție-tampon, care conținea 0,2 MTris, pH-7. Ulterior, extractul a fost centrifugat pe parcursul a 15 minute la 4000 g. Supernatantul a fost separat și trecut printr-o coloană mini de Sephadex G 25, substanțele obținute fiind separate în două fracții: cu masă moleculară mică (fracția 1) și cu masă moleculară mare (fracția 2).

Pentru a determina capacitatea sumară a fracțiilor 1 și 2 privind reducerea conținutului de oxigen liber, datorită potențialului de reducere directă de către substanțele antioxidante din fracția 1 și activității enzimatică a oxidazelor din fracția 2, la 1,56 ml de soluție-tampon menționată mai sus au fost adăugate 40 μcl de soluție din fracția 1 sau 2 și incubate la 25°C. În toate experimentele, cu ajutorul oximetrului YSI (SUA), a fost determinată dinamica diminuării conținutului de oxigen în soluțiile experimentale, în comparație cu cea din soluția martor (aceasta conținea doar 1,6 ml de soluție tampon). La 15-30 minute de la inițierea incubării la 25°C, conținutul oxigenului în soluție atinge faza staționară, atunci când procentul de oxigen utilizat devine egal cu cel ce penetrează în soluție prin procesul de difuzie. Diferența dintre procentul de oxigen în soluția martor și în cea experimentală era determinată de capacitatea fracției 1 sau 2 de a reduce oxigenul, ceea ce constituie cauza diminuării procentului de oxigen în soluție la faza staționară. Pentru a determina activitatea catalazelor din fracția 2, dinamica conținutului de oxigen a fost determinată după adăugarea la 1,5 ml de soluție tampon menționată a 60 μcl de 0,05% H₂O₂ și a 40 μcl de soluție din fracția 2, urmată de incubarea la 25°C.

Dinamica schimbării conținutului de oxigen a fost influențată de activitatea eliminării oxigenului în urma degradării peroxidului de hidrogen de către catalaze, precum și de activitatea legării oxigenului de către oxidaze. Rezultatul sumar al proceselor menționate era determinat în baza procentului de oxigen în soluție la faza staționară. După cum am menționat anterior, în experimentele noastre faza staționară era atinsă la 15-30 minute de la începutul incubării componentelor de reacție în soluția tampon.

Rezultate și discuții

Având în vedere faptul că rezistența și starea fiziologică a plantelor este determinată atât de specificul genetic al speciei, cât și de condițiile de mediu în care acestea vegetează, au fost analizate substanțele antioxidante ale extractelor din mugurii arborilor stejarului pufos care cresc în diferite condiții staționale. Rezultatele obținute sunt reflectate în Figura 1, care demonstrează că atât în mugurii apicali, cât și în cei

laterali, cu deplasarea de la arboretele care vegetează în sudul țării către nord, rolul relativ al catalazei în reglajul speciilor reactive de oxigen crește, în comparație cu cel al oxidazelor și al substanțelor antioxidante. Despre acest fapt denotă influența semnificativă a catalazelor asupra conținutului de oxigen în extractele mugurilor prelevați de la arborii care cresc în ocoalele silvice situate mai la nord. Activitatea oxidazelor și antioxidantilor, dimpotrivă, crește în extractele din mugurii prelevați de la arborii care cresc mai la sud. Din literatura de specialitate se știe că creșterea activității catalazei în celulele plantelor se manifestă în condiții de stres sau de activitate intensivă a metabolismului [8], fenomene asociate cu creșterea conținutului speciilor reactive de oxigen și a peroxidului de hidrogen în celule.

Inițial, sporirea conținutului speciilor reactive de oxigen ca urmare a intensificării metabolismului este asociată cu accelerarea activității catalazei, implicată în detoxificarea produsului final al acestora (peroxidului de hidrogen). Ulterior, crește aportul relativ al oxidazelor și al substanțelor antioxidante în detoxificarea speciilor reactive de oxigen. În final, procesul este asociat de diminuarea scurgerii speciilor reactive de oxigen, care are loc la etapele de stabilizare a echilibrului biodinamic al proceselor fiziologice. Astfel, are loc stabilizarea activității substanțelor care utilizează oxigenul (oxidazele) și detoxifică speciile reactive de oxigen (catalazele și substanțele antioxidante). Echilibrul biodinamic se stabilește odată cu atingerea echilibrului speciilor reactive de oxigen (la un nivel minimal posibil) în celule [9]. Astfel, stabilirea raportului dintre activitatea diferitelor componente ce determină activitatea utilizării oxigenului (oxidazelor) și detoxificării speciilor reactive de oxigen (catalazelor și substanțelor antioxidante) oferă posibilitatea de a determina dinamica echilibrului biodinamic în perioadele de intensificare a metabolismului atât la diferite etape ale ontogenezei plantelor, cât și la diferite etape de desfășurare sau de recuperare a deteriorărilor provocate de factorii de stres.

Datele prezentate în Figura 1, în ansamblu, oferă posibilitatea de a concluziona că la momentul prelevării probelor pentru analiză mugurii arborilor care cresc în ocoalele silvice situate mai spre sudul țării deja au trecut de la etapa de dormitare la cea activă, fenomen ce a determinat o activitate sporită a catalazelor, oxidazelor și a substanțelor antioxidante (Fig.1 a și b). La arborii din ocoalele silvice aflate mai la nord se observă o stare mai puțin avansată de trecere a plantelor de la starea de repaus la cea activă (Fig.1 c și d). În extractele din mugurii acestor arbori (din ocoalele silvice Zloți și Talmază) se observă o activitate moderată a oxidazelor și a substanțelor antioxidante și se manifestă o activitate înaltă a catalazelor (chiar mai înaltă în comparație cu cea semnalată la mugurii arborilor din Baimaclia și Băiuș). În extractele din mugurii arborilor din ocoalele silvice Cărpineni și Nisporeni (Fig.1 e și f) sporește semnificativ doar activitatea catalazelor, aceasta fiind mai înaltă în extractele prelevate din mugurii apicali. Rezultatele obținute consemnează că arborii din localitățile menționate se află doar la faza inițială de eliminare a dormitării de iarnă, astfel încât la aceste exemplare se întrevide o întârziere substanțială a ieșirii din faza de repaus în comparație cu stejarii din ocoalele silvice Băiuș și Baimaclia. În general, datele obținute demonstrează influența condițiilor staționale asupra activității proceselor ce determină potențialul oxidoreductiv și activitatea fiziologică a mugurilor. La mugurii apicali, de regulă, primăvara eliminarea dormitării și activarea metabolismului are loc mai devreme, în comparație cu procesele din mugurii laterali.

Din cauza activării proceselor de formare a peroxidului de hidrogen în mugurii apicali, în aceștia activitatea catalazelor decurge mai avansat în comparație cu cea din mugurii laterali. În felul acesta se explică că diferențele dintre activitatea catalazei în extractele de la mugurii apicali și cei laterali au tendința de a fi mai mari la arborii care vegetează în ocoalele silvice situate mai la nord. Deoarece eliminarea dormitării și inițierea creșterii se manifestă mai timpuriu la mugurii apicali, în luna aprilie se instalează gradientul de eliminare a dormitării mugurilor de stejar pufos de la sud la nord. Așadar, arborii care cresc în partea de sud a țării se află la o etapă mai avansată de eliminare a dormitării în comparație cu cei amplasați mai spre nord.

Procese metabolice de intensitate diferită ale substanțelor antioxidante cauzează instalarea unor gradienti opuși în activitatea catalazei, pe de o parte, și a oxidazelor, pe de altă parte. Anume aceste legități au fost evidențiate în cercetările noastre care sunt prezentate în diagramele din Figura 1.

De menționat că rezultatele cercetărilor biochimice obținute cu mugurii arborilor de stejar pufos, care cresc în teritoriile diferitelor ocoale silvice, reflectă starea fiziologică a plantelor. Activarea proceselor care determină degradarea speciilor reactive de oxigen este corelată perfect cu derularea proceselor de eliminare a dormitării primăvara a mugurilor la arborii stejărilor pufos, care cresc în diferite condiții staționale.

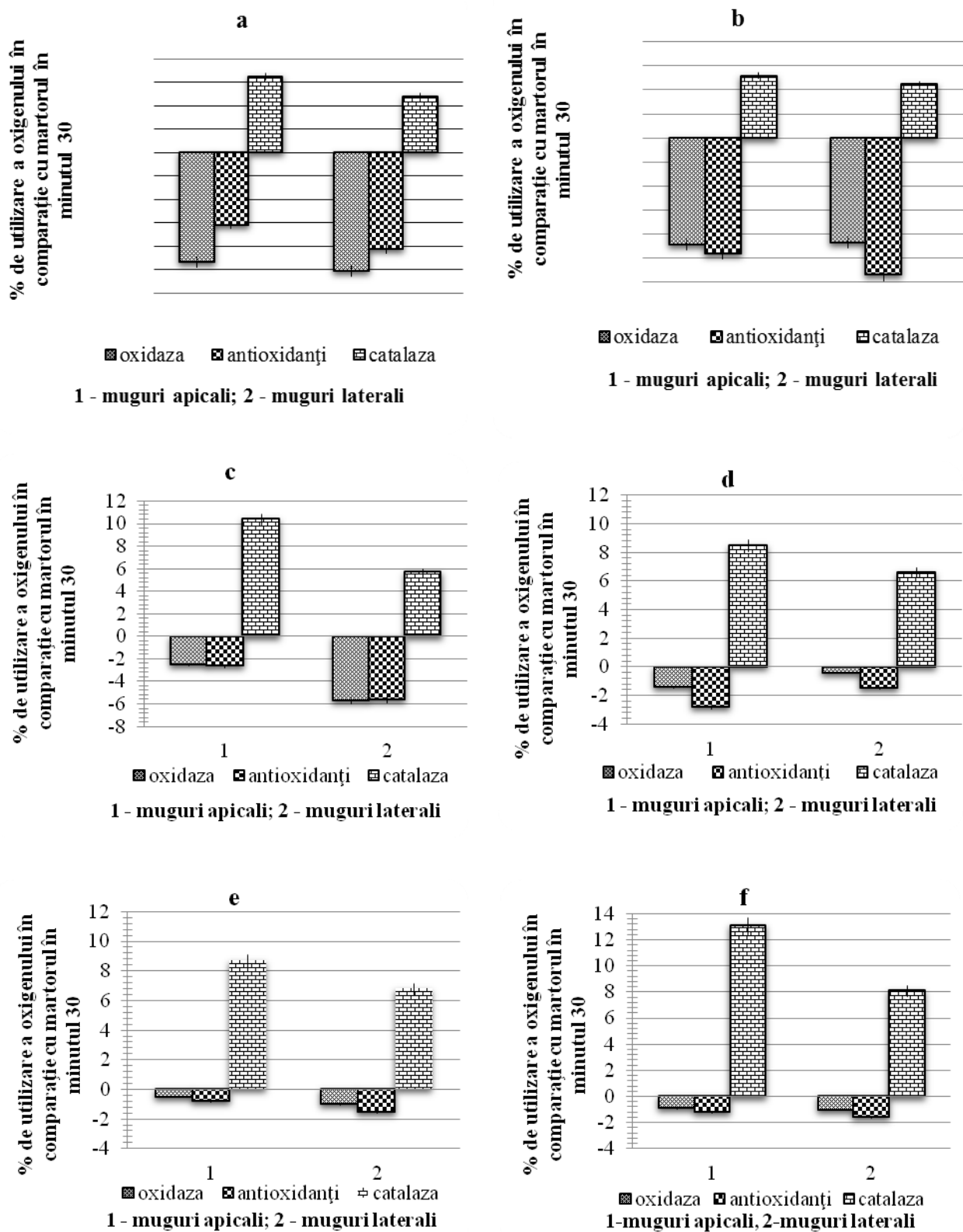


Fig.1. Activitatea oxidazelor, catalazelor și a substanțelor antioxidative în extractele din mugurii apicali și laterali ai stejarului pufos, colectați în ocoalele silvice Baimaclia (a), Băiuș (b), Zloți (c), Talmaza (d), Cărpineni (e) și Nisporeni (f) în aprilie 2013.

În cele ce urmează prezentăm caracterizarea cantitativă a influenței condițiilor staționale asupra activității antioxidante a diferitelor tipuri de substanțe extrase din mugurii stejarului pufos. Datele reflectate în Tabel denotă că eliminarea oxigenului de către catalaze este mai joasă în extractele din mugurii prelevați de la arborii care cresc în teritoriile localităților situate mai la sud, în comparație cu exemplarele din Nisporeni. De remarcat este faptul că activarea proceselor de reducere directă, sau pe cale enzimatică, a oxigenului de către substanțele extrase din mugurii arborilor care cresc în diferite condiții staționale se datorează variației temperaturilor de primăvară de-a lungul gradientului latitudine, ceea ce a determinat diferențe în activitatea proceselor fiziologice. Este evidentă sporirea capacității sumare de utilizare a oxigenului datorită potențialului reductiv al substanțelor fenolice și activității oxidazelor în extractele mugurilor, care, de la nord spre sudul țării, urmează un drum paralel cu gradientul de temperaturi pozitive. În același timp, se manifestă tendința opusă de schimbare a activității sumare a proceselor ce asigură descompunerea enzimatică a peroxidului de hidrogen (asigurate de catalază).

Tabel

Diferențele dintre procesele de utilizare a oxigenului și eliminarea lui în urma descompunerii peroxidului de hidrogen, provocată de substanțele extrase din mugurii apicali sau laterali prelevați de la arborii de stejar pufos din pădurile din Nisporeni, în comparație cu cei din Cărpineni, Zloți, Talmaza, Băiuș și Baimaclia

Varianta	Localități				
	Cărpineni	Zloți	Talmaza	Băiuș	Baimaclia
Surplusul de utilizare a oxigenului în soluția fracției 1 (metaboliți)					
Muguri apicali	0,40 ± 0,82	- 1,43 ± 0,94*	- 1,63 ± 1,06*	- 8,37 ± 5,44*	- 5,00 ± 1,31*
Muguri laterali	1,67 ± 1,38*	- 3,93 ± 2,87*	0,17 ± 0,71	- 9,77 ± 3,71*	- 6,60 ± 0,99*
Surplusul de utilizare a oxigenului în soluția fracției 2 (oxidaze)					
Muguri apicali	0,37 ± 1,20	- 1,57 ± 1,76	- 0,53 ± 1,06	- 8,00 ± 2,56*	- 8,37 ± 2,20*
Muguri laterali	0,07 ± 0,77	- 4,67 ± 0,35*	0,67 ± 1,69	- 7,70 ± 1,38*	- 9,07 ± 3,87**
Surplusul de eliminare a oxigenului în supernatant					
Muguri apicali	4,40 ± 1,13*	2,70 ± 3,09	4,60 ± 4,08*	7,87 ± 3,11*	6,60 ± 1,47*
Muguri laterali	1,27 ± 2,78	0,37 ± 4,96	1,50 ± 3,42	3,60 ± 4,30	3,33 ± 3,24*

Notă: Sunt prezentate valorile medii ± suma valorilor devierilor ambelor variante (la mugurii de referință, din Nisporeni, și la cei din variantele experimentale), care ar asigura diferența dintre variante cu confidența la nivelul de 95% pentru fiecare valoare medie;

* – indică deosebirile semnificative sesizate între valoarea parametrului cercetat al variantei respective și cea caracteristică pentru mugurii prelevați de la arborii din Nisporeni;

** – suma diferențelor privind activitatea tuturor componentelor din extract.

Din literatura de specialitate se știe că supraviețuirea plantelor la gerurile de iarnă depinde de mai multe procese ce necesită energie, procese care, la rândul lor, induc activitatea sistemelor de formare și ieșire de sub control a speciilor reactive de oxigen [10]. Călirea și aclimatizarea la frig implică procese complexe de inducere a acumulării în celule a unor enzime și substanțe, care duc la dezactivarea speciilor reactive de oxigen, diminuarea leziunilor și la sporirea viabilității plantelor în condiții de ger [11, 12]. Primăvara, odată cu ridicarea temperaturii, are loc adaptarea plantelor la condițiile noi și pregătirea pentru inițierea creșterii, datorită inducerii proceselor de dividere a celulelor din mugurii stejarilor. Aceste procese, la rândul lor, implică activarea enzimelor care asigură descompunerea peroxidului de hidrogen (catalazele și peroxidazele), utilizarea oxigenului cu implicarea diferitelor reacții enzimatică (asigurate de oxidaze) și substanțe antioxidante (substanțe fenolice, flavonoizi etc.). Metoda de oximetrie, utilizată de noi, a oferit posibilitatea de a determina separat activitatea sumară a componentelor utilizate în neutralizarea directă, sau pe cale enzimatică, a speciilor reactive de oxigen. Totodată, parametrii determinați cu ajutorul acestei metode reprezintă rezultatul integral al unui număr mare de procese biochimice, de aceea informația obținută oferă posibilitatea de a caracteriza integral schimbările proceselor oxidoreductive care au loc la nivel enzimatic și metabolic sub influența diferiților factori.

Concluzii

1. Primăvara, în extractele din mugurii stejarului pufos se manifestă tendința de sporire a capacității sumare de utilizare a oxigenului datorită potențialului reductiv al substanțelor fenolice și activității oxidazelor în paralel cu gradientul de temperaturi pozitive de la nord spre sud, caracteristic pentru răspândirea arborilor, ceea ce denotă existența unui gradient paralel de eliminare a dormitării mugurilor. Tendința respectivă este caracteristică și pentru catalaze, dar se manifestă mai puțin pronunțat.

2. În celulele mugurilor apicali, primăvara, schimbările componentelor ce determină potențialul oxido-reductiv se manifestă mai timpuriu, în comparație cu cele din mugurii laterali. Această accelerare poate fi o cauză a eliminării mai timpurii a dormitării mugurilor apicali în comparație cu cei laterali.

Referințe:

1. CUZA, P. *Instalarea și menținerea speciilor de stejar (aspecte teoretice și practice)*. Chișinău: Mediul Ambient, 2017. 256 p.
2. BERNIER, P., SCHOENE, D. Adapter les forêts et leur gestion aux changements climatiques: un aperçu. En: *Unasilva*, 2009, no.1-2, p.5-11.
3. ROECKNER, E. Past, present and future levels of greenhouse gases in the atmosphere and model projections oil related climatic Changes. In: *J. Exp. Bot.*, 1992, vol.43, p.1097-1109.
4. ROCHEFORT, L., WOODWARD, F.I. Effects of climate change and a doubling of CO₂ on vegetation diversity. In: *J. Exp. Bot.*, 1992, vol.43, p.1169-1180.
5. LANG, G.A., EARLY, J.D., ARROYAVE, N.J. et al. Toward a reduced, universal terminology. In: *Hort Science*, 1985, vol.20, p.809-812.
6. ABBOTT, D.L. *The role of bud scales in the morphogenesis and dormancy of the apple fruit bud. Physiology of tree crops*. London: Academic Press, 1970.
7. COLE, M.E., SOLOMOS, T., FAUST, M. Growth and respiration of dormant flower buds of *Pyrus communis* and *Pyrus calleryana*. In: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1982, vol.107 p.226-231.
8. PINHERO, R.G., RAO, M.V., PALIYATH, G. et al. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. In: *Plant Physiol.*, 1997, vol.114, p.695-704.
9. MATTSON, M.P., CALABRESE, E.J. *A revolution in biology, toxicology and medicine*. New York: Springer, 2010. 214 p.
10. WISE, R.R., NAYLOR, A.W. Chilling-enhanced peroxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. In: *Plant Physiol.*, 1987, vol.83, p.272-277.
11. ALBERDI, M., CORCUERA, L.J. Cold acclimation in plants. In: *Phytochemistry*, 1991, vol.30, p.3177-3184.
12. TOTTEMPUDI, K., PRASAD, M.D., ANDERSON, B.A. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. In: *The Plant Cell.*, no.6, p.65-74.

Prezentat la 03.10.2017