Original researches

Received: 04 November 2021
Revised: 08 November 2021
Accepted: 15 November 2021

Oles Honchar Dnipro National University,
Gagarin Av., 72, Dnipro, 49000, Ukraine

Tel.: +38-097-408-25-02.
E-mail: kamelina502@ukr.net

Cite this article: Shupranova L. V., Holoborodko K. K., Guslistiy A. O., Shulman M. V., Pakhomov O. E. (2021). Peroxidase activity and isoenzyme composition in *Robinia pseudoacacia* L. leaves under the influence of *Parectopa robiniella* Clemens, 1863. *Agrology*, 4(4), 174–179. doi: 10.32819/021020

Peroxidase activity and isoenzyme composition in *Robinia pseudoacacia* L. leaves under the influence of *Parectopa robiniella* Clemens, 1863

L. V. Shupranova, K. K. Holoborodko, A. O. Guslistiy, M. V. Shulman, O. E. Pakhomov
Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine

Abstract. In recent times *R. pseudoacacia* has been suffering from populations of new pests, which cause serious economic damage to this strategic species. Therefore, studying the features of plant defense responses against harmful insects is of great importance for biodiversity conservation for preserving this species in natural and artificial plantings. The aim of the study was to analyze the peculiarities of the activity and isoenzyme composition of peroxidase in *R. pseudoacacia* leaves during attacks by the invading insect *P. robiniella*. In the green plantations of Dnipro city, as the object of research, six groups of *Robinia pseudoacacia* L. model trees of different ages (5 and 35–40 years of age) with the existing leaf damages by *P. robiniella* leaf blotch miner were identified. Differences in benzidine-peroxidase activity were found in the leaves of 5- and 40-year-old *R. pseudoacacia* trees. In 35–40-year-old trees with the presence of leaf blotch miners, the leaves showed a tendency to increase BPOD activity by 24.6% vs control. While in young plants, a significant increase in peroxidase activity was found by 3.8 times due to mechanical damage of the leaves by the miner compared to the control. The revealed significant increase (by 63.2%) in the activity of guaiacol-peroxidase of black locust indicates its active participation in enhancing the barrier functions of leaf cells against *P. robiniella*, and it indicates the promising use of the enzyme as a biomarker for pest influence. The composition of benzidine-peroxidase isoenzymes was analyzed by electrofocusing. The main pattern of changes in the expressiveness of benzidine-peroxidase due to damage of leaves by a pest was a quantitative redistribution of activity between different molecular forms of peroxidase. Several enzyme isoforms from the highly acidic pH zone showed a significant activity increase in *R. pseudoacacia* leaves damaged by *P. robiniella*; this especially applies to the peroxidase system of young black locust plants. The increase in benzidine- and guaiacol-peroxidase activity under the influence of leaf miner may be explained by a change in the gene expression of individual isoforms of peroxidases, which is confirmed by the results of studying the relative share of peroxidase molecular forms with isoelectrofocusing. Calculation of the internal diversity index (KD) of IEF benzidine-peroxidase spectra showed that the studied peroxidase spectra of young and medieval trees of control and experimental samples of *R. pseudoacacia* leaves differ significantly in the level of complexity. Under the influence of the invader the level of complexity increased. The study of the reaction of black locust and the mechanisms of its protection against mechanical damage by phytophages with the involvement of a larger range of enzymes in further research can serve as a theoretical basis for species selection and management to restore it under biotic stress.

Keywords: *R. pseudoacacia* L. leaves; *Parectopa robiniella*; benzidine- and guaiacol-peroxidase activity; isoenzyme expressivity.

Активність та ізоферментний склад пероксидази листя *Robinia pseudoacacia* L. за дії *Parectopa robiniella* Clemens, 1963

Л. В. Шупранова, К. К. Голобородько, А. О. Гуслистый, М. В. Шульман, О. Є. Пахомов
Дніпровський національний університет ім. О. Гончара, Дніпро, Україна

Анотація. Оцінено вплив шкідливої молі-строкатки *Parectopa robiniella* на антиоксидантну систему листків рослин *Robinia pseudoacacia* різного віку (5- та 35–40-річні дерева). Дослідження проведено з метою визначення активності антиоксидантних ферментів: гваякол- і бензидин-пероксидази та ізоферментний склад останньої. Результати показали підвищену активність як бензидин-, так і гваякол-пероксидази за дії комах-інвайдерів. У нашому дослідженні 5-річні дерева *R. pseudoacacia* виявилися більш чутливими до інвазії молі-строкатки: активність бензидин-пероксидази була в 3,8 раза більшою порівняно зі середньовіковими деревами. За присутності *P. robiniella* встановлено також підвищення активності гваякол-пероксидази на 63.2% у рослин

R. pseudoacacia старшого віку. В підсумку декілька ізоформ ензиму зі сильно кислої зони pH виявили суттєве підвищення активності в листках *R. pseudoacacia*, уражених листовим мінером *P. robiniiella*, що може підтверджувати залучення цих ізоензимів у процеси взаємодії рослинної клітини зі шкідником. Розрахунок показника внутрішнього різноманіття (KD) ІЕФ спектрів бензидин-пероксидази показав, що досліджені спектри пероксидази молодих і середньовікових дерев контрольних і дослідних зразків листя *R. pseudoacacia* суттєво розрізняються за рівнем складності, який у 2,1 раза вищий у листі молодих рослин. За впливу інвайдера *P. robiniiella* рівень складності посилювався. Вивчення реакції рослин робінії та механізмів її захисту від механічних пошкоджень фітофагами зі залученням у подальших дослідженнях більшого кола ензимів може слугувати теоретичною основою для відбору та управління видом з метою його відновлення в умовах біотичного стресу. У цілому вплив шкідників посилив захисну систему листя *R. pseudoacacia*, стимулюючи активність антиоксидантних ферментів та змінюючи експресивність ізопероксидаз як у молодих, так і у середньовікових дерев.

Ключові слова: листя *R. pseudoacacia* L.; *Parectopa robiniiella*; активність бензидин- та гваякол-пероксидази; ізоелектричне фокусування; експресивність ізоензимів.

Вступ

Важливим компонентом міських екосистем є *Robinia pseudoacacia* L. (відома як «чорна сарана» або «несправжня акація»), яка, з одного боку, є інвазивним видом (активно витісняє місцеву флору в природному середовищі існування завдяки швидкому проростанню і росту тощо), а з іншого – корисною багатоцільовою деревною породою, яку використовують на пиломатеріали, стовпи, паливо, в меліорації, тваринництві, бджільництві, для отримання деревних волокон та кормів (Bongarten et al., 1992; Dini-Papanastasi and Aravanopoulos, 2008; Wojda et al., 2015). Вважається, що *R. pseudoacacia* швидко натуралізувалася завдяки невеликій кількості природних ворогів у нових умовах існування (Європа), а також через високу адаптивність цього виду (Enescu and Dănescu, 2013; Vítková et al., 2017; Wilkaniec et al., 2021). Але в останні десятиліття інвазії комах-фітофагів являють серйозну проблему для Робінії псевдоакацієвої через проникнення двох інвайдерів молей-строкаток (*Lepidoptera: Gracillariidae*) Північно-американського походження – *Phyllonorycter robiniiella* (Clemens, 1859) та *Parectopa robiniiella* (Clemens, 1863). Ці види знайдені на листочках *R. pseudoacacia* як у природних, так і в штучних насадженнях України (Holoborodko et al., 2016). Гусінь цієї молі живиться мезофілом листків та утворює білуваті міни овальної форми розміром близько 1,4 см². У межах своєї рідної області *Parectopa robiniiella* є олігофагом, який пошкоджує листя декількох деревних видів роду *Fabaceae: Robinia pseudoacacia* L., *Robinia hispida* L., *Robinia viscosa* Vent., *Amorpha fruticosa* L., *Desmodium* sp., *Galactia volubilis* (L.) Britt. і *Meibomia* sp. (Davis and De Prins, 2011). З моменту появи *P. robiniiella* є предметом численних екологічних і біологічних досліджень, особливо в Італії, Румунії, Угорщині, де робінія широко використовується в насадженнях різного призначення і належить до стратегічних культур (Enescu and Dănescu, 2013; Guo et al., 2018; Kirichenko et al., 2018; Wilkaniec et al., 2021).

У лісостанах Північного Степу України насадження *Robinia pseudoacacia* L. виконують також меліоративну, ґрунтозахисну та середовищотвірну функції. Того ж часу вплив дерев Робінії на спектр екосистемних послуг тісно пов'язаний з її фізіологічним станом і здатністю зберігатися в міських насадженнях (Sjöman et al., 2015). Як відомо, функціональні порушення багатьох фізіологічних процесів у рослинах відбуваються через окиснювальну дію стресорів різного походження (абіотичні, біотичні). Експериментальні дослідження (Oszmian'ski et al., 2014; Pentelyuk et al., 2016; Paterska et al., 2017) показали, що рослини мають сильні антиоксидантні системи, що включають високі рівні глутатіону (GSH), поліфеноли, антоціани, каротиноїди та ін., які захищають їх від атак комах-фітофагів.

Але крім неферментативних антиоксидантів, дослідження засвідчили також про антиоксидантну ферментну активність рослин у відповідь на атаки комах-шкідників, особливо про активність пероксидази, яка відображає загальний фітотоксичний ефект (Sánchez-Sánchez H. and Morquecho-Contreras A., 2013; Singh et al., 2013; Shupranova et al., 2019). Вивчення особливостей захисних реакцій *R. pseudoacacia* L. від шкідливих комах є вельми актуальним, так як очікується, що в майбутньому роль робінії зросте через її високу екологічну амплітуду і біологічні характеристики, які роблять її корисною для посушливих земель (Enescu and Dănescu, 2013). Виходячи з цього, мета нашого дослідження полягала у вивченні активності пероксидаз різного функціонального значення (бензидин- і гваякол-пероксидази) в листках дерев *R. pseudoacacia* L. та в аналізі ізоферментної структури цитоплазматичної пероксидази за дії *P. robiniiella*.

Матеріал і методи

Дослідження проведені у вересні 2018 року в промисловому місті Дніпро (підзона Північного Степу України). Місто розташоване в зоні помірних широт з досить активною атмосферною циркуляцією (переважним переміщенням повітряних мас зі сходу на захід). Однією з особливостей клімату території є значні коливання погодних умов з року в рік. Клімат характеризується досить прохолодною зимою і спекотним літом.

Основу промислового комплексу міста складають підприємства чорної металургії, машинобудування, хімічної промисловості та енергетики. Ґрунти досліджених ділянок представлені деградованими чорноземами звичайними з невисоким умістом гумусу (1.0%–4.0%). Для дослідження обрано шість груп модельних дерев *Robinia pseudoacacia* L. різного віку (5-та 35–40-річного віку) з наявним ураженням листя мінером *P. robiniiella*.

Експеримент проводили на 5 екземплярах *Robinia pseudoacacia* L. на кожній ділянці (всього 30 екз.) обраних паркових територій міста. Ділянки, на яких зростають дослідні дерева робінії, включали:

- Ботанічний сад ДНУ імені Олеса Гончара (48°26'14"N, 35°02'35"E; висота над рівнем моря 127–149 м), територія якою є найбільш екологічно сприятливою зоною в місті;
- Центральний парк імені Т. Г. Шевченка (48°27'48"N, 35°4'23"E; висота над рівнем моря 82,5–100 м);
- парк імені Л. Глоби (48°28'N, 35°01'E, висота над рівнем моря 56,8 м), розташований у понижній ділянці центральної частини міста, де відбувається прогресивне накопичення забруднюючих речовин через високу інтенсивність руху автомобільного транспорту;

- парк Мануйлівський (48°29'13.3"N, 35°03'40.6"E), розташований на відстані 1,75 км у південному напрямку від трубопрокатного заводу імені Карла Лібкнехта, в лівобережній частині міста на висоті 56 м над рівнем моря;

- лісопарк Дружба (48°32'2"N, 35°5'42"E; висота над рівнем моря 65–68 м), який знаходиться в лівобережній частині міста з основним джерелом викидів шкідливих речовин в атмосферу трубопрокатний завод імені К. Лібкнехта;

- парк Придніпровський (48°23'59"N, 35°7'59"E; висота над рівнем моря 69–75 м), розташований у східній частині міста. Основне джерело викидів – Придніпровська ТЕС.

Для біохімічних аналізів у середині вересня 2018 р. на річному вегетаційному прирості з нижньої третини крони південної експозиції в суху ясну погоду відбирали листя середньої формації по 5 шт. від 5 дерев робінії псевдоакацієвої одночасно з кожної дослідної ділянки. Листки промивали водою і одразу використовували для екстракції ензимів. Для виділення ферментного препарату листки робінії (0,3 г) гомогенізували в 6 мл 0,05 М трис-HCL буфері, pH 7,4 з 0,5% полівінілпіролідом (PVP). Екстракцію проводили при +40С протягом 1 год та центрифугували 15 хв при 14000 об/хв.

Активність антиоксидантних ферментів бензидин- і гваякол-пероксидази здійснювали спектрофотометричними методами. Активність бензидин-пероксидази (BPOD, EC 1.11.1.7) вимірювали при 490 нм за Gregory (1966).

Ізоферментний склад BPOD проводили як описано в роботі Shupranova et al. (2019) в діапазоні pH 3,5–6,5. Гелі сканували та аналізували за комп'ютерною програмою 1D Phoretix, за якою для кожної ізоформи визначали її питому вагу (%) у загальному спектрі пероксидази. Ізопероксидази характеризували за відносною електрофоретичною рухомістю (R_f). Активність гваякол-залежної пероксидази (GPOD, EC 1.11.1.7) оцінювали згідно Ranieri et al. (2001). Концентрацію легкорозчинних білків визначали за методом Bradford (1976).

Результати досліджень активності ферментів та питомої ваги ізопероксидаз представляли як середнє значення $\bar{x}$, SD (стандартне відхилення). Отримані дані аналізували за допомогою програми Statistica (версія 8, StatSoft, США).

Для оцінки внутрішнього різноманіття спектрів використовували формулу за Tortikov et al. (2010):

$$K_D = \log_2 \cdot N / \sum p_i^2,$$

де K_D – показник різноманіття спектра;

N – кількість компонентів у спектрі;

p_i – питома вага (відносна частка в спектрі, %) кожного компонента.

Для визначення достовірної різниці групових середніх застосовували критерій Тьюкі (Honestly Significant Difference). Відмінності визнані статистично значущими за $p < 0,05$. Контролем слугувало листя без мін.

Результати

Однофакторний аналіз (ANOVA) виявив значні відмінності в параметрах активності BPOD та GPOD, що беруть участь у відповіді на стрес, викликаний інвазією молі-строкатки *P. robiniella*, у листках рослин *R. pseudoacacia* (табл. 1).

У 35–40-річних дерева за присутності молі на листочках *P. robiniella* зафіксовано тенденцію до підвищення активності BPOD (на 24,6%) порівняно з контролем ($p = 0,10$). Дерева 5-річного віку показали найвищу реакцію на дію *P. robiniella*: в листі, ураженого шкідником, активність ферменту підвищувалася в 3,8 раза порівняно з контролем ($p = 1,19 \times 10^{-12}$). Значні статистичні відмінності встановлено й для гваякол-пероксидази, яка виявила достовірно підвищену реакцію ферменту на ураження листочків *P. robiniella*. За її присутності активність підвищувалася на 63,32% ($p = 3,4 \times 10^{-3}$).

Для вивчення ізоферментного складу бензидин-пероксидази детально проаналізовано дві групи дерев різного віку, що зростають у Ботанічному саду, з метою максимально виключити негативний вплив забруднення міського середовища. Обробку електрофореграм здійснювали з розрахунку тих смуг, які чітко візуалізувалися в кожній групі дерев. Стрессова ситуація, спричинена нападом шкідників, призводить до змін експресивності ізопероксидаз у листі робінії псевдоакацієвої (рис. 1, табл. 2). Бензидин-пероксидаза із тканин контрольного листя робінії розділяється на 6 фракцій зі значеннями R_f від 0,44 до 0,75.

У листочках з мінами молі виявлено сім молекулярних форм пероксидази з додатковою зоною з R_f 0,10, відсутньою в контролі (рис. 1, А, табл. 2). Вища частка ізоформ з R_f 0,62 і 0,75 зафіксована в дослідних зразках з *P. robiniella* порівняно з контролем на 36,4 і 19,6% відповідно (рис. 2, А).

Активність інших компонентів знижувалася від 13,7 до 44,9%. У контрольного і дослідного зразків старших дерев

Таблиця 1. Активність антиоксидантних ензимів (BPOD, GPOD) у листках *R. pseudoacacia* різного віку за дії *P. robiniella* (mean $\pm$ SD)

Варіант дослідження	BPOD, од.опт.густ./г СТ · хв (середньовікові дерева)	CV, %	BPOD, од.опт.густ./г СТ · хв (молоді дерева)	CV, %	GPOD, мМ гваяколу/ г СТ хв (середньовікові дерева)	CV, %
Листя <i>P. robiniella</i> без мін	592,13 $\pm$ 140,77 ^a	23,8	728,90 $\pm$ 3,57 ^a	0,49	6,09 $\pm$ 2,87 ^a	47,1
Листя <i>P. robiniella</i> з мінами	737,59 $\pm$ 408,25 ^a	55,3	2784,81 $\pm$ 20,68 ^b	0,74	9,94 $\pm$ 5,10 ^b	51,3

Примітка: значення в стовпчиках, надані літерами *a*, *b*, суттєво відрізнялися відповідно до Tukey-test $P < 0,05$; BPOD – бензидин-пероксидаза; GPOD – гваякол-пероксидаза; СТ – сира тканина.

Рис. 1. ІЕФ-профілі бензидин-пероксидази листя дерев *R. pseudoacacia* різного віку з Ботанічного саду:

А – середньовікові дерева; Б – молоді дерева:

1 – листя без мін; 2 – листя з мінами *P. robiniiella*; Rf – відносна електрофоретична рухомість

Таблиця 2. Характеристика ізопероксидаз у листі дерев *Robinia pseudoacacia* L. з Ботанічного саду ДНУ за механічного пошкодження робінієвим мінером *P. robiniiella*

№ з/п	R _f	Питома вага, %			
		середньовікові дерева		молоді дерева	
		непошкоджене листя	пошкоджене листя <i>P. robiniiella</i>	непошкоджене листя	пошкоджене листя <i>P. robiniiella</i>
1	0,03	-	-	4,13 ± 0,11 ^a	4,18 ± 0,08 ^a
2	0,10	-	11,48 ± 1,15	15,23 ± 0,36 ^a	13,43 ± 0,26 ^a
3	0,31	-	-	12,64 ± 0,32 ^a	9,06 ± 0,18 ^b
4	0,34	-	-	3,59 ± 0,09 ^a	3,21 ± 0,25 ^a
5	0,44	17,89 ± 0,39 ^a	10,19 ± 1,09 ^b	13,03 ± 0,80 ^a	11,28 ± 0,72 ^a
6	0,48	16,10 ± 0,46 ^a	12,29 ± 0,23 ^b	8,25 ± 0,21 ^a	10,40 ± 0,20 ^b
7	0,51	-	-	9,68 ± 0,15 ^a	7,56 ± 0,77 ^a
8	0,54	10,39 ± 0,48 ^a	5,73 ± 0,86 ^b	15,66 ± 0,52 ^a	18,24 ± 0,74 ^b
9	0,58	24,24 ± 0,66 ^a	20,93 ± 0,75 ^b	-	-
10	0,62	9,74 ± 1,99 ^a	13,29 ± 2,42 ^b	-	-
11	0,70	-	-	6,01 ± 0,25 ^a	8,25 ± 0,08 ^b
12	0,75	21,64 ± 0,99 ^a	25,88 ± 1,88 ^b	11,77 ± 0,30 ^a	14,39 ± 0,38 ^b
K _D		13,17 ± 0,72 ^a	16,54 ± 1,03 ^b	28,15 ± 1,06 ^a	33,19 ± 0,95 ^b

Примітка: значення у стовпчиках, позначені різними літерами (a, b), суттєво відрізнялися відповідно до Tukey-test P < 0.05

R. pseudoacacia майже половина активності (відповідно 45,9 та 46,8 %) ензиму зосереджена у двох зонах: R_f = 0,58 та 0,75. Значення KD для пероксидази в пошкоджених мінером листках вище на 25,6 % (p < 0,05) порівняно з контролем.

Спектр пероксидази молодих рослин робінії має більшу кількість ізоформ порівняно зі середньовіковими деревами, а саме 10 (рис. 1, Б). Порівняно з контрольними зразками старших дерев у них реєструються ще чотири зони з R_f, що дорівнює 0,03; 0,31; 0,34 та 0,70, сумарна частка яких становить

26,4%. Питома вага компонентів з R_f = 0,48; 0,54; 0,70 та 0,75 підвищувалася відповідно на 26,1; 16,5; 37,3 та 22,3% (табл. 2, рис. 2, Б). Відносна частка ізопероксидаз розподілена більш рівномірно, ніж у старших дерев. Показник внутрішнього різноманіття спектра (KD) для пероксидази в дослідних листках також виявився достовірно вищим на 17,9 % порівняно з контролем.

Рис. 2. Зміни питомої ваги ізопероксидаз у листі дерев *R. pseudoacacia* за дії *P. robiniiella*:
 А – середньовікові дерева; Б – молоді дерева

Обговорення

Дані наукових літературних джерел свідчать про численні зміни в фізіології та біохімії рослин за дії механічного пошкодження листя шкідниками (Oszmian'ski et al., 2015; Paterska et al., 2017). Так, порушуються водообмін, фотосинтетичні процеси, відбуваються зміни во вторинному метаболізмі, спрямованому на захист рослинних клітин від негативного впливу фітофагів (Gill et al., 2010; Singh et al., 2013; Pentelyuk et al., 2016). За впливу шкідників у клітинах рослин розвивається окиснювальний стрес, пов'язаний з посиленою продукцією активних форм кисню (АФК), у нейтралізації яких беруть участь рослинні пероксидази класу III, зокрема гваякол-пероксидаза, за активної дії якої відбувається укріплення клітинної стінки шляхом полімеризації фенольних сполук з утворенням лігніну і суберину (He et al., 2011; Takashima et al., 2013).

Нами показано, що листя дерев *R. pseudoacacia*, уражене фітофагом, характеризується значно вищим рівнем активності пероксидаз відносно до непошкодженого листя. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів, тобто механічні пошкодження тканин листя індукують активність пероксидази (Gill et al., 2010; He et al., 2011; Singh et al., 2013; Shupranova et al., 2019). Це свідчить про те, що вивчені ферменти беруть участь в адаптації рослин

R. pseudoacacia до дії інвайдера *P. robiniiella*. Молоді рослини робінії псевдоакацієвої виявилися більш чутливими до дії фітофагів, ніж середньовікові, про що свідчить високий рівень активності бензидин-пероксидази порівняно з контролем. На основі аналізу активності гваякол-пероксидази встановлено її підвищення на 63,2%. Звернемо увагу на досить високий рівень варіабельності показників активності пероксидаз старших дерев (47,1 – 55,5%), що, ймовірно, визначається екологічними умовами, зокрема, різним рівнем забрудненості території досліджуваних парків.

Отримані дані характеризують кількісні та якісні зміни у складі пероксидазної системи в листі двох вікових груп *R. pseudoacacia* в умовах атаки молі-строкатки *P. robiniiella*. У листі молодих дерев встановлено 10 молекулярних форм пероксидази, того часу як у старших – тільки шість. У листі таких дерев робінії зафіксовано додаткову ізоформу BPOD за дії інвайдера з $R_f = 0,10$ порівняно з контролем. Відносна частка ізоформ пероксидази в листі рослин непошкодженого і ураженого шкідником різна – достовірні відмінності цих показників спостерігаються в старших дерев по всьому спектру, а в молодих – у п'ятьох з десяти компонентів. Механічне пошкодження

листіків фітофагом активує експресію ряду ізопероксидаз, що підтверджується результатами інших досліджень (Singh et al., 2013; War et al., 2018). Нами доведено, що за дії стресу, викликаного механічним пошкодженням тканини листків, основне навантаження в пероксидазній системі припадає на молекулярні форми пероксидази з найбільш кислого діапазону рН (значення R_f від 0,54 до 0,75).

Для характеристики рослин *R. pseudoacacia* за впливу комах-шкідників розраховано показник внутрішнього різноманіття (KD) ІЕФ спектрів цитоплазматичної пероксидази. Показано, що рівень складності контрольних спектрів молодих рослин в 2,1 раза вище, ніж у старших дерев. У листі 40-річних рослин робінії 45,9% активності зосереджено у двох зонах, тоді як у молодих дерев розподіл активності більш рівномірний, що свідчить про досить високий рівень складності пероксидазної системи молодих дерев. За впливу фітофагів значення цього показника зростає на 25,6% у старших дерев і на 17,9% – у молодих, що вказує на суттєву відмінність в експресії ізопероксидаз контрольних і дослідних зразків, що може бути пов'язано з ускладненням функціонування генетичного апарату листя *R. pseudoacacia*.

Висновки

Отримані результати свідчать про активізацію фермента антиоксидантної системи захисту пероксидази в листках *R. pseudoacacia* за впливу молі-мінера *P. robiniiella* у дерев різного віку (5- та 40-річного віку). Встановлено, що молоді дерева виявилися більш чутливими до впливу мінуючої молі: активність бензидин-пероксидази була достовірно підвищена в 3,8 раза порівняно зі середньовіковими деревами. Причиною такого суттєвого підвищення активності можна вважати більш високий рівень гетерогенності пероксидази у 5-річних дерев робінії, який становить 10 ізоформ порівняно зі шістьма в 40-річних рослин. Показано, що одним із механізмів захисту рослин *R. pseudoacacia* від шкідників є активізація ізоформ цитоплазматичної пероксидази в діапазоні з більш кислими значеннями рН. Виявлено, що рівень активності гваякол-пероксидази був вищим на 62,3% за дії інсекта порівняно з листям без мін, що свідчить про посилення бар'єрних властивостей клітин, оскільки цей ензим бере участь у процесах суберинізації та лігніфікації.

Розрахунок показника внутрішнього різноманіття продемонстрував, що досліджені спектри пероксидази молодих і середньовікових дерев контрольних і дослідних зразків листя

R. pseudoacacia суттєво розрізняються за рівнем складності, який удвічі вищий за рівень у листі молодих рослин. За впливу інвайдера *P. robinella* рівень складності посилювався.

Майбутні дослідження в перспективі мають зосередитися на розумінні механізмів захисту рослин *Robinia pseudoacacia* L. від інвазійних видів комах із залученням більш широкого кола ензимів.

References

- Bongarten B.C., Huber D.A. & Apsley D.K. (1992). Environmental and genetic influences on short-rotation biomass production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) in the Georgia Piedmont. *For. Ecol. Manage.* 55, 315–331.
- Davis D.R., De Prins J. (2011). Systematics and biology of the new genus *Macrosaccus* with descriptions of two new species (*Lepidoptera*, *Gracillariidae*). *ZooKeys*, 98, 29–82.
- Dini-Papanastasi O. and Aravanopoulos F.A. (2008). Artificial hybridization between *Robinia pseudoacacia* L. and *R. pseudoacacia* var. *monophylla* Carr. *Forestry*, 81(1), 91–101. doi: [10.1093/forestry/cpm047](https://doi.org/10.1093/forestry/cpm047)
- Enescu, C.M.; Dănescu, A. (2013). Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) – an invasive neophyte in the conventional land reclamation flora in Romania. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov Series II, Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering*, 6(55), 2, 24–30.
- Gill, R. S., Gupta, K., Taggar, G. K., & Taggar, M. S. (2010). Role of oxidative enzymes in plant defenses against herbivory. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 45(2), 277–290.
- Gregory, R.P.F. (1966). A rapid assay for peroxidase activity. *Biochem. J.*, 101 (3), 582–583.
- Guo, X., Ren, X., Elle, F. (2018) Higher phenotypic plasticity does not confer higher salt resistance to *Robinia pseudoacacia* than *Amorpha fruticosa*. *Acta Physiol Plant*, 4, 40–79. doi: [10.1007/s11738-018-2654-3](https://doi.org/10.1007/s11738-018-2654-3)
- He, J., Chen, F., Chen, S., Lv, G., Deng, Y., Fang, Z., Guan, Z., He, C. (2011). Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. *Journal of Plant Physiology*, 168, 687–693.
- Holoborodko, K.K., Marenkov, O.M., Gorban, V.A., Voronkova, Y.S. (2016). The problem of assessing the viability of invasive species in the conditions of the steppe zone of Ukraine. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 24(2), 466–472.
- Kirichenko, N., Augustin, S. and Kenis, M. (2018). Invasive leafminers on woody plants: a global review of pathways, impact, and management. *Journal of Pest Science*, 92, 93–106. doi: [10.1007/s10340-018-1009-6](https://doi.org/10.1007/s10340-018-1009-6)
- Oszmian, J., Kalisz, S., Wojdyło, A. (2014) The content of phenolic compounds in leaf tissue of white (*Aesculus hippocastanum* L.) and red horse chestnut (*Aesculus carnea* H.) colonized by the horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic'). *Molecules*, 19, 14625–14636. doi: [10.3390/molecules190914625](https://doi.org/10.3390/molecules190914625)
- Paterska, M., Bandurska, H., Wysłouch, J., Molińska-Glura, M., Moliński, K. (2017). Chemical composition of horse-chestnut (*Aesculus*) leaves and their susceptibility to chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić. *Acta Physiol. Plant*, 39(105), 1–16. doi: [10.1007/S11738-017-2404-Y](https://doi.org/10.1007/S11738-017-2404-Y)
- Pentelyuk, O.S., Lihanov, A.F., Hryhoryuk, I.P. (2016). Dynamics of polyphenols content in the leaves of bitter chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) under conditions of mechanical damage. *Bioresursy i pryrodokorystuvannya*, 1–2, 5–12 (in Ukrainian).
- Sjöman, H., Hiron, A.D., Bassuk, N.L. (2015). Urban forest resilience through tree selection–Variation in drought tolerance in *Acer*. *Urban Forestry & Urban Greening*, 14(4), 858–865.
- Sánchez-Sánchez, H. & Morquecho-Contreras, A. (2013). Chemical Plant Defense against Herbivores. *Herbivores*, Vonnice D. C. Shields, IntechOpen. Chapter 1, 3–29. doi: [10.5772/6734619](https://doi.org/10.5772/6734619)
- Singh, H., Dixit, S., Verma, P. C., Singh, P. K. (2013). Differential peroxidase activities in three different crops upon insect feeding. *Plant Signal and Behaviour*, 8(10), 1–7.
- Shupranova, L.V., Holoborodko, K.K., Seliutina, O.V., Pakhomov, O.Y. (2019). The influence of *Cameraria ohridella* (*Lepidoptera*, *Gracillariidae*) on the activity of the enzymatic antioxidant system of protection of the assimilating organs of *Aesculus hippocastanum* in an urbogenic environment. *Biosyst. Divers.*, 27(3), 238–243. doi: [10.15421/011933](https://doi.org/10.15421/011933)
- Takashima, Y., Suzuki, M., Ishiguri, F., Iizuka, K., Yoshizawa, N., Yokota, S. (2013). Cationic peroxidase related to basal resistance of *Betula platyphylla* var. *japonica* plantlet No. 8 against canker-rot fungus *Inonotus obliquus* strain IO-U1. *Plant Biotechnology*, 30(2), 199–205. doi: [10.5511/plantbiotechnology.13.0312b](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.0312b)
- Toptikov, V.A., Dyachenko, L.F., Totsky, V.N. (2010). Assessment of the spectra of multiple forms of enzymes using an index of internal diversity. *Cytology and genetics*, 44(1): 46–53.
- Vitková, M., Müllerová, J., Sádlo, J. et al. (2017). Black locust (*Robinia pseudoacacia*) beloved and despised: A story of an invasive tree in Central Europe. *Forest Ecology and Management*, 384, 287–302. doi: [10.1016/j.foreco.2016.10.057](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.10.057)
- War, A. R., Taggar, G. K., Hussain, B., Taggar, M. S., Nair, R. M., Sharma, H. C. (2018). Plant defence against herbivory and insect adaptations. *AoB PLANTS*, 10(4).
- Wilkaniec, A., Borowiak-Sobkowiak, B., Irzykowska, L., Bręś, W., Świerk, D., Pardela, L., Durak, R., Środulska-Wielgus, J., Wielgus, K. (2021). Biotic and abiotic factors causing the collapse of *Robinia pseudoacacia* L. veteran trees in urban environments. *PLoS One*, 16(1). doi: [10.1371/journal.pone.0245398](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245398)
- Wojda, T., Klisz, M., Jastrzebowski, S., Mionskowski, M., Szyp-Borowska, I., Szczygiel, K. (2015). The geographical distribution of the black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) in Poland and its role on non-forest land. *Papers on Global Change*, 22, 101–113.