DOI <https://doi.org/10.26661/2312-2056/2019-24/1-09>

UDK 577.23: 577.29

INFLUENCE OF *CAMERARIA OHRIDELLA* DESCHKA & DIMIĆ ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN HORSE CHESTNUT LEAVES (*AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.)

**Shupranova L., Holoborodko K., Seliutina O., Pakhomov O.
Oles Honchar Dnipro National University
kamelina502@ukr.net**

Features of reaction of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) trees on act of leafminer *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić are investigated in green plantings of Dnipro city. The intensity of *A. hippocastanum* L. leaves damage by chestnut miner was determined at eight measuring points located in the park zones and Botanical garden of DNU. It has been established distinctions in guaiacol-peroxidase and catalase activity in leaves with different level of lesion. It is shown that the activity of guaiacol peroxidase is significantly increased by medium and high levels of leaf phytophage damage compared to low by 87 and 76%, respectively. The opposite pattern was found by catalase, the activity of which was significantly reduced with increasing levels of damage to the assimilating organs of horse chestnut by the leafminer *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić.

Aesculus hippocastanum L., *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, guaiacol-peroxidase activity, catalase activity

Today, the problem of protecting white horse chestnut trees (*Aesculus hippocastanum* L.) from the attack of the invasive leafminer phytophage *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, causing premature leaf fall, loss of decorativeness and, as a result, a significant decrease in the function of air pollution purification in industrial cities [7]. The action of this pest leads to physiological, biochemical, anatomical and morphological changes in horse chestnut [2, 4, 9, 12, 13].

The plant's protective system includes a number of oxidizing enzymes capable of stabilizing the level of reactive oxygen species (ROS) formed under the influence of adverse environmental factors, including the attack of insects and microorganisms [1, 14, 15, 17]. Due to the fact that the activity of antioxidant enzymes in horse chestnut trees infected with mining moths has been little studied, the aim of this study was to analyze changes in the activity of guaiacol peroxidase and catalase in

leaves of *A. hippocastanum* L. of varying degrees of lesion by *C. ohridella*.

Materials and methods

Horse chestnut leaves were collected in the first week of July in 2018 from 8 measuring points located in the Dnipro city, Ukraine. It's were located within the city in Manujlivs"kyj, Molodizhnyy, Prydniprvs"kyj, T. H. Shevchenka, L. Hloby parks, forest-park Druzhba narodiv, Metallurhiv Square and Botanical garden of DNU. Five trees were selected at each measuring points from which five leaves were collected from different trees of horse chestnut at each point. We analyzed a total of 40 trees. Based on the visual determination of the damage degree to the leaves for [5], three groups of trees were determined with a low (8–10 %), medium (40–55 %) and high (80–90 %) level of leaves damage of *A. hippocastanum* by *C. ohridella*.

Antioxidant enzyme activity and content of lightly-soluble proteins were determined in the supernatants obtained by centrifugation (14000 g for 15 min and 4 °C) of crude extracts (300 mg of fresh leaves homogenized with 0.1 M TRIS-HCl buffer, pH 7.4 contained 0.1% polyvinylpyrrolidone). Catalase (CAT) activity was evaluated according to Goth [10] by measurement at 410 nm of optical density of reactive mixture containing 0.2 ml sample, 0.1 % H₂O₂, and 4 % ammonium molybdate. The result was calculated through the calibration graph and expressed in mM H₂O₂/g FW. The content of lightly-soluble proteins (LSP) was determined according to Bradford [8]. Guaiacol-dependent peroxidase activity (GPOD, EC 1.11.1.7) was evaluated according to Ranieri et al. [19] by determining the Guaiacol oxide at 470 nm in the reaction mixture containing acetic buffer (pH 6.0), 2 mM Guaiacol solution, 0.2 ml of enzyme preparation and 0.15 % H₂O₂. The results were calculated, taking into account the molar extinction coefficient (26.6 mM⁻¹ cm⁻¹) and expressed in mM Guaiacol / g of fish weight (FW).

All determinations of the biochemical parameters characterizing the horse chestnut leaves required nine replicates.

Data represent mean values and standard deviations (±SD). The data obtained were analyzed using Statistica (version 8, StatSoft, USA).

Results and discussion

Peroxidases (POX) generally react to compounds containing a hydroxyl group(s) attached to an aromatic ring. Guaiacol (*o*-methoxy phenol) is commonly used a substrate for the measurement of POX activity. Dehydrogenative oxidation of guaiacol by peroxidase results in the formation of phenoxy radicals, and the subsequent coupling of unstable radicals leads to the non-enzymatic polymerization of monomers and larger molecules in the cell wall [11]. Many studies have indicated the importance of peroxidases in defense against pathogen infection, insects, wounding [3, 7, 12].

As a result of the experiment, it was shown that the activity of guaiacol peroxidase in the leaves of chestnuts with low damage by moth (8–10 %) was the lowest compared to the average and high degree of leaf damage by a pest (table).

Table – Enzymes activity in *Aesculus hippocastanum* L. leaves of different level of lesion by *C. ohridella* (n = 9; x ± SD)

Monitoring site		GPOD, mM guaiacol/ g FW min	V, %	CAT, μM H ₂ O ₂ /mg protein min	V, %
Manujlvs"kyj park	LLD	4,52 ± 0,596	13,2	1,87 ± 0,243	13,0
Molodizhnyy park		4,48 ± 0,521	22,3	1,84 ± 0,162	8,8
Prydniprvs"kyj park		5,89 ± 0,404	6,9	1,98 ± 0,142	7,2
T. H. Shevchenka	MLD	8,12 ± 0,236	2,9	1,57 ± 0,239	15,2
L. Hloby park		10,14 ± 0,907	8,9	1,67 ± 0,163	9,8
Botanical garden of DNU		9,55 ± 0,339	3,5	1,49 ± 0,347	23,3
Druzhby narodiv	HLD	9,00 ± 0,842	9,4	1,48 ± 0,299	20,2
Metallurhiv Square		8,41 ± 0,348	4,1	1,29 ± 0,284	22,0

LLD – low level of damage; MLD – medium level of damage; HLD – high level of damage

On average, the enzyme activity significantly increased by 87 and 76 % in chestnut leaves with medium and high degree of damage compared to low. This suggests that peroxidase forms the development of a plant defense reaction in response to the influence of chestnut miner.

As you know, an increase in the activity of guaiacol peroxidase is due to the fact that it takes part in the processes of suberization, lignification, wound healing and protection against pathogenic infection [11, 16, 18].

The role of catalase is to protect cells from hydrogen peroxide, which was formed as a result of metabolic processes and in providing plants with oxygen. Catalase acts in cells with peroxidase and destroys that part of hydrogen peroxide that cannot be inactivated by peroxidase [20]. The study of catalase activity showed an inverse relationship compared with peroxidase - a decrease in activity with an increase in the degree of leaf damage by a mining moth by an average of 17 and 27 % (see table). A decrease in the activity of catalase with respect to peroxidase is noted in S. Sichkar and K. Korobkova [6], which is explained by a change in the activity of catalysis enzymes of aerobic oxidation of the respiratory substrate under the influence of infection.

Conclusions

1. The dependence of the activity of guaiacol peroxidase and catalase on the degree of damage to the leaves of *A. hippocastanum* L. by chestnut miner *C. ohridella* is shown.

2. The activity of guaiacol peroxidase significantly increased with an average (50 %) and high (85 %) level of damage to the leaves of chestnut horse mining moth, while catalase showed an inverse relationship - a decrease in activity with an increase in the degree of damage to the leaves.

3. The observed changes in the activity of guaiacol peroxidase of horse chestnut leaves indicate its active participation in protective processes against the mining moth *C. ohridella* and indicate the prospect of using the enzyme as a biomarker under the action of a pest.

References:

1. Воронкова Ю. С., Голобородько К. К., Маренков О. М., Горбань В. А. Проблема дослідження оксидативного стресу у біологічних дослідженнях. Питання біоіндикації та екології. Запоріжжя: ЗНУ, 2016. Вип. 21, № 1–2. С. 222–234.
2. Голобородько К. К., Рябка К. О., Зайцева І. А., Кондратьєва К. В. Поширення та сучасний стан каштанової

мінуючої молі (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, 1986) у м. Дніпропетровськ. Проблеми біоіндикації та екології. 2009. Т. 14, № 2. С. 163–168.

3. Григорюк І. П., Машковська С. П., Яворовський П. П., Колесніченко О. В. Біологія каштанів. Київ: «Логос», 2004. 379 с.

4. Григорюк І. П., Лук'яненко Т. Л. Фізіологічні і молекулярні основи стійкості видів рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої молі. Київ: ЦП «Компринт», 2015. 174 с.

5. Зерова М. Д., Никитенко Г. Н., Нарольський Н. В., Гершензон З. С., Свиридов С. В., Лукаш О. В., Бабидорич М. М. Каштановая минирующая моль в Украине. Киев: «Велес», 2007. 88 с.

6. Січкач С. В., Коробкова К. С. Активність окиснювальних ферментів рослинних клітин за умов експериментального мікоплазмозу. Мікробіол. журн. 2011. Т. 73, № 2. С. 38–43.

7. Baraniak E., Walczak U., Zduniak P. Appearance and migration of the horse-chestnut leafminer *Cameraria ohridella* in relation to city size and leaf-raking, using the example of two cities in Western Poland. J. Pest Sci. 2005. V. 78. P. 145–149.

8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

9. Gilbert M., Gregoire J.C., Freise J.F., Heitland W. Long-distance dispersal and human population density allow the prediction of invasive patterns in the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella*. J. Anim. Ecol. 2004. V. 73. P. 459–468.

10. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta. 1991. Vol. 196. P. 143–152.

11. Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. A large family of class III Plant Peroxidases. Plant Cell Physiol. 2001. V. 42(5). P. 462–468.

12. Jagiello R., Baraniak E., Karolewski P., Łakomy P., Behnke-Borowczyk J., Walczak U., Giertych M.J. Ecophysiological aspects of the interaction between *Cameraria*

ohridella and *Guignardia aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. Dendrobiology. 2017. V. 78. P. 146–156.

13. Lees D.C., Rougerie R., Lack H. W. Tracking origins of invasive herbivores through herbaria and archival DNA: the case of the horse-chestnut leaf miner. Frontiers in Ecology and the Environment. 2011. V. 9. P. 322–328.

14. Low P. S., Merida J. R. The Oxidative Burst in Plant Defence: Function and Signal Transduction. Physiol. Plant. 1996. V. 96. P. 533–542.

15. Lushchak V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. The Ukrainian Biochemical Journal. 2015. V. 87, Issue 6. P. 11–18.

16. Mika A., Lüthje S. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. Plant Physiol. 2003. V. 132(3). P. 1489–1498.

17. Mohan R., Bajar A. M., Kolattukudy P. E. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (TAP1) by wounding in transgenic tobacco and activation of TAP1/GUS and TAP2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. Plant Mol. Biol. 1993. V. 21. P. 341–354.

18. Prasannath K. Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences. 2017. V. 11(1). P. 38–48.

19. Ranieri A., Castagna A., Baldam B., Soldatini G. F. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. J. Exp. Bot. 2001. V. 52 (354). P. 25–35.

20. Temple M., Perrone G., Dawes I. Complex cellular responses to reactive oxygen species. Trends in Cell Biol. 2005. 15, N 6. P. 31–326.

ВПЛИВ CAMERARIA OHRIDELLA DESCHKA & DIMIĆ НА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ЛИСТЯ КАШТАНУ КІНСЬКОГО (AESCULUS HIPPOCASTANUM L.)

**Шупранова Л. В., Голобородько К. К., Селютіна О. В.,
Пахомов О. Є.**

**Дніпровський національний університет імені Олеся
Гончара**

kamelina502@ukr.net

Проблема захисту дерев каштана кінського білого (*Aesculus hippocastanum* L.) від нападу інвазійного листкового мінера *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, який спричиняє передчасне опадання листя, втрату декоративності та, як наслідок, значне зниження функції очищення забруднення повітря в промислових містах, є актуальною. Активність ферментів антиоксидантного захисту у дерев каштана кінського, заражених мінуючою міллю на сьогоднішній день вивчена недостатньо. Мета дослідження – аналіз змін активності гваякол-пероксидази та каталази в листках *A. hippocastanum* L. різного ступеня ураження *C. ohridella*.

В результаті проведених досліджень визначено інтенсивність пошкодження листя *Aesculus hippocastanum* L. з восьми моніторингових точок, локалізованих у паркових зонах м. Дніпро і Ботанічному саду Дніпровського національного університету ім. Олеса Гончара. На основі візуального спостереження ступеня ураження листя було визначено три групи дерев з низьким (8–10 %), середнім (40–55 %) та високим (80–90 %) рівнем пошкодження дерев *A. hippocastanum* шкідником.

Встановлено індивідуальні відмінності в активності гваякол-пероксидази та каталази в листках каштану кінського з різним рівнем ураження шкідником. Показано, що активність гваякол-пероксидази достовірно підвищується за середнього та високого рівня пошкодження фітофагів листя порівняно з низьким на 87 та 76 %, відповідно. Протилежна картина виявлена для каталази, активність якої знижувалась із збільшенням рівня пошкодження асимілюючих органів рослин каштану листковим мінером *C. ohridella* Deschka & Dimić (у середньому 17 і 27 %, відповідно, до середнього і високого рівня пошкодження листя).

Варіабельність каталази і гваякол-пероксидази у дерев *A. hippocastanum* знаходилась у межах норми (2,9–23,3 %).

Спостережуване суттєве підвищення активності гваякол-пероксидази листя каштана кінського вказує на його активну участь у захисних процесах (посилення бар'єрних функцій клітин) проти мінуючої молі *C. ohridella* і вказують на перспективу використання ферменту як біомаркера на дію шкідника.