

ВМІСТ ПРООКСИДАНТІВ ТА АНТИОКСИДАНТІВ В ТКАНИНАХ *SOLANUM TUBEROSUM* L. ЗАЛЕЖНО ВІД СОРТОВОЇ ІМУНОСТІЙКОСТІ

Боброва М.С.¹, Голодаєва О.А.², Ворона С.О.³

¹Центральноукраїнський державний педагогічний університет імені Володимира Винниченка
вул. Шевченка, 1, 25006, м. Кропивницький

²Київський міжнародний університет
вул. Львівська, 49, 03179, м. Київ

³Кіровоградський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
Міністерства внутрішніх справ України
вул. Вокзальна, 58, 25006, м. Кропивницький

kazna4eeva@gmail.com, elena.gologaeva@gmail.com, biolog-1@ukr.net

У статті розкрито роль прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) у забезпеченні стійкості рослинного організму до хвороб. Стан прооксидантної (ПО) данки оцінювали за рівнем генерації супероксиду. Визначали як фоновий, так і стимульований рівні. Ступінь деструктивної дії прооксидантів визначали за вмістом ТБК-активних продуктів, а саме малонового діальдегіду (МДА). Ферментними складовими лінії антиоксидантного (АО) захисту в експерименті обрано супероксиддисмутазу (СОД) та каталазу. Ключовими низькомолекулярними антиоксидантами обрано аскорбінову кислоту (АК) та глутатіон. У статті здійснено порівняльний аналіз компонентів ПАС в тканинах бульб *Solanum tuberosum* L. різних за рівнем стійкості до хвороб сортів. Дослідним шляхом виявлено зниження значення як фонового так і стимульованого дріжджами вмісту супероксиду зі збільшенням стійкості сорту до хвороб. Встановлено найбільший рівень Δ МДА в тканинах сорту «Серпанок». АК, як ключовий низькомолекулярний АО має найвищу концентрацію в тканинах сорту «Тирас». СОД та каталаза при міжсорттовому порівнянні також зменшують активність при переході від сорту «Тирас» до «Серпанок». Результатами проведеного дослідження підтверджується індикаторна роль цитохромоксидази у визначенні ступеня пошкодження мембран прооксидантами та їх похідними, а також активність ланки антиоксидантного захисту. Так, високостійкий сорт «Тирас» має найвищу активність цитохромоксидази, та найбільші значення показників ферментних та низькомолекулярних антиоксидантів. Встановлено, що при збільшенні рівня стійкості сорту рослин до хвороб спостерігається збільшення значення ферментних та низькомолекулярних антиоксидантів. Виявлено, що рівень генерації супероксиду має оберненопропорційну залежність з рівнем стійкості сорту до хвороб. Доведено, що вміст ТБК-активних продуктів генерується супероксидом, але залежить від потужності антиоксидантної ланки тканин. Підтверджено факт що цитохромоксидаза є індикатором взаємоузгодженості обох ланок ПАС. Встановлено що відсутність фотосинтетичних та репродуктивних процесів в тканинах бульб *Solanum tuberosum* L. призводить до незначного переважання антиоксидантної ланки ПАС. **Ключові слова:** прооксиданти, антиоксиданти, стійкість сорту рослин до хвороб, *Solanum tuberosum* L.

Content of prooxidants and antioxidants in tissues *Solanum tuberosum* L. depending on various immunity resistance.
Bobrova M., Holodaieva O., Vorona S.

The article reveals the role of the prooxidant-antioxidant system (PAS) in ensuring the resistance of the plant organism to disease. The state of prooxidant (PO) data was assessed by the level of superoxide generation. Both background and stimulated levels were determined. The degree of destructive action of prooxidants was determined by the content of TBA-active products, namely malonic dialdehyde (MDA). Superoxide dismutase (SOD) and catalase were selected as enzyme components of the antioxidant (AO) line in the experiment. Ascorbic acid (AC) and glutathione have been selected as key low molecular weight antioxidants. The article presents a comparative analysis of PAS components in the tissues of tubers of *Solanum tuberosum* L. different in the level of disease resistance varieties. Experimentally revealed a decrease in the value of both basic and yeast-stimulated superoxide content with increasing resistance to disease. The highest level of Δ MDA in the fabrics of the “Serpanok” variety has been established. AK, as a key low molecular weight AO has the highest concentration in the tissues of the variety «Tiras». SOD and catalase in cross-variety comparison also reduce the activity in the transition from the variety «Tiras» to «Serpanok». The results of the study confirm the indicator role of cytochrome oxidase in determining the degree of damage to membranes by prooxidants and their derivatives, as well as the activity of antioxidant protection. Thus, the highly resistant variety «Tiras» has the highest cytochrome oxidase activity, and the highest values of enzymatic and low molecular weight antioxidants. It is established that with increasing the level of plant variety resistance to diseases, there is an increase in the value of enzymatic and low molecular weight antioxidants. It was found that the level of superoxide generation is inversely related to the level of disease resistance. It is proved that the content of TBA-active products is generated by superoxide, but depends on the power of the antioxidant part of the tissues. The fact that cytochrome oxidase is an indicator

of coherence of both links of PAS is confirmed. It was found that the lack of photosynthetic and reproductive processes in the tissues of tubers of *Solanum tuberosum* L. leads to a slight predominance of the antioxidant link of PAS. *Key words*: prooxidants, antioxidants, plant resistance to diseases, *Solanum tuberosum* L.

Постановка проблеми. Баланс між прооксидантами та антиоксидантами є надзвичайно чутливим біохімічним індикатором впливу факторів як зовнішнього так і внутрішнього середовища. Розуміння механізмів регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу під час вторгнення патогенів бактеріальної, грибової та вірусної природи відкриває широкі перспективи для проведення селекційних робіт по створенню високостійких сортів.

Мета дослідження – виявити як змінюються значення показників прооксидантної та антиоксидантної активності в тканинах *Solanum tuberosum* L. різних за рівнем стійкості до хвороб сортів.

Актуальність дослідження. Селекційні роботи у напрямку виведення стійких до патогенів сортів рослин є актуальними та прогресивними в аграрній сфері. Визначення молекулярних та біохімічних механізмів цієї стійкості є необхідною базою для початку проведення селекційних робіт.

Зв'язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Основними завданнями проведеного дослідження стали:

Виявити зміни у значеннях показників ферментних та низькомолекулярних антиоксидантів в тканинах *Solanum tuberosum* L. залежно від рівня стійкості сорту до хвороб.

Виявити зміни у значеннях показників прооксидантів та маркерів ВРПО (вільнорадикального перекисного окиснення) в тканинах *Solanum tuberosum* L. залежно від рівня стійкості сорту до хвороб.

Дослідити яка ланка прооксидантно-антиоксидантної системи є керівною у забезпеченні стійкості сорту рослин до хвороб.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Зв'язок між утворенням та елімінацією активних форм Оксигену описано в роботах Apel K. та Hirt H. [1]. Численні дослідження Хрипача Л.В., Рєзавої Ю.А., Колупаєва Ю.Е., Костюка В.А., Бараненко В.В., Карпець Ю.В. розкривають прооксидантну роль активного кисню та його похідних, механізми вільнорадикального перекисного окиснення макромолекул [2–9]. Рослинна клітина утворює значно більшу кількість АФО, порівняно з тваринною, що пов'язане з фотосинтетичною активністю, наявністю клітинної стінки та специфічним механізмом імунозахисту, що проявляється у реакції надчутливості та детально зазначено в роботах Kawano T. [8], Heiser I., Elstner E. [9], Foyer C.H., Noctor G. [10]. Зв'язок між рівнем АФО та генною активністю по синтезу АО описують О.П. Дмитрієв та Ж.М. Кравчук [11]. Потужна біохімічна школа Dr Nicholas Smirnoff систематично публікує роботи, присвячені АФО та АОЗ в рослинах [7]. Керівну роль у ПАС рослинної клітини О.Г. Полєска відво-

дить для синглетного кисню, супероксиду, гідроген пероксиду та гідроксильного радикала [12].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Недостатньо висвітленим залишається питання біохімічного механізму впливу прооксидантів, ензиматичних та низькомолекулярних антиоксидантів на захисні реакції рослинного організму, а також взаємозалежність ланок ПАС для забезпечення рослинного імунітету.

Новизна. У роботі вперше виявлена залежність між рівнем генерації супероксиду, вмістом МДА, АК, GSH, СОД та каталази та рівнем стійкості різних сортів *Solanum tuberosum* L. до хвороб

Методологічне або загальнонаукове значення. В результаті проведеної роботи виявлено маркерні показники стану ПАС, які беруть участь у забезпеченні імуностійкості рослин.

Результати, отримані при виконанні роботи, використовуються в наукових дослідженнях кафедри хімії та фармакогнозії Київського міжнародного університету, а також кафедри фізики, біології та методик їхнього навчання Центральноукраїнського державного педагогічного університету імені Володимира Винниченка.

Виклад основного матеріалу. Біохімічний аналіз *Solanum tuberosum* L. здійснювався на тканинах поперечного перерізу геометричної середини бульби. В експерименті використані рослини таких сортів: «Гірас» (високостійкий сорт), «Повінь» (середньостійкий сорт) та «Серпанок» (малостійкий сорт). Кожна дослідна група включала 10 проб.

Методи дослідження. Кількісний вміст про- та антиоксидантів визначали згідно загальноприйнятих методик: так рівень супероксиду $\bullet\text{O}_2^-$ (нмоль $\cdot\text{O}_2^-/\text{гс}$) вимірювали спектрофотометричним НСТ-тестом [13], вміст ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду – МДА) (мкмоль/кг) визначали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою в присутності H^+ -йонів, активність СОД (ОД активності) вимірювали кінетично за швидкістю 50 %-го інгібування аутоокиснення адреналіну, активність каталази (мкмоль/г $\cdot\text{хв}$) – методом О.М. Баха та С.М. Зубкової, активність GSH-пероксидази (ОД активності) – реактивом Елмана, вміст аскорбінової кислоти, АК (ммоль/кг) – методом прямої титриметрії за Тільмансом, рівень GSH (ммоль/кг) – спектрофотометрично, при взаємодії з реактивом Елмана, активність цитохромоксидази (у індофенольних одиницях за хв. на г тканини) – за методом W. Straus [14].

Результати вимірювання значення показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи тканин коренеплодів *Solanum tuberosum* L. та міжсортів порівняльна характеристика наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика ПАС тканин бульб *Solanum tuberosum* L. залежно від рівня стійкості сорту до хвороб

№	Показники стану ПАС	Сорти рослин		
		«Тирас»	«Повінь»	«Серпанок»
1	НСТ тест (фоновий рівень), нмоль•O ₂ ⁻ /г•с	0,094 ± 0,004	0,199 ± 0,006	0,286 ± 0,009
2	НСТ тест (стимуляція дріжджами), нмоль•O ₂ ⁻ /г•с	0,108 ± 0,002	0,254 ± 0,004	0,421 ± 0,013
3	НСТ тест (стимуляція NaF), нмоль•O ₂ ⁻ /г•с	0,089 ± 0,004	0,184 ± 0,009	0,279 ± 0,011
4	Δ МДА, %	41,61 ± 2,45	49,54 ± 1,22	51,99 ± 4,07
5	Аскорбінат, ммоль/кг	0,63 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,19 ± 0,01
6	GSH, ммоль/кг	39,14 ± 0,08	40,06 ± 0,09	40,49 ± 0,11
7	Каталаза, мкмоль/г•хв	1,88 ± 0,09	1,06 ± 0,04	0,73 ± 0,04
8	СОД, ОД	1,33 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,22 ± 0,01
9	GSH-пероксидаза, ОД	2,12 ± 0,02	1,99 ± 0,02	1,71 ± 0,01
10	Цитохромоксидаза, ОД	0,846 ± 0,011	0,654 ± 0,020	0,508 ± 0,019

Аналізуючи результати міжсортного порівняння фонових рівнів продукції •O₂⁻, маємо таке співвідношення: 1 : 1,44 : 3,04 відповідно до сортів «Тирас», «Повінь» та «Серпанок» (p < 0,05). Спостерігаємо збільшення продукції супероксиду на 47,20 % під дією дріжджового стимулятора та зміну вихідного співвідношення на наступне 1 : 2,35 : 3,89 (p < 0,05). При стимуляції розчином NaF достовірної зміни фонових рівнів супероксиду в усіх дослідних об'єктах не виявлено.

Оскільки генерація супероксиду призводить до утворення ТБК-активних продуктів, тому закономірним є найбільший рівень Δ МДА в тканинах сорту «Серпанок», що також може свідчити про низький рівень активності антиоксидантної ланки у мало-стійкого сорту.

АК, як ключовий низькомолекулярний АО має найвищу концентрацію в тканинах сорту «Тирас», що в 1,66 (p < 0,05) рази переважає «Повінь» і 3,32 рази (p < 0,05) «Серпанок». «Повінь» і «Серпанок» мають двократне переважання вмісту АК (p < 0,05). Порівняння досліджуваної концентрації GSH не мало достовірної міжсортної різниці в результатах.

Аналізуючи результати визначення активності каталази та СОД, які є першими і найголовнішими ферментними антиоксидантами, що виділяються у відповідь на утворення вільних радикалів, можна спостерігати їх прямо пропорційний зв'язок з рівнем стійкості сорту до хвороб. Так, активність каталази сорту «Серпанок» в 2,56 разів менша ніж у «Тирас», та в 1,45 менша ніж у «Повінь» (p < 0,05). Активність СОД в тканинах

«Тирас» переважає «Повінь» в 6,05 рази, а активність GSH-пероксидази – в 1,24 рази.

Результатами проведеного дослідження підтверджується індикаторна роль цитохромоксидази у визначенні ступеня пошкодження мембран прооксидантами та їх похідними, а також активність ланки антиоксидантного захисту. Так, високостійкий сорт «Тирас» має найвищу активність цитохромоксидази, та найбільші значення показників ферментних та низькомолекулярних антиоксидантів.

Головні висновки: 1) при збільшенні рівня стійкості сорту рослин до хвороб спостерігаємо збільшення значення ферментних та низькомолекулярних антиоксидантів; 2) рівень генерації супероксиду має оберненопропорційну залежність з рівнем стійкості сорту до хвороб; 3) вміст ТБК-активних продуктів генерується супероксидом, але залежить від потужності антиоксидантної ланки тканин; 4) цитохромоксидаза є індикатором взаємоузгодженості обох ланок ПАС; 5) відсутність фотосинтетичних та репродуктивних процесів в тканинах бульб *Solanum tuberosum* L. призводить до незначного переважання антиоксидантної ланки ПАС.

Перспективи використання результатів дослідження. Розширення посівних площ високостійких до хвороб сортів є перспективним та економічно обґрунтованим напрямком інтенсифікації сільського господарства. Розуміння біохімічних механізмів імуностійкості відкриває перспективу використання цих важелів для регуляції метаболізму та адаптації рослин до змінних умов існування.

Література

1. Apel K. Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Plant Biol. 2004. Vol. 55. P. 373–399.
2. Хрипач Л.В., Рєвазова Ю.А. Роль свободнорадикального окислення в пошкодженні генома факторами оточуючої середовища. Вестник РАМН. 2004. № 3. С. 16–18.
3. Колупаєв Ю.Е. Активні форми кислого в рослинах при дії стресорів: утворення та можливі функції. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2007. Вип. 3(12). С. 6–26.

4. Костюк В.А. Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Мн. : БГУ, 2004. 179 с.
5. Колупаєв Ю.Є. Карпець Ю.В. Активність супероксиддисмутази і каталази у колеоптилях пшениці за дії перексиду водню і нагрівання. Физиология и биохимия культ. растений. 2007. Т. 39, № 4. С. 319–325.
6. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений. Цитология, 2006. Т 48. № 6. С. 465–474.
7. Smirnoff N. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. NY : Blackwell Publishing, 2005. 302 p.
8. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species generating peroxides reaction in plant defense and growth induction. Plant Cell. Repts. 2003. Vol. 21, № 9. P. 829–837.
9. Heiser I. Elstner E. Biochemical mechanisms of plant defense a central role for reactive oxygen species. Plant Prot. Sci. 2002. Vol. 38, Spec Issue 1. P. 76–86.
10. Foyer C.H. Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant, Cell and Enviroment. 2005. Vol. 28. P. 1056–1071.
11. Дмитрієв О.П. Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин. Цитология и генетика, 2005. № 39(4). С. 64–75.
12. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва : КДУ, 2007. 140 с.
13. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом. Актуальні проблеми сучасної медицини. Вип. 1. 2002. Т. 2. С. 96–97.
14. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині. Під ред. І. П. Кайдашева, О. В. Катрушова, В. М. Соколенко, О.І. Цебржинського. Полтава, 1996. 271 с.