

ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ КОМПОНЕНТІВ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В ТКАНИНАХ КОРЕНІВ *ALLIUM CEPA L.*

Боброва М.С.¹, Ворона С.О.²

¹Центральноукраїнський державний педагогічний університет
імені Володимира Винниченка
вул. Шевченка, 1, 25006, м. Кропивницький
kazna4eeva@gmail.com

²Кіровоградський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
Міністерства внутрішніх справ України
вул. Вокзальна, 58, 25006, м. Кропивницький
biolog-1@ukr.net

У статті розкрито залежність балансу вмісту прооксидантів і антиоксидантів в тканинах організму від впливу екологічних факторів середовища. Зазначено роль прооксидантно-антиоксидантної системи для організму рослин і тварин. Наголошено на недостатньому рівні систематизації наявної інформації про роль прооксидантно-антиоксидантної системи в забезпеченні стійкості рослин до патогенів. Експериментальним шляхом виявлено рівень та джерела генерації супероксиданіонрадикалу як основного прооксиданту; фонову та стимульовану концентрацію малонового діальдегіду як першочергового продукту перекисного окиснення ліпідів і активність цитохромоксидази як ключового ферменту, що є маркером рівня пошкодження мембран прооксидантами. Досліджено активність основних ферментних антиоксидантів: супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази. Виявлено рівень основних низькомолекулярних антиоксидантів: аскорбінової кислоти, глутатіону. Здійснено порівняльний аналіз всіх перерахованих показників в тканинах коренів *Allium cepa L.* різних за рівнем стійкості до хвороб сортів. Виявлено, що у високостійкого сорту відмічається як підвищений рівень генерації супероксиданіонрадикалу, так і найвища активність ферментних антиоксидантів і високий рівень низькомолекулярних антиоксидантів. Рівень пошкодження мембран тканин коренів *Allium cepa L.* високостійкого сорту незначний, про що свідчить найнижча концентрація малонового діальдегіду в порівнянні з результатами, встановленими для середньо- і малостійкого сорту. Протилежне значення показників виявлене в тканинах малостійкого сорту. В результаті проведеного дослідження сформульовано висновки про взаємозалежність рівня стійкості сорту *Allium cepa L.* до хвороб та вмісту прооксидантів та антиоксидантів в його тканинах. *Ключові слова:* прооксиданти, антиоксиданти, стійкість сорту рослин до хвороб, *Allium cepa L.*

Features of the state of the components of the prooxidant and antioxidant system in *Allium cepa L.* root tissues. Bobrova M., Vorona S.

The dependence of the balance of the content of prooxidants and antioxidants in the body tissues from the influence of environmental factors of the medium is noted. The value of the prooxidant-antioxidant system for the organism of plants and animals is revealed. The features of its functioning in plant tissues are noted. It is emphasized that there is insufficient level of systematization of available information about the role of the prooxidant-antioxidant system in ensuring the resistance of plants to pathogens. Experimentally found: the level and sources of superoxide anion radical generation as the main prooxidant; background and stimulated concentration of malonic dialdehyde as the primary product of lipid peroxidation and cytochrome oxidase activity as a key enzyme marker of the level of membrane damage by prooxidants. The activity of the main enzyme antioxidants: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase was studied. The level of basic low molecular weight antioxidants: ascorbic acid, glutathione has been revealed. A comparative analysis of all of these parameters in the tissues of *Allium cepa L.* differing in the level of resistance to diseases of the varieties is carried out. It was found that in the tissues of plants variety with high level resistance to the diseases there is marked high level of generation of superoxide anion radical, and the highest activity of enzyme antioxidants and high level of low molecular weight antioxidants. The level of damage to the membranes of the root tissues of high resistance to the diseases is small, as evidenced by the lowest concentration of malondialdehyde in comparison with the results established for medium and low-level resistance varieties. The opposite value of the indicators was found in the root tissues of a labile to diseases variety. As a result of the study, conclusions were drawn on the interdependence between the level of resistance of the *Allium cepa L.* to diseases and the content of prooxidants and antioxidants in its root tissues. *Key words:* prooxidants, antioxidants, plant resistance to diseases, *Allium cepa L.*

Постановка проблеми. В умовах погіршення екологічної ситуації внаслідок антропогенного забруднення біосфери особливо актуальною є зміна величин показників прооксидантно-антиоксидантної системи (далі – ПАС), яка характеризує всі фізіоло-

гічні та патологічні процеси рослинного організму. Розуміння механізму імунізацію рослин та ролі в ньому компонентів ПАС відкриває перспективи їх використання і модифікації для підвищення захисних сил організму, окреслює нове коло досліджень

в галузі імунології, селекції, біотехнології та генної інженерії. В умовах несприятливої екологічної ситуації актуальним залишається кількісний вміст низькомолекулярних антиоксидантів та продуктів вільнорадикального перекисного окислення (далі – ВРПО), які надходять до нашого організму з продуктами харчування рослинного походження. Дослідження ролі активних форм Оксигену (далі – АФО) у протиінфекційному захисті тварин, процесах окисного вибуху, механізмах старіння та апоптозу відкрило перспективи пошуку аналогів у рослинному світі.

Мета дослідження – вивчити зміни показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи тканин коренів *Allium cepa L.* в залежності від їх рівня стійкості до хвороб.

Актуальність дослідження. Дослідження механізмів, що забезпечують підтримку високого імунного статусу рослин, є особливо актуальним в умовах несприятливої екологічної ситуації, що визначає створення імунного дефіциту не лише у людини та тварин, але й у рослин, та викликає необхідність вивчення компонентів і факторів стійкості та ПАС рослинних об'єктів.

Зв'язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Для досягнення поставленої мети було визначено такі завдання:

1) дослідити стан компонентів прооксидантної ланки тканин коренів *Allium cepa L.* різних за рівнем стійкості сортів до хвороб;

2) дослідити стан компонентів антиоксидантної ланки тканин коренів *Allium cepa L.* різних за рівнем стійкості сортів до хвороб;

3) встановити зв'язок між показниками стану ПАС та рівнем стійкості сорту рослин до хвороб.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Згідно робіт Apel K. та Hirt H., у нормально функціонуючій клітині є певний баланс між активацією та дезактивацією Оксигену, тому кількість його активних форм залишається на безпечному рівні, однак ушкодження рослинних тканин під дією стресових чинників, як правило, призводить до активації Оксигену, при цьому порушується баланс між утворенням та руйнуванням АФО [1]. Значення АФО у процесах ВРПО та механізми антиоксидантного захисту (далі – АОЗ) розкрито в працях Хрипача Л.В., Рєвасової Ю.А., Колупаєва Ю.Е., Костюка В.А., Бараненко В.В., Карпець Ю.В. та інших дослідників [2–9]. Загальноприйнятим є твердження, що основною мішенню АФО є клітинні мембрани, ліпіди яких зазнають ферментативного та вільнорадикального перекисного окислення, яке першочергово пошкоджує молекули поліненасичених жирних кислот [7]. Генерація АФО рослинною клітиною відбувається у відповідь на дію екологічних стресорів абіотичного походження [1–3]. В роботах Kawano T. [8], Heiser I., Elstner E. [9], Foyer C.H., Noctor G. [10] відмічено посилення загальної продукції АФО рос-

линами при вторгненні патогенів (бактерії, гриби, мікоплазми) та описані механізми реакції надчутливості. О.П. Дмитрієв та Ж.М. Кравчук відмічають значення АФО у формуванні набутої системної стійкості рослин до патогенів як сигнальних інтермедіатів активації генів ферментів, що беруть участь у синтезі антиоксидантів та фітоалексинів [11]. На сучасному етапі розробкою проблеми АФО та АОЗ рослинних організмів займається британська школа біохімії, яку очолює Dr Nicholas Smirnoff [7]. Згідно робіт О.Г. Полескої, найбільше значення для рослинної клітини має синглетний кисень, супероксиданіонрадикал, гідроген пероксид та гідроксил радикал [12]. Загалом питання про значення АФО та антиоксидантів в рослинній клітині не є однозначним та вичерпним і потребує ретельного дослідження й систематизації.

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Недослідженим є зв'язок стійкості рослин та їх адаптації до умов існування в плані зміни величин показників ПАС; роль окремих компонентів ПАС у забезпеченні стійкості рослин до хвороб, біохімічних та молекулярних механізмів цієї стійкості.

Новизна. У роботі вперше здійснено комплексний аналіз компонентів прооксидантної та антиоксидантної ланки тканин коренів *Allium cepa L.* Визначено рівень та джерела генерації супероксиданіонрадикалу, виявлено зв'язок між рівнем стійкості до хвороб різних сортів *Allium cepa L.* та значеннями показників ПАС, обґрунтовано роль окремих ланок ПАС в захисті рослин від патогенів.

Методологічне або загальнонаукове значення. На основі проведених досліджень експериментально виявлено найбільш значущі показники стану ПАС, які можуть бути використані для встановлення стійкості рослин до хвороб.

Результати, отримані при виконанні роботи, використовуються в наукових дослідженнях кафедри біології та методики її викладання та в навчальному процесі природничо-географічного факультету Центральноукраїнського державного педагогічного університету імені Володимира Винниченка при викладанні курсів «Фізіологія рослин», «Біохімія», «Екологія».

Виклад основного матеріалу. Кількісний аналіз компонентів стану ПАС тканин *Allium cepa L.* здійснювали на тканинах коренів рослин таких сортів: «Глобус» (високостійкий сорт – 9 клас стійкості), «Веселка» (середньостійкий сорт – 7 клас стійкості) та «Донецька золотиста» (малостійкий сорт – 5 клас стійкості). Кожна дослідна група включала 10 проб.

Методи дослідження. Визначення біохімічних показників здійснювали згідно загальноприйнятих методик: концентрацію $\bullet\text{O}_2$ (нмоль $\bullet\text{O}_2$ /гс) досліджували спектрофотометричним НСТ-тестом [13], концентрацію малонового діальдегіду (далі – МДА) (мкмоль/кг) визначали за реакцією

з 2-тіобарбітуровою кислотою в кислому середовищі, активність супероксиддисмутази (далі – СОД) (ОД активності) визначали кінетично за швидкістю 50 %-го інгібування аутоокиснення адреналіну, активність каталази (мкмоль/г·хв) – методом О.М. Баха та С.М. Зубкової, активність GSH-пероксидази (ОД активності) – реактивом Елмана, концентрацію аскорбінової кислоти (далі – АК) (ммоль/кг) – титруванням за Тільмансом, концентрацію GSH (ммоль/кг) – за допомогою реактиву Елмана, активність цитохромоксидази (ОД активності, індофенольна одиниця за хв. на г тканини) – за методом W. Straus [14].

Результати дослідження і значення показників стану ПАС тканин коренів *Allium cepa L.* наведені в таблиці 1.

Так, спектрофотометрично визначений фоновий рівень утворення $\bullet\text{O}_2^-$ цибулі сорту «Глобус» переважає рівень «Донецької золотистої» і «Веселки» у 1,31 і 1,17 рази відповідно ($p_{1,2,3} < 0,05$).

Стимульований НАДФ·Н НСТ-тест виявив зростання показника концентрації $\bullet\text{O}_2^-$ в порівнянні з фоном на 230,55 %, 233,10 % та 147,61 % в тканинах рослин сорту «Глобус», «Веселка» та «Донецька золотиста». Отже, найвищий рівень генерації $\bullet\text{O}_2^-$ мають тканини коренів цибулі сорту «Глобус», що в 1,16 рази ($p_{1,2} < 0,05$) переважає рівень «Веселки» та в 1,75 рази ($p_{1,3} < 0,05$) – «Донецької золотистої». В результаті порівняння вмісту $\bullet\text{O}_2^-$ у «Веселки»

і «Донецької золотистої» виявлено переважання середньостійкого сорту над малостійким в 1,50 рази ($p_{2,3} < 0,05$).

Стимуляція НАДФ·Н призводить до зростання рівня $\bullet\text{O}_2^-$ в порівнянні з фоном на 423,64 % для тканин коренів цибулі сорту «Глобус» та на 472,25 % та 514,01 % для сорту «Веселка» та «Донецька золотиста» відповідно. Таким чином, міжсортове співвідношення показників стимульованого НАДФ·Н рівня генерації $\bullet\text{O}_2^-$ склало 1,12 : 1,04 : 1,00 відповідно до порядку згадування сортів ($p_{1,2} < 0,02$, $p_{1,3} < 0,001$, $p_{2,3} < 0,25$).

Стимуляція дріжджами викликає підвищення рівня утворення $\bullet\text{O}_2^-$ на 14,74 %, 14,89 % та 14,69 % в тканинах рослин сорту «Глобус», «Веселка» та «Донецька золотиста» відповідно. Розподіл міжсортового співвідношення показників склав 1,31 : 1,12 : 1,00 ($p_{1,2} < 0,5$, $p_{1,3} < 0,5$, $p_{2,3} < 1$).

Стимуляція NaF посилює генерацію $\bullet\text{O}_2^-$ в тканинах коренів цибулі високо-, середньо-, та малостійкого до хвороб сорту на 17,07 %, 13,20 % та 21,80 % відповідно, змінюючи таким чином показник міжсортового порівняння: 1,26 : 1,04 : 1,00. Дослідження рівня МДА виявило найвищу його концентрацію в тканинах коренів цибулі сорту «Донецька золотиста», що в порівнянні з «Веселкою» та «Глобусом» має переважання в 1,52 і 2,91 рази ($p_{1,2} < 0,001$) для фонового рівня та в 2,74 і 5,34 рази для стимульованого ($p_{1,2} < 0,001$). Міжсортове порівняння

Таблиця 1

Порівняння показників стану компонентів ПАС коренів *Allium cepa L.* різних сортів за рівнем стійкості до хвороб

№	Показники стану ПАС	Сорти рослин		
		«Глобус»	«Веселка»	«Донецька»
1.	НСТ тест (фоновий рівень), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	5,34 ± 0,01*	4,56 ± 0,37	4,08 ± 0,01***
2.	НСТ тест (стимуляція НАДФ·Н), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	17,65 ± 0,38	15,19 ± 1,09**	10,11 ± 0,27***
3.	НСТ тест (стимуляція НАДФ·Н), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	27,96 ± 0,29	26,10 ± 0,64	25,07 ± 0,54
4.	НСТ тест (стимуляція дріжджами), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	6,13 ± 0,74	5,24 ± 0,44	4,68 ± 0,82
5.	НСТ тест (стимуляція NaF), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	6,25 ± 0,77	5,16 ± 0,88	4,97 ± 0,36
6.	МДА ₀ , мкмоль/кг	17,53 ± 1,30*	36,02 ± 0,79**	54,76 ± 4,07***
7.	МДА _{1,5} , мкмоль/кг	14,42 ± 0,48*	28,25 ± 0,01**	77,41 ± 11,33***
8.	Δ МДА, %	23,24 ± 5,28	29,24 ± 3,76	44,94 ± 16,75
9.	Аскорбінат, ммоль/кг	0,14 ± 0,01*	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01***
10.	GSH, ммоль/кг	38,51 ± 0,28	38,65 ± 0,33	38,78 ± 0,39
11.	Каталаза, мкмоль/г·хв	0,99 ± 0,04	1,08 ± 0,04**	0,89 ± 0,04
12.	СОД, ОД	0,47 ± 0,02*	0,36 ± 0,02**	0,21 ± 0,01***
13.	GSH-пероксидаза, ОД	1,94 ± 0,02*	2,03 ± 0,02**	2,11 ± 0,01***
14.	Цитохромоксидаза, ОД	0,453 ± 0,006*	0,333 ± 0,01**	0,282 ± 0,007***

Примітки: * – $p_{1,2} < 0,05$ при порівнянні значень показників сорту «Глобус» і «Веселка»; ** – $p_{2,3} < 0,05$ при порівнянні значень показників сорту «Веселка» і «Донецька золотиста»; *** – $p_{1,3} < 0,05$ при порівнянні значень показників сорту «Донецька золотиста» і «Глобус»

середньо- і високостійкого до хвороб сорту характеризується перевагою в 2,02 рази для МДА₀ ($p_{1,2} < 0,001$) та в 1,95 рази для МДА_{1,5} ($p_{1,2} < 0,001$) по відношенню до сорту «Глобус». Таким чином, маємо наступне співвідношення показників для Δ МДА – 1,03 : 1,00 : 1,55 ($p_{1,3} < 0,05$, $p_{2,3} < 0,05$) відповідно до порядку сортів «Глобус», «Веселка» та «Донецька золотиста».

Біохімічний аналіз низькомолекулярних АО виявив найвищий рівень АК в тканинах коренів цибулі сорту «Глобус», що підтверджується переважанням її концентрації в 1,27 і 1,56 рази ($p_{1,2} < 0,05$, $p_{1,3} < 0,05$) в порівнянні з сортом «Веселка» та «Донецька золотиста», міжсортова різниця середньо- і мало-стійкого сорту склала 1,22 рази ($p_{1,2} < 0,05$).

Результати визначення активності основних ферментних АО свідчать, що співвідношення активності каталази тканин коренів цибулі сорту «Глобус», «Веселка» та «Донецька золотиста» складає 0,92 : 1,00 : 0,82 ($p_{1,2,3} < 0,05$), активності СОД 1,31 : 1,00 : 0,58 ($p_{1,2,3} < 0,05$), активності GSH-пероксидази – 0,96 : 1,00 : 1,04 ($p_{1,2,3} < 0,05$) відповідно.

Виявлено, що цитохромоксидаза проявляє найбільшу активність у тканинах коренів цибулі сорту «Глобус». Досліджуваний фермент в 1,36 рази більш активний, ніж у цибулі сорту «Веселка» та в 1,61 – ніж у «Донецької золотистої» ($p_{1,2} < 0,001$, $p_{1,3} < 0,05$). Значення активності цитохромоксидази коренів

цибулі сорту «Веселка» і «Донецька золотиста» відносяться як 1,18 : 1 ($p_{2,3} < 0,05$).

Таким чином, біохімічний аналіз коренів цибулі ріпчастої виявив зростання рівня компонентів ПАС зі збільшенням стійкості сорту цибулі ріпчастої до хвороб.

Головні висновки. Стійкість сорту до хвороб залежить від таких показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи рослин: рівня генерації $\bullet O_2^-$, вмісту малонового діальдегіду, аскорбінової кислоти, глутатіону, активності супероксидази, глутатіонпероксидази, цитохромоксидази.

Тканини коренів *Allium cepa* L. характеризуються посиленням обох ланок прооксидантно-антиоксидантної системи відповідно до підвищення рівня стійкості сорту до хвороб з незначним переважанням прооксидантної активності.

Перспективи використання результатів дослідження. Зміна величин показників ПАС супроводжує всі фізіологічні та патологічні процеси, тому вона є об'єктом дослідження клінічної медицини, геронтології і привертає увагу вчених до проблеми ПАС. Перспектива використання і модифікації окремих компонентів АОЗ для підвищення захисних сил організму відкриває нове коло досліджень у галузі імунології. Створення сортів посиленої стійкості та підвищеного вмісту антиоксидантів є перспективним напрямком селекції, біотехнології та генної інженерії.

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. *Вісник РАМН.* 2004. № 3. С. 16–18.
3. Колупаєв Ю.Є. 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. Минск : БГУ, 2004. 179 с.
5. Колупаєв Ю.Є. Карпєць Ю.В. Активність супероксидази та каталази у колеоптилях пшениці за дії пероксиду водню і нагрівання. *Фізіологія та біохімія культурних рослин.* 2007. Т. 39, № 4. С. 319–325.
6. Бараненко В.В. Супероксидази в клітках рослин. *Цитологія.* 2006. Т. 48. № 6. С. 465–474.
7. Smirnoff N. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. New York : 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: are evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment.* 2005. Vol. 28. P. 1056–1071.
11. Дмитрієв О.П. Кравчук Ж.М. Активні форми кисню та імунітет рослин. *Цитологія та генетика.* 2005. № 39 (4). С. 64–75.
12. Полєсская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва : КДУ, 2007. 140 с.
13. Цебринский 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. Цебринського. Полтава, 1996. 271 с.