

## ОСОБЛИВОСТІ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ПРООКСИДАНТІВ ТА АНТИОКСИДАНТІВ У ТКАНИНАХ КОРЕНЕПЛОДІВ *DAUCUS CAROTA L.*

Боброва М.С.<sup>1</sup>, Ворона С.О.<sup>2</sup>, Ульдякова Л.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Центральноукраїнський державний педагогічний університет імені Володимира Винниченка  
вул. Шевченка, 1, 25006, м. Кропивницький

<sup>2</sup>Кіровоградський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України  
вул. Вокзальна, 58, 25006, м. Кропивницький

<sup>3</sup>Донецький національний медичний університет  
вул. Велика Перспективна, 1, 25000, м. Кропивницький  
kazna4eeva@gmail.com, biolog-1@ukr.net, uldik83@i.ua

У статті розкрито роль прооксидантів та антиоксидантів у підтримці гомеостазу організму. Наголошено на значенні прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) в забезпеченні стійкості рослинного організму до впливу екологічних факторів середовища та імуностійкості. Експериментальним шляхом виявлено рівень та джерела генерації супероксиданіонрадикалу як основного прооксиданту; фонову та стимульовану концентрацію малонового діальдегіду як першочергового продукту перекисного окиснення ліпідів та 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 коренеплодів *Daucus carota L.* різних за рівнем стійкості до хвороб сортів. Експериментально встановлене посилення фонового рівня генерації супероксиду під час переходу від високостійкого до хвороб сорту «Карнавал» до малостійкого «Нантська харківська», що компенсується потужною системою антиоксидантного захисту (АОЗ), активність якої зростає в оберненому напрямку. Встановлено обернено пропорційний до ряду зменшення концентрації  $\bullet\text{O}_2^-$  ряд величин рівня генерації МДА. Виявлено, що посилення генерації активних форм оксигену (АФО) клітин високостійкого сорту не призводить до перекисної деструкції біополімерів мембран, що відображається на активності цитохромоксидази, яка є маркером інтенсивності вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО). Досліджено, що можливою причиною такого розподілу є наявність потужної системи АОЗ, що підтверджується експериментально встановленим посиленням активності СОД, GSH-пероксидази та каталази, зростанням концентрації АК. Виявлено зміни ПАС зі збільшенням терміну зберігання коренеплодів *Daucus carota L.* **Ключові слова:** прооксиданти, антиоксиданти, стійкість сорту рослин до хвороб, *Daucus carota L.*

### Features of quantitative content of prooxidants and antioxidants in root tissues *Daucus carota L.* Bobrova M., Vorona S., Uldiakova L.

The article reveals the role of prooxidants and antioxidants in maintaining homeostasis. The importance of the prooxidant-antioxidant system in ensuring the resistance of the plant organism to the influence of environmental factors and the role in immunostability is emphasized. The level and sources of superoxidation ion radical generation as the main prooxidant were experimentally identified; background and stimulated concentration of malonic dialdehyde as a primary product of lipid peroxidation and cytochrome oxidase activity as a key enzyme that is a marker of the level of membrane damage by prooxidants. The activity of the main enzymatic antioxidants was studied: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase. The level of the main low molecular weight antioxidants was revealed: ascorbic acid, glutathione. A comparative analysis of all these indicators in the tissues of the roots of *Daucus sarota L.* different in the level of resistance to disease varieties. The strengthening of the background level of superoxide generation during the transition from highly resistant to diseases of the variety “Carnival” to low-resistant “Nantes Kharkiv” has been experimentally established, which is compensated by a powerful AOS system, the activity of which increases in the opposite direction. The dependence of the concentration of  $\bullet\text{O}_2^-$  on the level of MDA generation was established. It was found that the increase in the generation of AFO cells of highly resistant varieties does not lead to peroxide destruction of membrane biopolymers, which is reflected in the activity of cytochrome oxidase, which is a marker of the intensity of FRPO. It is investigated that the possible reason for this distribution is the presence of a powerful system of AOS, which is confirmed by the experimentally established increase in the activity of SOD, GSH-peroxidase and catalase, an increase in the concentration of AK. Changes in PAS with increasing shelf life of *Daucus carota L.* roots were detected. **Key words:** prooxidants, antioxidants, plant resistance to diseases, *Daucus carota L.*

**Постановка проблеми.** Зміна впливу будь-яких факторів середовища має молекулярний прояв у формі зміни показників стану ПАС, що є особливо актуальним в умовах несприятливої екологічної ситуації. Розуміння механізму імунозахисту рослин та ролі в ньому компонентів ПАС відкриває перспективи їх використання і модифікації для підвищення захисних

сил організму. Надзвичайно актуальним є кількісний вміст антиоксидантів та продуктів ВРПО, які надходять до нашого організму з продуктами харчування рослинного походження. Дослідження ролі АФО у протинфекційному захисті тварин, процесах окисного вибуху, механізмах старіння та апоптозу відкрило перспективи пошуку аналогів у рослинному світі.

**Мета дослідження** – дослідити зміни показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи тканин коренеплодів *Daucus carota L.* залежно від їхнього 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 в людини та тварин, але й у рослин, та викликає потребу вивчення компонентів і факторів стійкості та ПАС рослинних об'єктів.

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

1. Дослідити стан компонентів прооксидантної ланки тканин коренеплодів *Daucus carota L.* різних за рівнем стійкості сортів до хвороб.

2. Дослідити стан компонентів антиоксидантної ланки тканин коренеплодів *Daucus carota L.* різних за рівнем стійкості сортів до хвороб.

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

4. Виявити зміни ПАС зі збільшенням терміну зберігання коренеплодів *Daucus carota L.*

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.**

Згідно з роботами 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, водночас порушується баланс між утворенням та руйнуванням АФО [1]. Значення АФО у процесах ВРПО та механізми АОЗ розкрито в працях Л.В. Хрипача, Ю.А. Рєвасової, Ю.Е. Колупаєва, В.А. Костюка, В.В. Бараненко, Ю.В. Карпець та інших дослідників [2–9]. Загальноприйнятим є твердження, що основною мішенню АФО є клітинні мембрани, ліпіди яких зазнають ферментативного та вільнорадикального переокиснення, яке першочергово пошкоджує молекули поліненасичених жирних кислот [7]. Генерація АФО рослинною клітиною відбувається у відповідь на дію екологічних стресорів абіотичного походження [1–3]. У роботах Т. Kawano [8], I. Heiser, E. Elstner [9], С.Н. Foyer, G. Noctor [10] зазначено посилення загальної продукції АФО рослинами під час вторгнення патогенів (бактерії, гриби, мікоплазми) та описано механізми реакції надчутливості. О.П. Дмитрієв та Ж.М. Кравчук зазначають значення АФО у формуванні набутої системної стійкості рослин до патогенів як сигнальних інтермедіатів активації генів ферментів, що беруть участь у синтезі АО та фітоалексинів [11]. На сучасному етапі розробленням проблеми АФО та АОЗ рослинних організмів займається британська школа біохімії, яку очолює Dr. Nicholas Smirnoff

[7]. Згідно з роботами О.Г. Полескої найбільше значення для рослинної клітини має синглетний кисень, супероксиданіонрадикал, гідроген пероксид та гідроксил радикал [12]. Загалом питання про значення АФО та АО в рослинній клітині не є однозначним і вичерпними та потребує ретельного дослідження й систематизації.

**Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття.** Недослідженою є роль окремих компонентів ПАС у забезпеченні стійкості рослин до патогенів, біохімічних механізмів цієї стійкості, зв'язок стійкості рослин та їх адаптації до умов існування за рахунок зміни величин показників ПАС.

**Новизна.** У роботі вперше здійснено комплексний аналіз компонентів прооксидантної та антиоксидантної ланки тканин коренеплодів *Daucus carota L.* Виявлено зв'язок між рівнем стійкості до хвороб різних сортів *Daucus carota L.* та значеннями показників ПАС, визначено рівень і джерела генерації супероксиданіонрадикалу, обґрунтовано роль окремих ланок ПАС у захисті рослин від патогенів.

**Методологічне або загальнонаукове значення.**

На основі проведених досліджень експериментально виявлено найбільш значущі показники стану ПАС, які може бути використано для встановлення стійкості рослин до хвороб.

Результати, отримані під час виконання 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 під час викладання курсів «Фізіологія рослин», «Біохімія», «Екологія».

**Виклад основного матеріалу.** Біохімічний аналіз *Daucus carota L.* здійснювався на тканинах поперечного перерізу геометричної середини коренеплоду. Використовували як щойно зібрані рослини, так і рослини з терміном зберігання 6 місяців. Кількісний аналіз компонентів стану ПАС *Daucus carota L.* здійснювали на тканинах коренеплодів рослин таких сортів: «Карнавал» (високостійкий сорт – 9-й клас стійкості), «Артек» (СС – середньостійкий сорт – 7-й клас стійкості) та «Нантська Харківська» (малостійкий сорт – 5-й клас стійкості). Кожна дослідна група містила 10 проб.

**Методи дослідження.** Визначення біохімічних показників здійснювали згідно із загальноприйнятими методиками: концентрацію  $\bullet\text{O}_2$  (нмоль $\bullet\text{O}_2$ /г $\cdot$ с) досліджували спектрофотометричним НСТ-тестом [13], концентрацію МДА (мкмоль/кг) визначали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою у кислому середовищі, активність СОД (ОД активності) визначали кінетично за швидкістю 50 %-го інгібування аутоокиснення адреналіну, активність каталази (мкмоль/г $\cdot$ хв) – методом О.М. Баха та С.М. Зубкової, активність GSH-пероксидази

(ОД активності) – реактивом Елмана, концентрацію 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 значення показників стану ПАС тканин коренеплодів *Daucus carota L.* наведено в таблиці 1.

Експериментально встановлено, що фоновий рівень генерації  $\bullet\text{O}_2^-$  в коренеплодах моркви малостійкого сорту «Нантська харківська» в 2,57 раза вищий, ніж у високостійкого сорту «Карнавал» ( $p_{1,3} < 0,05$ ), та в 1,22 раза вищий, ніж у середньостійкого сорту «Артек» ( $p_{2,3} < 0,05$ ).

Порівняння результатів НСТ-тесту середньо- і високостійкого сорту показало, що фоновий рівень  $\bullet\text{O}_2^-$  тканин коренеплоду моркви сорту «Артек» переважає аналогічний показник «Карнавал» в 2,11 раза ( $p_{1,2} < 0,05$ ). Стимуляція дріжджами посилює генерацію  $\bullet\text{O}_2^-$  в коренеплодах моркви сорту «Нантська харківська» на 62,44 %, змінюючи так міжсортове співвідношення: 1 : 2,03 : 3,89 ( $p_{1,2,3} < 0,05$ ). Стимуляція NaF не збільшує рівень генерації  $\bullet\text{O}_2^-$  в тканинах коренеплодів моркви всіх дослідних сортів.

Виявлено найвищу концентрацію МДА<sub>0</sub> в тканинах коренеплодів моркви високостійкого до хвороб сорту «Карнавал», що порівняно з «Нантською харківською» має переважання на 16,07 % ( $p_{1,3} < 0,05$ ). Рівень

МДА<sub>0</sub> моркви сорту «Артек» є на 15,99 % вищий порівняно з «Нантською харківською» ( $p_{1,3} < 0,05$ ).

Експериментально встановлена найвища концентрація низькомолекулярних АО в тканинах коренеплодів моркви сорту «Карнавал», про що свідчить перевага концентрації АК в 1,52 ( $p_{1,2} < 0,05$ ) і 2,10 раза ( $p_{1,3} < 0,05$ ) порівняно із сортом «Артек» та «Нантська харківська». Міжсортова різниця середньо- і малостійкого сорту становила 1,38 раза ( $p_{2,3} < 0,05$ ). Достовірну міжсортову різницю вмісту GSH в коренеплодах моркви не виявлено.

Результати визначення активності основних ферментних АО свідчать, що співвідношення показників активності каталази тканин коренеплодів моркви сорту «Карнавал», «Артек» та «Нантська харківська» становить 1,43 : 1 : 0,71 ( $p_{1,2,3} < 0,05$ ), активності СОД 1,52 : 1 : 0,34 ( $p_{1,2,3} < 0,05$ ), активності GSH-пероксидази – 0,96 : 1 : 1,03 ( $p_{1,2} < 0,05$ ,  $p_{1,3} < 0,05$ ) відповідно.

Встановлено, що цитохромоксидаза виявляє найбільшу активність у тканинах коренеплодів моркви сорту «Карнавал», що в 1,39 раза перевищує аналогічний активність сорту «Артек» ( $p_{1,2} < 0,05$ ) та в 1,71 раза сорту «Нантська харківська» ( $p_{1,3} < 0,05$ ). Значення активності цитохромоксидази коренеплодів моркви сорту «Артек» і «Нантська харківська» співвідносяться як 1,23 : 1 ( $p_{2,3} < 0,05$ ).

Результати проведеного аналізу свідчать, що морква сорту «Нантська харківська» зі збільшенням тер-

Таблиця 1

**Порівняння показників стану компонентів ПАС коренеплодів *Daucus carota L.* різних сортів за рівнем стійкості до хвороб**

№	Показники стану ПАС	Сорти рослин			
		«Карнавал»	«Артек»	«Нантська харківська»	«Нантська харківська» (6 місяців зберігання)
1	НСТ тест (фоновий рівень), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /Г·с	0,083 ± 0,004*	0,175 ± 0,008**	0,213 ± 0,002***	0,089 ± 0,005****
2	НСТ тест (стимуляція дріжджами), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /Г·с	0,089 ± 0,002*	0,181 ± 0,003**	0,346 ± 0,003***	0,091 ± 0,004****
3	НСТ тест (стимуляція NaF), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /Г·с	0,088 ± 0,005*	0,184 ± 0,009	0,219 ± 0,019***	0,089 ± 0,005****
4	МДА <sub>0</sub> , мкмоль/кг	41,46 ± 1,99	41,64 ± 1,99**	35,72±0,66***	61,9±1,63****
5	МДА <sub>1,5</sub> , мкмоль/кг	23,03 ± 0,77*	23,03 ± 0,77	22,86±0,75***	95,39±8,25****
6	Δ МДА, %	48,68 ± 3,67 *	48,68 ± 3,67	41,65 ± 3,55 ***	66,11 ± 10,12****
7	Аскорбінат, ммоль/кг	0,44 ± 0,02*	0,29 ± 0,01**	0,21 ± 0,01***	0,02±0,005****
8	GSH, ммоль/кг	41,91 ± 0,09	41,98 ± 0,28	40,49 ± 0,36	38,86 ± 0,77
9	Каталаза, мкмоль/Г·хв	1,34 ± 0,05*	0,94 ± 0,02**	0,67 ± 0,04***	0,54±0,02****
10	СОД, ОД	1,25 ± 0,05*	0,82 ± 0,03**	0,28 ± 0,01	0,21±0,01****
11	GSH-пероксидаза, ОД	1,88 ± 0,01*	1,95 ± 0,02	2,01 ± 0,03***	0,95±0,02****
12	Цитохромоксидаза, ОД	0,900 ± 0,002*	0,648 ± 0,01**	0,525 ± 0,006***	0,435±0,015****

Примітки: \* –  $p_{1,2} < 0,05$  під час порівняння значень показників сорту «Карнавал» і «Артек»; \*\* –  $p_{2,3} < 0,05$  під час порівняння сортів «Артек» і «Нантська харківська»; \*\*\* –  $p_{1,3} < 0,05$  під час порівняння сортів «Нантська харківська» і «Карнавал»; \*\*\*\* –  $p_{3,4} < 0,05$  під час порівняння значень показників щойно зібраних рослин сорту «Нантська харківська» з рослинами, які мали термін зберігання 6 місяців

міну зберігання до 6-ти місяців має на 58,2 % нижчий фоновий рівень генерації  $\bullet\text{O}_2^-$ , порівняно зі щойно зібраними рослинами аналогічного сорту ( $p_{3,4} < 0,05$ ). Зменшення вмісту  $\bullet\text{O}_2^-$  становить 73,69 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ) під час стимуляції дріжджами та 59,36 % під час дії NaF ( $p_{3,4} < 0,05$ ). Встановлено також, що рослини зі збільшеним терміном зберігання не здатні до підвищення рівня  $\bullet\text{O}_2^-$  під час дії жодного стимулятора.

Зафіксовано, що порівняно зі щойно зібраними рослинами морква зі збільшеним терміном зберігання характеризується посиленням фонового рівня МДА на 73,29 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ), стимульованого – на 317,28 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ).

Під час збільшення терміну зберігання до 6-ти місяців концентрація АК в коренеплоді моркви зменшується в 11 разів ( $p_{3,4} < 0,05$ ), GSH – в 1,1 раза ( $p_{3,4} > 0,05$ ). Зміна активності ферментних АО також характеризується зменшенням значення їхніх показників. Наприклад, зниження активності каталази становило 19,40 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ), СОД – 25 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ), GSH-пероксидази – 7,96 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ).

Встановлено зниження активності цитохромоксидази на 17,14 % ( $p_{3,4} < 0,05$ ) зі збільшенням терміну зберігання моркви сорту «Нантська харківська» – до 6 місяців.

Отже, у результаті проведеного біохімічного аналізу тканин поперечного перерізу коренеплодів моркви виявлено закономірність, за якої значення більшості досліджуваних показників стану ПАС зростають зі збільшенням стійкості сорту до хвороб.

Збільшення терміну зберігання коренеплодів знижує активність як прооксидантної, так і антиоксидантної ланки ПАС в коренеплодах моркви.

**Головні висновки.** 1) Стійкість сорту до хвороб залежить від таких показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи рослин: рівня генерації  $\bullet\text{O}_2^-$ , вмісту малонового діальдегіду, аскорбінової кислоти, глутатіону, активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, цитохромоксидази. 2) Тканини коренеплоду моркви як вегетативного нефотосинтезуючого органу характеризуються незначною перевагою антиоксидантної ланки. Величини показників стану прооксидантно-антиоксидантної системи коренеплоду моркви зменшуються зі зниженням стійкості сорту до хвороб. 3) Збільшення терміну зберігання коренеплодів моркви до 6 місяців знижує активність антиоксидантного захисту в 3,25 раза та посилює перекисне окиснення біополімерів в 2,95 раза.

**Перспективи використання результатів дослідження.** Перспектива використання й модифікації окремих компонентів АОЗ для підвищення захисних сил організму відкриває нове коло досліджень у галузі імунології. Зміна величин показників ПАС супроводжує всі фізіологічні та патологічні процеси, тому є об'єктом дослідження клінічної медицини, геронтології та привертає увагу вчених до проблеми ПАС. Створення сортів посиленої стійкості та підвищеного вмісту антиоксидантів є перспективним напрямом 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.Е. Активні форми кисню 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. Карпець Ю.В. Активність супероксиддисмутази і каталази у колеоптилях пшениці за дії перексиду водню і нагрівання. *Фізіологія і біохімія культ. рослин.* 2007. Т. 39. № 4. С. 319–325.
6. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза 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: a re 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 і 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 у біології та медицині / за ред. І.П. Кайдашева, О.В. Катрушова, В.М. Соколенко, О.І. Цебринського. Полтава, 1996. 271 с.