
ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО ТА ЛАНДШАФТНОГО РІЗНОМАНІТТЯ

УДК 577.151.6:582.573.16

DOI <https://doi.org/10.32846/2306-9716/2021.eco.7-34.30>

ЗМІНА ПРООКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦІАЛУ У ТКАНИНАХ *HELIANTHUS ANNUUS L.* ПРИ ІНІЦІАЦІЇ ПРОРОСТАННЯ НАСІННЯ

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

²Донецький національний медичний університет
вул. Велика Перспективна, 1, 25000, м. Кропивницький

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 досліджено біохімічні зміни у тканинах насіння *Helianthus annuus L.* Розкрито роль прооксидантів та антиоксидантів у підтримці гомеостазу тканин насіння у стані спокою та при ініціації процесів проростання. Наголошено на значенні прооксидантно-антиоксидантної системи у забезпеченні стійкості рослинного організму до впливу екологічних факторів середовища та імуностійкості. Експериментальним шляхом досліджено рівень і джерела генерації супероксиданіонрадикалу як основного прооксиданту у тканинах насіння *Helianthus annuus L.* у стані спокою та при ініціації процесів проростання. Виявлено роль супероксиданіонрадикалу й окремих клітинних структур, що його генерують у біохімічних змінах, які супроводжують процеси проростання насіння. Встановлено, що ініціація процесу проростання насіння супроводжується посиленою генерацією $\bullet\text{O}_2^-$ у тканинах *Helianthus annuus L.* як при стимуляції за допомогою НАД·Н, так і при дії НАДФ·Н, NaF і дріжджів. Доведено, що найбільший внесок у збільшення концентрації $\bullet\text{O}_2^-$ при запуску процесів проростання насіння здійснюють мітохондрії та мікросоми, оскільки найбільший приріст $\bullet\text{O}_2^-$ експериментально спостерігався за стимуляції тканин розчином НАД·Н та НАДФ·Н. Обґрунтовано месенджерну роль $\bullet\text{O}_2^-$ і H_2O_2 у супероксидсинтазній сигнальній системі та значення в активації факторів регуляції транскрипції та експресії захисних генів. Досліджено, що Ca^{2+} -месенджерна система й окисний вибух відіграють практично рівноцінну роль у проростанні насіння *Helianthus annuus L.* Експериментально підтверджено значення окисного вибуху в імунозахисті активованого до проростання насіння при контакті його тканин із мікрофлорою ґрунту. У статті наголошено на тому, що вивчення зміни стану компонентів прооксидантно-антиоксидантної системи, які ініціюють процес проростання насіння, відкриває перспективу можливості регулювання та корекції цього етапу рослинного онтогенезу, підвищення схожості та дружності посівів, що має позитивні економічні наслідки для сільського господарства й агрономії.
Ключові слова: прооксиданти, антиоксиданти, активні форми Оксигену, супероксиданіонрадикал, *Helianthus annuus L.*

Change of prooxidant potential in tissues of *Helianthus annuus L.* at initiation of seed germination. Bobrova M., Holodaieva O., Vorona S.

The article examines the biochemical changes in the tissues of seeds of *Helianthus annuus L.* The role of prooxidants and antioxidants in maintaining the homeostasis of seed tissues at rest, and in the initiation of germination processes. Emphasis is placed on the importance of the prooxidant-antioxidant system in ensuring the resistance of the plant organism to the influence of environmental factors and immunity. The level and sources of superoxid ion radical generation as the main prooxidant in the tissues of *Helianthus annuus L.* seeds at rest and at the initiation of germination processes were experimentally investigated. The role of superoxid ion radical and individual cellular structures that generate it in the biochemical changes that accompany seed germination processes has been revealed. It was found that the initiation of the seed germination process is accompanied by enhanced generation of $\bullet\text{O}_2^-$ in the tissues of *Helianthus annuus L.* both when stimulated with NAD·H and under the action of NADP·H, NaF and yeast. It is proved that mitochondria and microsomes make the greatest contribution to the increase of $\bullet\text{O}_2^-$ concentration at the start of seed germination processes, as the largest increase in $\bullet\text{O}_2^-$ was experimentally observed during tissue stimulation with NAD·H and NADP·H solution. The messenger role of $\bullet\text{O}_2^-$ and H_2O_2 in the superoxide synthase signaling system and the importance in the activation of factors regulating the transcription and expression of protective genes are substantiated. It was studied that the Ca^{2+} messenger system and the oxidative explosion play an almost equivalent role in the germination of seeds of *Helianthus annuus L.* The value of oxidative explosion in immunoprotection of seeds activated before germination at contact of its tissues with soil microflora is experimentally confirmed. The article emphasizes that the study of changes in the components of the prooxidant-antioxidant system that initiate the process of seed germination opens the possibility of regulating and correcting this stage of plant ontogenesis, increasing crop germination, which in turn has positive economic consequences for agriculture and agronomy. **Key words:** prooxidants, antioxidants, reactive oxygen species, superoxid ion radical, *Helianthus annuus L.*

Постановка проблеми. Індукцію, підтримання й вихід насіння зі стану спокою контролюють складні фізіолого-біохімічні механізми, на які впливає широкий спектр ендогенних та екзогенних чинників. Вивчення зміни стану компонентів прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС), що ініціюють процес проростання насіння, відкриває перспективу можливості регулювання та корекції цього етапу рослинного онтогенезу, підвищення схожості та дружності посівів, є особливо актуальним та економічно виправданим за умов інтенсифікації рослинництва.

Мета дослідження – дослідити зміну рівня та джерел генерації супероксиданіонрадикалу у тканинах насіння *Helianthus annuus L.* у стані спокою та при ініціації процесів його проростання.

Актуальність дослідження. Ініціація процесу проростання насіння зумовлює зміну всіх біохімічних показників клітини. Дослідження механізмів і шляхів цих змін дає змогу контролювати та регулювати процеси проростання, використовувати їх у бажаному напрямку та свідчить про необхідність чіткого розмежування сухої гомогенізації та попереднього замочування насіння під час проведення біохімічного аналізу його компонентів.

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

Дослідити рівень і джерела генерації супероксиданіонрадикалу у тканинах насіння *Helianthus annuus L.* у стані спокою.

Дослідити рівень і джерела генерації супероксиданіонрадикалу у тканинах насіння *Helianthus annuus L.* при ініціації процесів проростання.

Виявити роль супероксиданіонрадикалу й окремих клітинних структур, що його генерують у біохімічних змінах, які супроводжують процеси проростання насіння *Helianthus annuus L.*

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Згідно з роботами К. Арел та Н. Нірт супероксиданіонрадикал, або супероксид ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{O}:\text{O}^-$), утворюється внаслідок приєднання електрону до молекулярного кисню у триплетному стані [1]. На думку М.Д. Brand, С. Affourtit та Т.С. Esteves неферментативне утворення в рослинній клітині пов'язане з редокс-реакціями фенолів, хінонів, флавінів, автоокисненням гем- і SH-вмісних сполук, функціонування ЕТЛ мембранних структур рослинної клітини [2]. Відповідно до праць С.Н. Foyer і G. Noctor у мітохондріях супероксид генерується при редокс-перетворенні убіхінону та при ціанідрезистентному диханні. У хлоропластах утворюється за участю ферредоксину у фотосистемі I, при фотолізі води у фотосистемі II та рибулозо-1,5-діфосфаткарбоксилазою/оксигеназою в циклі фіксації Карбону [3]. Згідно з роботами О.Г. Полескої в ендоплазматичному ретикулумі генерація супероксиду пов'язана з метаболізмом ксенобіотиків і зумовлена цитохромом P-450, а також

НАДФН за участю цитохром *c* редуктази. У плазматичних мембранах утворюється внаслідок окиснення відновлених піридиннуклеотидів (НАДН), у пероксисомах – завдяки діяльності ксантиноксидази, в цитозолі й апопласті – за участі пероксидаз і наявності кофакторів процесу – саліцилової кислоти, моноамінів і хітоолігосахаридів [4]. На думку деяких учених, супероксид ініціює та продовжує ланцюг ВРПО біополімерів, пошкоджує білки, що містять Fe-S-кластери (аконітазу, НАДФ \bullet H $^+$, сукцинатдегідрогеназу), окислює хінони та комплекси Fe $^{3+}$ та Cu $^{2+}$, інактивуючи металовмісні ферменти, модифікує в'язкість мембран, здійснює одноланцюгові розриви ДНК, індукує апоптоз, є основним джерелом інших активних форм Оксигену (АФО) [5–8]. Знешкоджують супероксиданіонрадикал ($\bullet\text{O}_2^-$) супероксиддисмутази (СОД), аскорбінової кислоти (АК), відновлений глутатіон, біофлавоноїди та токоферол [7–9]. На сучасному етапі розробкою проблеми АФО рослинних організмів займається британська школа біохімії, яку очолює Dr Nicholas Smirnoff [9].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Недослідженою є роль $\bullet\text{O}_2^-$ у забезпеченні процесів проростання насіння та захисту меристеми від руйнівної дії АФО.

Новизна. У роботі вперше здійснено аналіз рівня та джерел генерації $\bullet\text{O}_2^-$ тканин насіння *Helianthus annuus L.* у стані спокою та при ініціації процесів проростання. Обґрунтовано необхідність розмежувати суху гомогенізацію та попереднє добове замочування насіння у разі використання різних методик його біохімічного аналізу.

Методологічне або загальнонаукове значення. На основі проведених досліджень експериментально виявлено зміни біохімічного складу насіння, які слід враховувати у роботі з методиками аналізу насіння, що вимагають попереднього його замочування під час проведення пробопідготовки.

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

Виклад основного матеріалу. Кількісне визначення вмісту $\bullet\text{O}_2^-$ здійснювалося у тканинах насіння *Helianthus annuus L.* Аналіз насіння відбувався на об'єктах, які перебували у стані спокою. Паралельно досліджували насіння при ініціації проростання, що здійснювалося попереднім 12-годинним його замочуванням у чистій відстояній воді. Кожна дослідна група включала 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. В основі методу лежать розробки О.І. Цебржинського [10]. За методом жовтий дигідрохлорид нітросинього тетразолію (НСТ) перетворюється на синій диформазан. $\bullet\text{O}_2^-$ може відновлюватися (приєднуючи електрон) до гідроген пероксиду й окиснюватися (віддаючи електрон) до молекулярного кисню. При редокспотенціалі $-0,1$ у НСТ є окисником, який відновлюється до диформазану: $\text{HCT} + 2\bullet\text{O}_2^- + 4\text{H}^+ = \text{Диформазан} + 2\text{HCl} + 2\text{O}_2$. Максимум поглинання диформазану у хлороформі знаходиться при $\lambda = 540$ нм. Специфічність реакції пов'язана з успішною конкуренцією за атоми Гідрогену з боку цитохромоксидази та цитохрому Р-450 і NO-синтази за відсутності субстратів дегідрогеназ і за доступу кисню.

Для проведення аналізу 0,1 г тканини гомогенізували зі скляним піском у 0,9 см³ фосфатного буфера (рН=7,4, склад на 1 дм³ розчину – 5,37 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 8,5 г NaCl , 1,5 г NaOH). Відбирали по 0,05 см³ гомогенату в 3 пробірки: в I додавали 0,05 см³ буферного розчину (для визначення загальної фонові нестимульованої активності); у II додавали 0,05 см³ розчину NaF ($w = 0,01\%$, стимуляція Ca^{2+} -месенджерної системи); у III – 0,05 см³ розчину дріжджів ($w = 1\%$, стимуляція окисного вибуху), у IV – 0,05 см³ розчину НАДН ($w = 3\%$, стимуляція мітохондріальної генерації), у V – 0,05 см³ розчину НАДФН ($w = 3\%$, стимуляція мікросомальної генерації). Проби струшували протягом 2 хв, додавали до кожної по 0,05 см³ НСТ, перемішували, інкубували в термостаті при 24°C. Через 30 хв (для пробірок I–III) та через 10 хв (для пробірок IV–V) додавали 2 см³ розчинника (диметилсульфоксид-хлороформ в об'ємному співвідношенні 2:1) струшували 1 хв та центрифугували 5 хв при 1500 об/хв. З одержаного центрифугату відбирали забарвлений надосадковий розчин, який фотометрували проти відповідного контролю при 540 нм на мікрофотоелектроколориметрі в кюветі на 1 см³, товщиною 0,5 см.

Для приготування контролю на реактиви у трьох пробірках зливали такі розчини: 0,05 см³ буфера, 0,05 см³ води та 0,05 см³ НСТ. Додають: у I – 0,05 см³ води; у II – 0,05 см³ розчину NaF ($w = 0,01\%$);

у III – 0,05 см³ розчину дріжджів ($w = 1\%$), у IV – 0,05 см³ розчину НАДН ($w = 3\%$), у V – 0,05 см³ розчину НАДФН ($w = 3\%$) інкубували (30 хв – для пробірок I–III, 10 хв – для пробірок IV–V) у термостаті при 24°C та елюювали забарвлення.

Для побудови стандартного калібрувального графіка у пробірки набирали 0,01, 0,02, 0,05, 0,07, 0,1, 0,2 см³ НСТ ($w = 0,2\%$), 0,1 см³ KOH ($\text{C}(\text{KOH}) = 1$ моль/дм³) та 0,1 см³ розчину АК (18 мг/10 см³), перемішували та інкубували 10 хв при 24°C. Елюювали забарвлення 2 см³ розчинника, визначали екстинцію (E) кожної проби та будували калібрувальний графік. За графіком знаходили продукцію супероксиду в нмоль на пробу (n нмоль $\bullet\text{O}_2^-$), та переводили в нмоль на г тканини за секунду інкубації.

Результати визначення прооксидантної активності насіння *Helianthus annuus L.* у стані спокою та при активації проростання наведені в табл. 1.

Аналіз одержаних результатів виявив посилену генерацію супероксиду у тканинах *Helianthus annuus L.* у всіх варіаціях експериментів із дослідною групою ініціаційованого до проростання насіння, що підтверджує участь АФО у запуску процесів проростання. Так, наприклад, значення показника фонові рівня $\bullet\text{O}_2^-$ зросло у 2,16 рази. Виявлене зростання рівня $\bullet\text{O}_2^-$ спостерігається як при стимуляції за допомогою НАД·Н, так і при дії НАДФ·Н, NaF та дріжджів. Результати аналізу свідчать, що найбільший приріст $\bullet\text{O}_2^-$ в межах однієї дослідної групи (у 6,54 та 7,73 рази для насіння у стані спокою та в 3,25 та 4,03 рази для активованого проростання насіння) спостерігається при стимуляції розчином НАД·Н та НАДФ·Н відповідно, а це означає, що найбільший внесок у збільшення концентрації $\bullet\text{O}_2^-$ при запуску процесів проростання насіння здійснюють мітохондрії та мікросоми. Привертає увагу той факт, що різниця між дослідними групами незначна. Передбачається, що $\bullet\text{O}_2^-$ і H_2O_2 є вторинними месенджерами у супероксидсинтазній сигнальній системі. У супероксидсинтазній сигнальній системі при окисленні молекулярним киснем НАДФН, який локалізований у цитоплазматичній мембрані, утворюється $\bullet\text{O}_2^-$, який внаслідок

Таблиця 1

Порівняння показників стану компонентів ПАС тканин насіння *Helianthus annuus L.*

№	Показники прооксидантної активності	Насіння у стані спокою	Насіння при ініціації проростання	p
1.	НСТ тест (фоновий рівень), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	11,34 ± 0,42	24,44 ± 0,30	< 0,05
2.	НСТ тест (стимуляція НАД·Н), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	74,23 ± 0,95	79,35 ± 1,03	< 0,05
3.	НСТ тест (стимуляція НАДФ·Н), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	87,62 ± 0,46	98,59 ± 1,12	< 0,05
4.	НСТ тест (стимуляція дріжджами), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	49,92 ± 1,49	70,29 ± 1,95	< 0,05
5.	НСТ тест (стимуляція NaF), нмоль $\bullet\text{O}_2^-$ /г·с	52,23 ± 2,58	61,17 ± 1,09	< 0,05

реакції, що каталізується СОД, перетворюється на H_2O_2 . H_2O_2 викликає активацію факторів регуляції транскрипції й експресію захисних генів.

Порівнюючи зростання рівня $\bullet O_2^-$ під дією NaF і дріжджів, ми виявили, що стимуляція дріжджами посилює генерацію $\bullet O_2^-$ у 4,40 разів, NaF – у 4,61 для насіння, яке перебуває у стані спокою, й у 2,88 і 2,50 рази для насіння, активоване до проростання. Оскільки різниця між значеннями показників цих двох стимуляторів у межах кожної дослідної групи є незначною, можна припустити, що Ca^{2+} -месенджерна система й окисний вибух відіграють практично рівноцінну роль у проростанні насіння. Так, наприклад, зміна концентрації внутрішньоклітинного вільного Ca^{2+} є сигналом для активації ферментів, синтезу фітогормонів, які регулюють метаболізм, адгезію і клітинний ріст. Окиснювальний вибух, викликаний дією чужорідних частинок ґрунту та води, викликає окиснення ліпідів, продукти якого також здатні виступати в ролі вторинних месенджерів – індукторів експресії генів PR-білків. АФО, що виникають у ході окиснювального вибуху, є не тільки безпосередньою причиною реакції надчутливості, але й індуктором генів, що включають наступні захисні реакції у клітинах рослин, наприклад, стан SAR. Є припущення, що зміни балансу ПАС впливають на імуностійкість рослин, і це підтверджується результатами експерименту у вигляді незначного переважання зростання рівня супероксиду при стимуляції дріжджами, порівняно з NaF, у дослідній групі з активованим насінням, оскільки активація насіння супроводжується порушенням цілісності насінневих оболонок і контактом тканин із мікрофлорою ґрунту. Слід також додати, що найперші стадії реакції надчутливо-

сті активуються фосфоліпазою С, яка входить до складу Ca^{2+} -сигнальної системи. Так, при контакті із чужорідними для рослинної клітини частинками концентрація Ca^{2+} у цитоплазмі зростає, що активує розчинні та мембранозв'язані Ca^{2+} -залежні протеїнкінази, які беруть участь у фосфорилуванні білкових факторів регуляції експресії захисних генів.

Отже, індукцію, підтримання та вихід насіння зі стану спокою контролюють складні фізіолого-біохімічні механізми, на які впливає широкий спектр ендогенних та екзогенних чинників. Роль АФО у рецепторній і захисній функціях мембран новоутворених клітин є одним із ключових екзогенних факторів, тоді як участь у месенджерних системах, біохімічних циклах регуляції ростових процесів є реалізацією ендогенних чинників.

Головні висновки: 1) Ініціація процесу проростання насіння супроводжується посиленою генерацією $\bullet O_2^-$ у тканинах *Helianthus annuus L.* як при стимуляції за допомогою НАД·Н, так і при дії НАДФ·Н, NaF та дріжджів. 2) Найбільший внесок у збільшення концентрації $\bullet O_2^-$ при запуску процесів проростання насіння здійснюють мітохондрії та мікосоми, оскільки найбільший приріст $\bullet O_2^-$ спостерігається при стимуляції тканин розчином НАД·Н та НАДФ·Н. 3) Ca^{2+} -месенджерна система й окисний вибух відіграють практично рівноцінну роль у проростанні насіння.

Перспективи використання результатів дослідження. Вивчення зміни стану компонентів ПАС, які ініціюють процес проростання насіння, відкриває перспективу можливості регулювання та корекції цього етапу рослинного онтогенезу, підвищення схожості та дружності посівів, що має позитивні економічні наслідки для сільського господарства й агрономії.

Література

1. Apel K. Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 373–399.
2. Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C. Mitochondrial superoxide production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology & Medicine.* 2004. Vol. 37, № 6. P. 755–767.
3. 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.
4. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва : КДУ, 2007. 140 с.
5. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія.* 2007. Вип. 3 (12). С. 6–26.
6. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск : БГУ, 2004. 179 с.
7. 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.
8. 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.
9. Smirnoff N. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. NY: Blackwell Publishing, 2005. 302 p.
10. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом. *Актуальні проблеми сучасної медицини.* Вип.1. 2002. Т. 2. С. 96–97.