

УДК 577.1

Казначеева М.С.

ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ КАПУСТИ БІЛОКАЧАННОЇ РІЗНИХ ЗА РІВНЕМ СТІЙКОСТІ СОРТІВ

Кіровоградський державний педагогічний університет
ім. В. Винниченка, м. Кіровоград
e-mail: kazna4eeva@gmail.com

Ключові слова: антиоксиданти, аскорбінова кислота, каталаза, прооксиданти, малоновий діальдегід, супероксиданіонрадикал.

Процеси вільнорадикального перекисного окиснення біополімерів, що спричинюються дією активних форм кисню, супроводжують нормальний стан аеробних організмів та помітно посилюються при дії несприятливих умов [5].

По відношенню до рослин, проблема прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) має такі особливості:

1. Недостатній рівень висвітлення в науковій літературі особливостей ПАС та її окремих компонентів рослинних об'єктів дослідження в порівнянні з тваринними [11].

2. Значне посилення прооксидантної ланки ПАС рослин за рахунок фотосинтетичної продукції кисню та генерації АФК пластидами, клітинною стінкою, пероксисомами [2].

3. Недослідженим є зв'язок імуностійкості рослин та їх адаптації до змінних умов існування в плані зсуву прооксидантно-антиоксидантного балансу, а також динаміка зміни ПАС зі збільшенням тривалості зберігання їстівних вегетативних частин рослин [9].

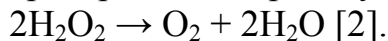
4. Актуальним залишається кількісний вміст низькомолекулярних антиоксидантів, та продуктів вільнорадикального перекисного окиснення які надходять до нашого організму з продуктами харчування рослинного походження.

Визначальним етапом утворення АФК є генерація супероксиданіону $O_2^{\cdot-}$, який є початковим компонентом всіх ланцюгових реакцій окисного каскаду. Утворений супероксид, за допомогою супероксиддисмутази перетворюється на пероксид водню (H_2O_2), який зараз розглядається як компонент сигнальної трансдукції [11], але,

разом з цим запускає перекисне окиснення біополімерів, окислює сульфгідрильні групи ферментів, здійснює дволанцюгові розриви ДНК [8]. Основним маркером перекисного окиснення ліпідів є малоновий діальдегід (МДА, $O=HC-CH_2-CH=O$), утворення якого призводить до гідрофілізації мембран, гальмування біосинтезу білка та реплікації [12], утворення міжмолекулярних зшивок по аміногрупам білкових молекул, та мутагенного M_1G при взаємодії з гуанозином ДНК [8].

Клітини рослин характеризуються багаторівневою системою захисту від пошкоджуючої дії АФК. До неї відносяться ферментні системи, що попереджують утворення супероксиданіону, а також антиоксидантні системи, які дезактивують продукти неповного відновлення кисню.

Одним з основних ферментних антиоксидантів є каталаза, яка прискорює розклад перекису водню з утворенням кисню і води:



Потужним неферментативним низькомолекулярним антиоксидантом є аскорбінова кислота (γ -Лактон 2,3-дегідро-L-гулонової кислоти), що гасить активні форми кисню, відновлює окиснені форми багатьох антиоксидантів (залізовмісні оксидази, цитохроми, вітаміни тощо) [11], стимулює загальну імуностійкість організмів [8].

Отже метою даної роботи було дослідження біохімічних показників прооксидантно-антиоксидантного балансу: рівні вмісту супероксиданіонрадикалу та малнового діальдегіду, активності каталази, концентрації аскорбінової кислоти, в їстівних частинах капусти білокачанної урожаю 2009 та 2008 років. Порівняння значення величин цих показників для стійких і нестійких до хвороб сортів рослин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Загальна характеристика дослідних рослин наведена в таблиці 1 [10] (капуста білокачанна стійких, середньо- та малостійких до хвороб сортів).

Зразки для біохімічного аналізу капусти добували з поперечного перерізу качана рослин урожаю 2009 та 2008 років. Кожна дослідна група включала 10 проб.

Визначення біохімічних показників здійснювався згідно загальноприйнятих методик.

Для оцінки загального фонового рівня супероксиданіонрадикалу використовували тест відновлення п-нітросинього тетразолію (НСТ-тест), згідно якого жовтий водорозчинний гідрохлорид НСТ

відновлюючись під дією супероксиданіонрадикалу перетворюється на синій диформазан ($\text{HST} + 2 \cdot \text{O}_2^- + 4\text{H}^+ = \text{Диформазан} + 2\text{HCl} + 2\text{O}_2$), який екстрагували хлороформом та кількісно визначали за допомогою спектрофотометра ($\lambda = 540 \text{ нм}$). Визначення джерел генерації супероксиду здійснюють шляхом попередньої стимуляції його виділення за допомогою 0,1 мкМ розчину NaF (продукція супероксиду кальцієвою месенжерною системою) та 1 % -ним розчином дріжджів (продукція супероксиду плазмолемою та клітинною стінкою). Продукцію супероксиду в нмоль на г тканини за секунду інкубації визначають за калібрувальним графіком [7].

Таблиця 1. Загальна характеристика дослідних сортів капусти білокачанної

Назва сорту	Показники				
	Продуктивність	Група стиглості	Стійкість до (бали)		
			холоду	посухи	хвороб
Тарас F1	7	сс	7-9	7	9
Золотий нектар	7	рс	7	7	7
Іюльська	5	рс	5-7	5-7	5

Примітка: сс – середньостиглий сорт, рс – ранньостиглий.

Фоновий рівень малонового діальдегіду (або вихідний МДА₀) оцінювали шляхом фотометруванням при 540 нм триметинового комплексу, утвореного 2-тіобарбітурової кислоти з МДА гомогенату проби, при нагрівання на киплячій водянній бані в кислому середовищі, проти контролю, що не містив гомогенату. Крім МДА, в цю реакцію вступають деякі інші альдегіди. Для ініціації приросту рівня МДА (МДА_{1,5}) пробу попередньо інкубували 90 хвилин (1,5 години) в прооксидантному залізо-аскорбінатному буферному розчині (рН = 7,4). Величину приросту – ΔМДА, що обернено пропорційна антиоксидантному запасу тканини, виражали як різницю між МДА₀ та МДА_{1,5} у відсотках від початкового рівня [4; 6].

Активність каталази визначали перманганатометричним методом [6]: до 5%-ного гомогенату тканини додавали 1%-ний розчин H₂O₂ з подальшим титруванням отриманої суміші 0,1 н розчином KMnO₄ у кислому середовищі. Фермент контрольної групи проб руйнували кип'ятінням.

Вміст аскорбінової кислоти визначали за методом Тильманса [6], за кількістю 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на окиснення аскорбінової кислоти до дегідроаскорбінової в дослідній пробі. Руйнування аскорбінату в

контрольній пробі здійснювали термічно, шляхом її кип'ятіння з 3%-вим розчином H_2O_2 .

Статистична обробка цифрових результатів дослідження проводилася за критерієм Стьюдента згідно загальноприйнятих методик [3]. Достовірно різними вважались результати при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати кількісного визначення супероксиданіонрадикалу, що наведені в таблиці 2 свідчать, що значення його фонового рівня для рослини сорту «Тарас F1» є найвищим і переважає показник для «Золотого нектару» в 1,68 раз, а показник «Юльської» майже в 2 рази.

Таблиця 2. Концентрація супероксиданіонрадикату в тканинах капусти білокачанної різних за стійкістю сортів

Назва сорту	Рівень супероксиданіонрадикату		
	фоновий, нмоль/г · с	стимуляція NaF, нмоль/г · с	стимуляція дріжджами, нмоль/г · с
Тарас F1	0,394 ± 0,029	0,447 ± 0,011	0,396 ± 0,011
Золотий нектар	0,235 ± 0,031 *	0,395 ± 0,009 *	0,234 ± 0,023 *
Юльська	0,207 ± 0,035 *	0,346 ± 0,042 *	0,207 ± 0,021 *
Юльська 2-го року зберігання	0,093 ± 0,007 *	0,129 ± 0,016 *	0,195 ± 0,011 *

Примітка: * - відхилення достовірне з ймовірністю $p < 0,001$ при порівнянні з високостійким сортом «Тарас F1».

Стимуляція утворення супероксиданіонрадикалу розчином NaF призводить до зростання величин показників на 11,86 %, 40,51 % та 40,17 % для стійкого, середньо- та малостійкого сортів капусти відповідно. Таким чином знову отримуємо кількісне переважання рівня супероксиданіонрадикалу капусти сорту «Тарас F1» по відношенню до інших двох сортів: в 1,13 (для сорту «Золотий нектар») та 1,29 раз (для сорту «Юльська»). Стимуляція дріжджами не призводить до посилення генерації супероксиду. Отже основним джерелом утворення супероксиданіонрадикалу для дослідних сортів капусти білокачанної є стимулятивна дія кальцієвої месенжерної системи.

Для капусти 2-го року зберігання характерне зростання кількісних показників утворення супероксиданіонрадикалу на 27,91 % при стимуляції розчином NaF та на 52,31 % при стимуляції дріжджами. Тому можна зробити висновок про те, що джерелом генерації супероксиду в дослідних рослинах є не лише кальцієва

месенжерна система, а й плазмалема та клітинна стінка, якій належить першочергова роль в забезпеченні цього процесу.

Аналіз результатів кількісного визначення рівня малонового діальдегіду, що наведені в таблиці 3, свідчить, що фоновий рівень МДА капусти стійкого сорту «Тарас F1» в 1,80 раз перевищує аналогічний показник «Юльської» та в 1,29 раз показник капусти «Золотий нектар». Різниця всіх показників є достовірною.

Таблиця 3. Концентрація малонового діальдегіду в тканинах капусти білокачанної різних за стійкістю сортів

№	Назва сорту	Рівень МДА		
		МДА ₀ , мкмоль/кг	МДА _{1,5} , мкмоль/кг	ΔМДА, %
1	Тарас F1	30,75 ± 1,90	8,87 ± 1,61	72,17 ± 3,88
2	Золотий нектар	23,92 ± 0,23 **	6,92 ± 0,88	70,87 ± 3,94
3	Юльська	17,09 ± 0,66*	4,96 ± 0,17**	70,63 ± 1,44
4	Юльська 2-го року зберігання	28,99 ± 1,37	38,99 ± 1,79 *	36,06 ± 5,81 *

Примітка: * - відхилення достовірне з ймовірністю $p < 0,001$ при порівнянні з високостійким сортом “Тарас F₁”;

** - відхилення достовірне з ймовірністю $p < 0,05$ при порівнянні з високостійким сортом “Тарас F₁”.

Найвищі показники стимульованого рівня МДА також притаманні високостійкому сорту «Тарас F1», що в 1,28 раз перевищує значення МДА_{1,5} капусти «Золотий нектар», та в 1,79 раз для капусти «Юльська». Це можливо пояснити участю АФК у захисних реакціях рослинного організму: роль у рецепції чужорідних агентів, радіопротекторна роль та реакція надчутливості, яку спричинює окислювальний вибух – процес утворення значної кількості АФК у відповідь на вторгнення авірулентних патогенів до рослинної клітини [1, 2, 11, 12]. Слід також додати, що стійкіші сорти рослин мають вищий антиоксидантний потенціал, що перешкоджає подальшому збільшенню рівня МДА, про це свідчать значення показників ΔМДА. Однак для капусти 2-го року зберігання значення МДА_{1,5} є найвищим з усіх дослідних рослин і переважає аналогічний показник для капусти «Тарас F1» в 4,39 раз.

Характерним також є переважання фонового рівня МДА над стимульованим для всіх дослідних сортів капусти білокачанної 2009 року, що пов'язане зі значною антиоксидантною активністю їх

тканин, тоді ж як для капусти, 2-го року зберігання спостерігаємо зворотню закономірність: достовірне значне переважання МДА_{1,5} над МДА₀.

Результати кількісного визначення антиоксидантів наведені в таблиці 4.

Таблиця 4. Активність каталази та вміст аскорбінової кислоти в тканинах капусти білокачанної різних за стійкістю сортів

Назва сорту	Активність каталази, мкмоль/г хв.	Концентрація аскорбінової кислоти, ммоль/кг
Тарас F ₁	0,81 ± 0,07	2,12 ± 0,03
Золотий нектар	0,63 ± 0,03 **	1,69 ± 0,04 *
Іюльська	0,48 ± 0,02 *	1,23 ± 0,07 *
Іюльська 2-го року зберігання	0,37 ± 0,02 *	0,38 ± 0,01 *

Примітка: * - відхилення достовірне з ймовірністю $p < 0,001$ при порівнянні з високостійким сортом «Тарас F₁»;

** - відхилення достовірне з ймовірністю $p < 0,05$ при порівнянні з високостійким сортом «Тарас F₁».

Аналіз отриманих результатів свідчить, що капуста білокачанна стійких сортів («Тарас F₁») достовірно характеризується найбільшою активністю каталази, що майже в 1,7 рази перевищує аналогічні показники у малостійкого сорту «Іюльська». Проміжні показники активності ферменту достовірно має середньостійкий сорт «Золотий нектар».

Капуста білокачанна сорту «Іюльська» другого року зберігання має активність каталази в 1,73 рази нижче, ніж аналогічні величини у всіх трьох сортів врожаю 2009 року ($p_{1,2,3} < 0,001$).

Вміст аскорбінової кислоти в листках капусти стійкого сорту «Тарас F₁» є в 1,25 раз вищий ніж в листках середньостійкого сорту «Золотий нектар», та майже в 1,7 раз вищий за вміст у малостійкому сорті «Іюльська». Різниця всіх трьох величин показника є достовірною ($p < 0,001$).

Зі збільшенням терміну зберігання капусти, кількість аскорбінату в її листках зменшується до рівня чутливості методу. Відомо, що аскорбінова кислота стабільна в кислому середовищі і часто зв'язана з білком (аскорбіген), тому квашення капусти зберігає її стабільність [4].

Таким чином можна припустити, що стійкість сорту прямо пропорційно пов'язана з величиною антиоксидантного потенціалу,

який виражається у значеннях активності каталази та концентрації аскорбінової кислоти. Зі збільшенням терміну зберігання капусти знижується її антиоксидантна активність.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених біохімічних досліджень було виявлено, що стан прооксидантно-антиоксидантної системи капусти білокачанної сортів «Тарас F1», «Золотий нектар» та «Юльська» характеризується прямопропорційною залежністю від їх рівня стійкості до хвороб. Так високостійкий сорт «Тарас F1» достовірно має найвищі показники як прооксидантної (рівень МДА, кількість супероксиданіонрадикалу), так і антиоксидантної (активності каталази, вмісту аскорбінату) ланки, тоді ж як малостійкий сорт «Юльська» характеризується найнижчими значеннями відповідних показників. Зі збільшенням терміну зберігання капусти спостерігаємо загальну тенденцію до посилення утворення АФК тканинами та активації процесів вільнорадикального перекисного окиснення з утворенням МДА, додаткову генерацію АФК не лише кальцієвою месенджерною системою, а й плазмалеомою та клітинною стінкою при одночасному значному зниженні антиоксидантної активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г. Общая и молекулярная фитопатология. – М.: Мир, 2002. – 304 с.
2. 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.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
4. Мусиенко М.М., Паршикова Т.В., Славный П.С. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений. – К.: Фитосоциоцентр, 2001. – 200 с.
5. Мусиенко М.М. Физиология растений. – К.: Либідь, 2005. – 808 с.
6. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині // Під ред. І.П.Кайдашева, О.В.Катрушова, В.М.Соколенко. – Полтава, 1996. – 271 с.
7. Цебржинский О.И. Количественное определение супероксида НСТ-тестом в тканях // Тези доповідей науково-практичної конференції "Організація токсикологічної допомоги в Україні". – К., 2002. – С. 65-66.
8. Цебржинский О.И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса // Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. – Полтава, 1992. - С. 120-155.
9. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. - СПб.: Изд-во СПбУ, 2002. – 240 с.
10. Державна служба з охорони прав на сорти рослин <http://www.sops.gov.ua/> [Електронний ресурс] – Заголовок з екрану.

11. Nicholas Smirnoff. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. – UK.: Blakwell Publishing Ltd. – 2005. – 317 p.
12. Nair V., O'Neil C.L., Wang P.G. "Malondialdehyde" Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. - New York: John Wiley & Sons, 2008. - 832 p.

М.С. Казначеева

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КАПУСТЫ
БЕЛОКАЧАННОЙ РАЗЛИЧНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ
СОРТОВ**

Ключевые слова: антиоксиданты, аскорбиновая кислота, каталаза, прооксиданты, малоновый диальдегид, супероксиданионрадикал.

В статье рассмотрены особенности прооксидантно-антиоксидантного баланса растений. Проведено количественное определение основных его биохимических показателей: уровня и источников генерации супероксиданионрадикала, малонового диальдегида, активности каталазы, а также концентрации аскорбиновой кислоты в капусте белокочанной сортов «Тарас F1», «Золотой нектар» и «Июльская». Установленная прямопропорциональна зависимость значения показателей состояния прооксидантно-антиоксидантной системы от уровня устойчивости сорта капусты белокочанной к болезням.

M.S. Kaznacheeva

**RESEARCH ON THE STATE OF THE PROOXIDANT AND
ANTIOXIDANT SYSTEM OF CABBAGE VARIETIES WITH
DIFFERENT RESISTANCE LEVELS**

Key words: antioxidants, ascorbic acid, catalase, prooxidants, malonic dialdehyde, superoxidanionradical.

The article discusses the distinctive features of the prooxidant-antioxidant balance of plants. It makes a quantitative assessment of its basic biochemical parameters: the level and sources of superoxidanion radical generation, malondialdehyde, catalase activity and concentration of ascorbic acid in white cabbage varieties «Taras F1», «Golden Nectar» and «Iyulska». The study establishes a direct correlation between the state of the prooxidant-antioxidant system of white cabbage and its resistance to diseases.