

**УДК 581.131**

## **ВПЛИВ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ЗМІНИ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСУ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ**

*Сандецька Н.В.<sup>1</sup>, Каменчук О.П.<sup>1</sup>, Ситар О.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна*

<sup>2</sup>*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна*

*E-mail: Isnv@ukr.net*

Досліджено активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази, вміст малонового діальдегіду та SH-груп в 14-добових рослинах пшениці за дії позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату. Виявлено зміни у антиоксидантному статусі рослин за позакореневої обробки мінеральними добривами.

**Ключові слова:** озима пшениця, позакореневе підживлення, SH-групи, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, малоновий діальдегід, супероксиддисмутаза.

### **ВСТУП**

Одним із ключових завдань землеробства є підвищення продуктивності культурних рослин. Тісна залежність врожайності зернових та інших сільськогосподарських культур від рівня застосування мінеральних добрив доведена багаторічним досвідом ведення землеробства [1, 2].

Удосконалення технологій вирощування, збалансування систем живлення, досягнення високих коефіцієнтів засвоєння елементів живлення є важливими складовими підвищення врожайності, поряд зі створенням нових сортів із високим генетичним потенціалом продуктивності [2].

Розробка нових підходів до регулювання і розкриття потенціалу продуктивності сільськогосподарських рослин має стратегічне значення для рослинництва. Одним із таких підходів є дослідження регуляції субстрат-ферментних взаємодій і методи діагностики ферментативної активності рослинної тканини або органу. В якості такого показника нами запропоновано дослідження вмісту сульфгідрильних груп, що може мати діагностичну цінність при дослідженні змін вмісту ферментів прооксидантно-антиоксидантної системи захисту. Каталітична роль сульфгідрильних груп (SH-груп), ферментів добре відома.

Величини концентрацій аніонів – ортофосфату і сульфату в рослинах можуть суттєво впливати на кількість SH-груп. Фосфор в більшості ґрунтів світу міститься у важкодоступній мінеральній та органічній формі. Його концентрація в ґрунтовому розчині зазвичай низька (від 2 до 10 мкМ). Він є одним із важкодоступних ґрунтових макроелементів, який може лімітувати врожайність рослин. Ускладнює засвоєння фосфору рослинами також низька швидкість його дифузії в ґрунті:

вона складає всього від 10-12 до 10-15 м/с, внаслідок чого прикоренева зона рослин швидко виснажується [3]. Велика частина необхідної рослинам сірки поглинається корінням у формі сульфату ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Сірка включається в амінокислоти цистеїн, цистин і метіонін, фосфор - в аденозинтрифосфат (АТФ) та інші аденозинфосфати, що грають ключову роль в енергетичному обміні клітини, а також в фосфоліпіді клітинних мембран та в нуклеїнові кислоти [4]. Сірка підвищує ефективність використання інших поживних речовин рослинами, насамперед азоту і фосфору. Найчастіше дефіцит сульфатів спостерігається на глинистих і суглинстих ґрунтах. Дефіцит елемента зростає за умов внесення сечовини, аміачної селітри, діамонійфосфату, аміачної води і безводного аміаку тощо. Перераховані добрива містять сірку в малих кількостях або взагалі її не містять [5].

Таким чином, метою нашої роботи було простежити залежність між рівнем сульфгідрильних груп у органах пшениці, вмістом малонового діальдегіду та активності супероксиддисмутази, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази в залежності від умов позакореневого підживлення сіркою та фосфором.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Рослини озимої пшениці сорту Смуглянка вирощували методом водної культури в лабораторних умовах на середовищі Хогленда-Арнона (Х-А).

Середовище Хогленда-Арнона розчиняли водою 1:10 та використовували у дослідах. Проростки озимої пшениці у фазі двох листків обробляли шляхом занурення листків у розчини на 5 хв при 23 °С за наступною схемою: 1 - 1/10 Х-А (контроль); 2 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ); 3 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0,1 мМ); 4 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ); 5 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 мкМ); 6 - 1/10 Х-А + позакоренева обробка  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ).

Рослини озимої пшениці на 7 день після позакореневої обробки використовувалися для визначення кількості сульфгідрильних груп, глутатіонредуктази, супероксиддисмутази та вмісту малонового діальдегіду. Кількість сульфгідрильних груп визначали за методикою Велча і Норвела [6].

Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали за методом Pinto R.E. та Bartley W. [7] в модифікації Кругликової Г.А. та Штутман Ц.М. [8]. В якості окислювального субстрату використовували пероксид водню. Активність оцінювали за різницею між кількістю відновленого глутатіону в контрольній пробі (без  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) та дослідній [9].

Для визначення активності СОД (КФ 1.15.1.1) використовували спеціальний кит для визначення активності СОД (SOD Assay Kit-WST, Sigma-Aldrich). Рослинні клітини мають кілька форм СОД. Зокрема, нами був проведений аналіз цитозольної фракції ферменту. Наважку листків гомогенізували в 50 мМ калій-фосфатного буфера, рН 7,8. Гомогенат центрифугували, а супернатант використовували як грубий екстракт цитозольної фракції СОД. Оптичну щільність вимірювали при 450 нм.

Активність ГР (КФ 1.6.4.2) визначали спектрофотометрично по зменшенню оптичної щільності при довжині хвилі 340 нм в результаті окиснення НАДФ\*Н в присутності окисненого глутатіону [10]. Реакційне середовище містило 100 мМ

фосфатного буфера (рН 7,8), 1 мМ EDTA, 0,2 мМ НАДФН та 0,5 мМ окисненого глутатіону. Вимірювання оптичної щільності проводили протягом 10 хв. Активність ферменту ро зраховували в мкМ / (мг х хв) на основі коефіцієнта молярної екстинкції  $\epsilon = 6,2 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ .

Результати оброблені статистично за допомогою програми Microsoft Excel.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Кількісне визначення вмісту сульфгідрильних груп у коренях озимої пшениці показало, що їх вміст залежить від концентрації сірки та фосфору в поживному розчині. Обробка різними концентраціями сульфату і ортофосфату призводила до збільшення вмісту SH-груп в коренях озимої пшениці (рис. 1).

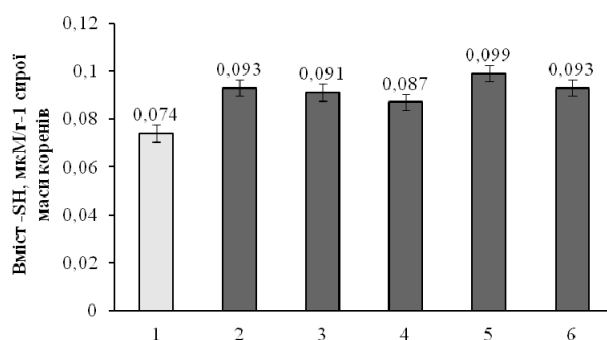


Рис. 1. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на вміст SH-груп в коренях озимої пшениці сорту Смуглянка.

Умовні позначки тут і далі: 1 - 1/10 X-A; (контроль) 2 - 1/10 X-A +  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ); 3 - 1/10 X-A +  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0,1 мМ); 4 - 1/10 X-A +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ); 5 - 1/10 X-A +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 мкМ); 6 - 1/10 X-A +  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ).

Згідно з отриманих даних, позакоренева обробка  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 мкМ) призводила до збільшення вмісту SH-груп на 34%; обробка  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ) – на 26%; а обробка  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ) – на 18%. Максимальний ефект спостерігався за позакореневої обробки 100 мкМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , що в даному випадку може свідчити про підвищення ферментативної активності в тканинах кореня.

Також паралельно було досліджено вміст SH-груп в листках рослин пшениці (рис. 2). Показано, що в листках порівняно з коренями вміст SH-груп був меншим, але було відмічено тенденцію до більшої величини зростання вмісту SH-груп за дії добрив.

Дані по вмісту SH-груп в листках варіанту з обробкою  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 мкМ) були вищими за контрольні значення на 21%, а у варіанті  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1,0 мкМ) +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 мкМ) вміст SH-груп зростав на 18% порівняно з контролем. Відомо, що зростання вмісту SH-груп за дії певного антропогенного чинника є захисною реакцією при розвитку оксидного стресу. Так, зростання вмісту сполук тіолової природи, що

містять SH-групи та фенолів, флавоноїдів, проліну, а також активності супероксиддисмутази, пероксидази було показано за умов дії ультрафіолетового опромінення та нікелю [11].

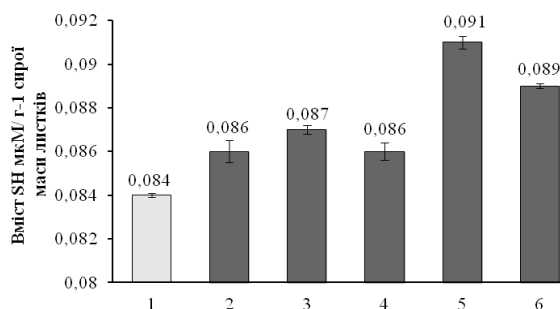


Рис. 2. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на вміст SH-груп в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

Відомо, що у структурі глутатіону знаходиться більша частину пулу вільних тиолових груп у біологічних системах. Відновлений глутатіон є основним водорозчинним антиоксидантом в процесах фотосинтезу і в нефотосинтетичних тканинах, реагує прямо або опосередковано з активними формами кисню, сприяє цілісності клітинних структур і певним функціям різних метаболічних шляхів [12, 13].

Для підтвердження нашого припущення стосовно підвищення ферментативної активності в фотосинтетичних тканинах за умов дії сульфату та ортофосфату було досліджено активність глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази (рис. 3, 4).

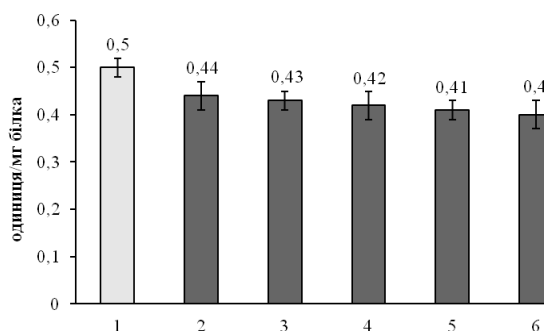


Рис. 3. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на активність глутатіонпероксидази в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

Як і в тканинах кореня, так і в листках показано зниження активності глутатіонпероксидази, що в свою чергу пов'язано зі зростанням вмісту SH-груп. Відомо, що важлива функція глутатіону полягає в детоксикації при оксидному стресі: глутатіон є косубстратом для глутатіонпероксидази при захисній реакції для

зниження вмісту гідроперекисів при окислювальному стресі [14]. Тому, в нашому експерименті ми спостерігали значне зростання вмісту SH-груп як в листках, так і в коренях за позакореневої обробки. Суттєве зростання було відмічено при позакореневій обробці з  $K_2SO_4$ , тому додаткове підживлення сіркою у формі  $K_2SO_4$  може як сприяти підвищенню вмісту SH-груп, так і створює умови для розвитку окисного стресу, який в свою чергу може забезпечити преадаптацію для рослин пшениці за даних умов.

Крім того, ГР є ферментом, що каталізує НАДФН-залежне відновлення окисненого глутатіону і підтримує його внутрішньоклітинний пул у відновленому стані [15]. Утилізація  $H_2O_2$ , що утворюється в хлоропластах, забезпечується ферментом глутатіонредуктазою, що здійснює НАДФН-залежне відновлення окисненого димерного глутатіону [16]. Було показано, що індукція ГР в рослинах відбувається в різних стресових умовах [17]. В експериментах Tsai [18] відзначено збільшення активності ГР в коренях рису у відповідь на дію NaCl. Дослідження Dixit [19] показали подібні залежності при обробці рослин гороху кадмієм. Зростання активності ГР спостерігали і в рослинах пшениці за обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату (рис. 4). Наведені результати дозволяють припустити, що різні стресові фактори, до яких можна віднести позакореневу обробку мінеральними добривами, можуть викликати в рослинах подібні процеси.

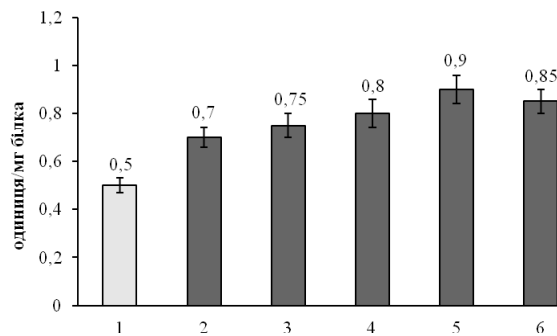


Рис. 4. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на активність глутатіонредуктази в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

Поряд з цим, вивчення маркеру окисного стресу – вмісту малонового діальдегіду та активності ферменту СОД продемонструвало тенденцію до зростання вмісту МДА у всіх досліджуваних варіантах (рис. 5).

Дане зростання свідчить про розвиток окисного стресу і, на нашу думку, окисний стрес при позакореневій обробці мінеральними добривами (сірка та фосфор) може являти собою явище преадаптації, оскільки активно функціонує проантиоксидантна система і паралельно зростає вміст SH-груп, а змін у вмісті антиоксидантного ферменту СОД відмічено не було (рис. 6).

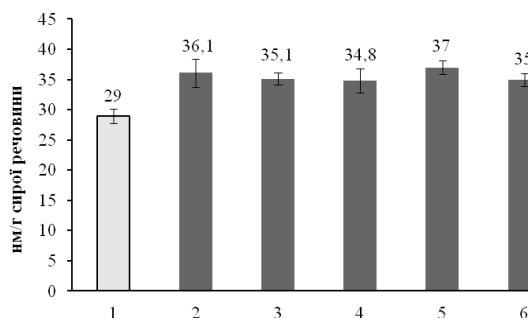


Рис. 5. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сульфату та ортофосфату на вміст малонового діальдегіду (МДА) в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

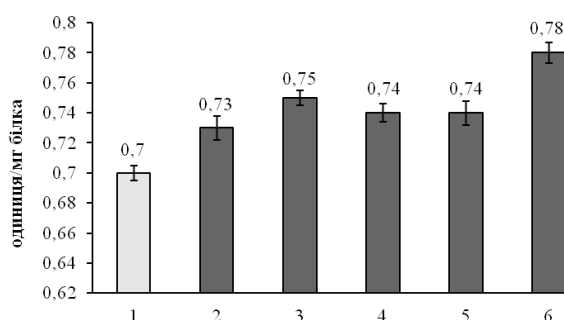


Рис. 6. Вплив позакореневої обробки різними концентраціями сірки та фосфору на активність супероксиддисмутази в листках озимої пшениці сорту Смуглянка.

СОД є одним із ключових ферментів системи захисту клітин і тканин від окислювальної деструкції. Вона каталізує реакцію дисмутації супероксидного аніон радикалу ( $O_2^-$ ) до  $O_2$  та  $H_2O_2$ , регулюючи таким чином внутрішньоклітинну концентрацію вільних радикалів кисню. Активність СОД за дії несприятливих факторів навколишнього середовища, при збільшенні утворення активних форм кисню у організмах рослин, може змінюватися диференційовано в залежності від тривалості й інтенсивності дії стресового чинника, а також від стійкості організму, стадії розвитку рослин тощо [20]. Результати детектування змін активності СОД не показали статистично достовірних змін величин, що на фоні зростання активності ГР та вмісту SH-груп може свідчити про більшу активність прооксидантної системи захисту.

Зростання активності ГР та незначні зміни у вмісті СОД, що були визначені у рослин пшениці, також було відмічено при інфікуванні рослин нуту *Cicer arietinum* L. Нановірусами з подальшим розвитком оксидного стресу [21]. Для фітостресу є характерною активація основних антиоксидантних ферментів та збільшення пулу низькомолекулярних антиоксидантів на фоні зростання їх окиснення [22, 23]. Поряд з цим, у рослин гороху за умов дії гіпертермії, екзогенного пероксиду водню було

виявлено обмеження активності глутатіонредуктази при оксидному стресі і зроблено припущення про різні механізми відповіді антиоксидантної системи хлоропластів на дію різних абіотичних факторів [24].

### ВИСНОВОК

Показано, що позакоренева обробка сульфатом та ортофосфатом 14-денних проростків озимої пшениці сорту Смуглянка призводить до збільшення вмісту SH-груп в коренях та листках. Найбільш сильний ефект дала обробка  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (100 мкМ), при якій вміст сульфгідрильних груп у коренях та листках підвищувався на 34%. Встановлені зміни вмісту SH-груп в коренях та листках проростків озимої пшениці можуть слугувати основою для фізіологічного обґрунтування систем живлення культури на початкових фазах розвитку. Виявлено наявність розвитку оксидного стресу при позакореневій обробці мінеральними добривами (сірка та фосфор), що може являти собою явище предадаптації, оскільки активно функціонує проантиоксидантна система і паралельно зростає вміст SH-груп, а змін у вмісті антиоксидантного ферменту СОД відмічено не було. Зокрема, позакоренева обробка сіркою та фосфором (100 мкМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) впливає на зростання активності глутатіонредуктази та вмісту SH-груп у рослинах пшениці, що може сприяти підвищенню стійкості рослин до стресових факторів за рахунок зростання пулу сірковмісних сполук.

### Список літератури

1. Душкин А. Н. Комплексное действие удобрений, микроэлементов и регуляторов роста / А. Н. Душкин, Н. С. Беспалова // Химизация сельского хозяйства. – 1990. – № 6. – С. 59–61.
2. Моргун В. В. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков / В. В. Моргун, В. В. Швартау, Д. А. Киризий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–393.
3. Швартау В. В. Особенности реакции растений на дефицит фосфора / В. В. Швартау, Б. И. Гуляев, А. Б. Карлова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 3. – С. 208–220.
4. Saito K. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road / K. Saito // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 136, № 1. – P. 2443–2450.
5. Минеев В. Г. Агрехимия: учебник. 3-е издание / В. Г. Минеев. – М. : Наука, 2006. – 720 с.
6. Rengel Z. Sulfhydryl groups in root-cell plasma membranes of wheat genotypes differing in Zn efficiency / Z. Rengel // Physiologia Plantarum. – 1995. – Vol. 4. – P. 604–612.
7. Pinto R. E. The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver / R.E. Pinto, W. Bartley // J. Biochem. – 1969. – Vol. 115, № 3. – P. 449–456.
8. Кругликов Г.О. Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия / Г.О. Кругликов, И.М. Штутман // Украинский биохимический журнал. – 1976. – № 2. – С. 223–227.
9. Sedlak J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent / J. Sedlak, R. H. Lindsey // Anal. Biochem. – 1968. – Vol. 24; 25, № 1. – P. 192–205.
10. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress / G.G. Yannarelli, A.J. Fernandez-Alvare, D.M. Santa-Cruz [et al.] // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 68. – P. 505–512.
11. Response of ultraviolet-B and nickel on pigments, metabolite and antioxidants of *Pisum sativum* L. / S. Suruchi, M. Shweta, K. Rima [et al.] // J. Env. Biol. – 2009. – Vol. 30, № 5. – P. 677–684.

12. Bielawski W. Reduced and oxidized glutathione reductase activity in tissues of *Pisum sativum* / W. Bielawski, K. W. Joy // *Planta*. – 1986. – Vol. 169. – P. 267–272.
13. Ascorbic acid metabolism in the ascorbate deficient *Arobidopsis* mutant *vtc1* / P. L. Conklin, J. E. Pallanca, R. L. Last [et al.] // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 115. – P. 1277–1285.
14. Sies H. Biochemistry of thiol groups: the role of glutathione / H. Sies // *Naturwissenschaften*. – 1989. – Vol. 76, № 2. – P. 57–64.
15. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling / G. Noctor, L. Gomez, H. Vanacker [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – P. 1283–1304.
16. The role of oxygen species in plant signal transduction / F. Van Breusegem, E. Vranova, J. Dat [et al.] // *Plant Sci.* – 2001. – Vol. 161. – P. 405–414.
17. Turhan E. The activity of antioxidative enzymes in three strawberry cultivars related to salt-stress tolerance / E. Turhan, H. Gulen, A. Eris // *Acta Physiol. Plant.* – 2008. – Vol. 30. – P. 201–208.
18. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Y.C. Tsai, C.Y. Hong, L.F. Liu, C.H. Kao // *J. Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 162. – P. 291–299.
19. Dixit V. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.) / V. Dixit, V. Pandey, R. Shyam // *J. Exp. Bot.* – 2001. – Vol. 52. – P. 1101–1109.
20. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // *Цитология*. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465–474.
21. Гусейнова И.М. Антиоксидантная система у инфицированных нановирусами бобовых растений / И.М. Гусейнова, А.Ч. Мамедов, Н.Ф. Султанова // *Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования»*. – 2011. – № 6.
22. Fu J. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress / J. Fu, B. Huang // *Environ. Exp. Bot.* – 2001. – Vol. 45. – P. 105–114.
23. Hernandez J.A. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea plants / J.A. Hernandez, M.S. Almansa // *Physiol. Plant.* – 2002. – Vol. 115, № 2. – P. 251–257.
24. Прооксидантно-антиоксидантный статус хлоропластов гороха при действии стрессирующих абиотических факторов среды. 2. Антиоксидантная система защиты / Л.Н. Курганова, И.В. Балалаева, А.П. Веселов [и др.] // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. – 2010. – № 2 (2). – С. 550–556.

**Сандецька Н.В. Влияние условий минерального питания на элементы антиоксидантного статуса растений озимой пшеницы / Н.В. Сандецька, О.П. Каменчук, О.В. Ситар // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С.179-186.**

Исследована активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, содержание малонового диальдегида и SH-групп в органах проростков пшеницы при действии внекорневой обработки различными концентрациями сульфата и ортофосфата. Выявлены изменения в антиоксидантном статусе растений при внекорневой обработке минеральными удобрениями (сера и фосфор).

**Ключевые слова:** озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.), внекорневая подкормка, SH-группы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидаза, малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза.

**Sandetska N.V. The effect of mineral nutrition conditions on antioxidant status of winter wheat plants parameters / N.V. Sandetska, O.P. Kamenchuk, O.V. Sytar // Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 179-186.**

The activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde content and SH-groups in leaves and roots of wheat seedlings under the actions of foliar treatment by various concentrations of sulfur and phosphorus has been studied. Stated changes in antioxidant status of wheat plants under foliar treatment by various concentrations of sulfur and phosphorus was discussed.

**Keywords:** winter wheat (*Triticum aestivum* L.), foliar treatment, sulfhydryl groups, glutathione reductase, free thiols, malondialdehyde, superoxide dismutase.

*Поступила в редакцию 11.10.2012 г.*