

ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦІОНУВАННЯ ДЕЯКИХ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН В ТКАНИНАХ *LIGULARIA GLAUCA* (L.) HOFFM. І *L. SIBIRICA* (CASS.) ЗА РІЗНИХ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ

А. Є. ШЕЛИФІСТ, М. Д. ДЗВІНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Інститут біології, хімії та біоресурсів, кафедра біохімії та біотехнології
бул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000
e-mail: antonina_shel@mail.ru

На основі аналізу кількісного вмісту суми поліфенолів і флавоноїдів та поліфенолоксидазної активності експлантів *Ligularia glauca* (L.) J. Hoffm. і *L. sibirica* (Cass.) проаналізовані особливості функціонування системи антиоксидантного захисту рослин за наявності та відсутності у середовищі росту екзогенного цистеїну. Дослідженню підлягали експланти *L. glauca* і *L. sibirica*, вирощені в умовах *in vitro* за наявності у середовищі 60 мг/л цистеїну та без нього. Основою для приготування поживних середовищ служило середовище Мурасіге-Скуга. Вміст суми поліфенолів та флавоноїдів визначали спектрофотометрично у перерахунку на рутин та хлорогенову кислоту відповідно. Електрофоретичне дослідження ізоформ поліфенолоксидази проводили в нативних умовах у 5% концентруючому і 12% розділяючому поліакриламідних гелях. Як електродний буфер використовували трис-гліциновий буфер рН 8,3. Для ідентифікації ферменту гелі інкубували в 0,1% L-ДОФА у натрій-фосфатному буфері рН 7,0. В роботі показано, що експланти *L. glauca* і *L. sibirica* здатні нагромаджувати достатньо великі кількості поліфенольних сполук. Однак, за наявності у середовищі росту екзогенного цистеїну їх вміст в сировині *L. glauca* у двічі нижчий. Вміст флавоноїдів в експлантах *L. sibirica* більше ніж у два рази переважає за такий іншого виду. Ця різниця суттєво зростає за умови їх культивування у присутності екзогенного цистеїну. Від особливостей культивування залежить також поліфенолоксидазна активність експлантів. Мінімальна ферментативна активність встановлена для експлантів *L. glauca*, вирощених за відсутності в поживному середовищі екзогенного цистеїну. Її значення для обох досліджуваних видів відрізняються майже у 20 разів. Показано, що ізоферментний спектр поліфенолоксидази *L. sibirica* складається з десяти компонентів, тоді як *L. glauca* з шести. Виявлена його залежність від умов культивування. Так, на електрофореграмі *L. sibirica* стабільно виявляються дев'ять компонентів, тоді як на електрофореграмі *L. glauca* – чотири. Компонент з Rf за стресових умов росту набуває мажорного забарвлення у *L. sibirica* і з'являється у *L. glauca*. На основі якісного і кількісного аналізу компонентів ферментативної і неферментативної ланок системи антиоксидантного захисту *L. glauca* і *L. sibirica* можна говорити про більш високий адаптивний потенціал *L. sibirica*.

Ключові слова: *Ligularia glauca*, *Ligularia sibirica*, поліфенолоксидаза, поліфеноли, флавоноїди, цистеїн, *in vitro*, електрофорез, експлант.

Вступ. Одним із сучасних методів збереження рідкісних рослин є культивування їх в умовах *in vitro*. Двома червонокнижними видами *L. glauca* (L.) J. Hoffm., *L. sibirica* (Cass.) у флорі України представлений рід *Ligularia* (Cass.) родини *Asteraceae*. З них *L. glauca* є зникаючим, монокарпічним видом, чисельність якого за останні 30 років знизилась на 50-60%. Він зустрічається в ізольованих локалітетах на пн.-сх. межі ареалу (в Україні - Чернівецька, Львівська та Закарпатська області). Природоохоронний статус виду *L. sibirica* – вразливий, реліктовий, диз'юктивно поширений на межі ареалу. Більшість його популяцій представлена лише кількома десятками генеративних особин. Ареал поширення в Україні - Карпати та Мале Полісся (Червона

книга України, 2009). Враховуючи малочисельність видів в природних популяціях, були проведені роботи по їх введенню в культуру *in vitro* з метою розробки методики розмноження із залученням біотехнологічних підходів. На цьому етапі досліджень з'ясувалося, що успішне розмноження експлантів *L. glauca* і *L. sibirica* через інтенсифікацію окислювальних процесів можливе лише за умови введення до складу поживних середовищ цистеїну, який є потужним антиоксидантом (Кушнір, 2005).

У процесі життєдіяльності в клітинах утворюються вільні радикали, які є їх метаболічно-активними компонентами, що порушують обмін речовин. Їх знешкодження, як показують результати багатьох досліджень, забезпечується функціонуванням

антиоксидантної системи, що складається з ферментативної і неферментативної ланок, визначаючи значною мірою стійкість рослин до несприятливих впливів (Казначєва, 2011).

До неферментативної ланки системи антиоксидантного захисту входять сполуки фенольної природи, яким належить важлива роль у підтримці рослинного організму в необхідному для життя відновленому стані. Зокрема, одним з найважливіших класів біологічно активних речовин рослинного походження є поліфенольні сполуки та флавоноїди, які в своєму складі містять дві і більше гідроксильних груп (Карпин та Цвілінюк, 2009). Дана група речовин в фізіологічних умовах утворює окисно-відновну систему «фенол ↔ семіхінон ↔ хінон», компоненти якої легко переходять один в один. Вона відіграє роль буферної системи, а також синергіста аскорбінової кислоти у підтримці редокс-рівноваги (Алявіна и Загоскіна, 2010; Perto and Brumaghi, 2010).

Одним із ферментів антиоксидантного захисту є поліфенолоксидаза – металоензим, який містить біядерні центри міді (Fand, 2007). Даний фермент використовує молекулярний кисень для каталізу окислення фенольних сполук, утворюючи відповідні хінони. Акцептором водню в цих реакціях служить молекулярний кисень (Rozzaque et al., 2000; Sae-Soon and Woo-Yean, 2013).

Інтенсивне окислення тканин експлантів виявилось найбільш складною перешкодою при введенні в культуру *in vitro* видів *L. glauca* і *L. sibirica*. Суттєво проявлялися окислювальні процеси і безпосередньо на етапі розмноження. Подолати їх прояви вдалося за допомогою включення додаткової обробки насіння стерильним розчином аскорбінової кислоти під час стерилізації, а також введенням до складу поживних середовищ цистеїну.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити вміст поліфенолів і флавоноїдів, а також зробити порівняльний аналіз кількісного і якісного вмісту поліфенолоксидази в експлантах *L. glauca* та *L. sibirica*, культивованих за умов наявності в поживному середовищі цистеїну та за його відсутності.

Матеріали та методи. Дослідженню підлягали експланти *L. glauca* та *L. sibirica*, вирощені в умовах *in vitro* за наявності середовищі 60 мг/л цистеїну та без нього. Основою для приготування поживних середовищ служило середовище Мурасіге-Скуга (Кушнір, 2005).

Вміст суми поліфенолів і флавоноїдів визначали спектрофотометричним методом перерахунку на рутин (Чечуй, 2011) та

хлорогенову кислоту (Карпин та Цвілінюк, 2009) відповідно.

Для отримання ферментативного препарату поліфенолоксидази використовували 0,05 М Na-фосфатний буфер з рН 7,0, що містив 0,35 М КСІ і 0,5 % тритон Х-100 (Thygesen et al., 2000). Активність поліфенолоксидази визначали при довжині хвилі 420 нм, використовуючи як субстрат 100 мМ катехол в 0,1 М фосфатному буфері рН 7,0 (Sae-Soon and Woo-Yean, 2013; Zivcovic, 2010).

Ферментний препарат, що підлягав електрофоретичному розділенню, отримували з використанням 100 мМ трис-гліцинового буфера рН 8,3, що містив 0,1% аскорбінової кислоти, 15% сахарозу та 0,1% цистеїн. Електрофорез проводили в нативних умовах з використанням 4% концентруючого (С 3%) і 12% розділяючого (С 4%) гелів у трис-гліциновому буфері рН 8,3. Для ідентифікації ферменту гелі інкубували в 0,1% L-3, 4 - дигідроксифенілаланін (L-ДОФА) у натрій-фосфатному буфері рН 7,0 (Fand, 2007; Mayer, 2006).

Експеримент виконували у шести біологічних повторностях. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми *Microsoft Excel* та оцінювали з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. У попередніх наших дослідженнях було встановлено, що ефективно культивування в умовах *in vitro* *L. glauca* і *L. sibirica* можливе лише при наявності у поживному середовищі цистеїну. У зв'язку з цим за нормальні, тобто ті, при яких нівельована дія стресового фактору, були прийняті показники, властиві рослинам саме за таких умов вирощування. При дослідженні кількісного вмісту суми поліфенолів було встановлено, що в стресових умовах обидва види характеризуються практично однаковими їх значеннями. У той же час, при додаванні в поживне середовище цистеїну в експлантах *L. glauca* він зменшувався майже у два рази, тоді як для іншого досліджуваного виду відмінностей виявлено не було. Натомість при зміні умов культивування в сировині *L. glauca* залишається постійним вміст флавоноїдів. Слід зауважити, що він є досить незначним і меншим за такий *L. sibirica*. За нормальних умов вирощування відмінності у вмісті флавоноїдів в експлантах обох досліджуваних видів суттєво поглиблюються. Так, на тлі цистеїну, вміст флавоноїдів в тканинах *L. sibirica* переважає за такий *L. glauca* у 100 разів (табл.).

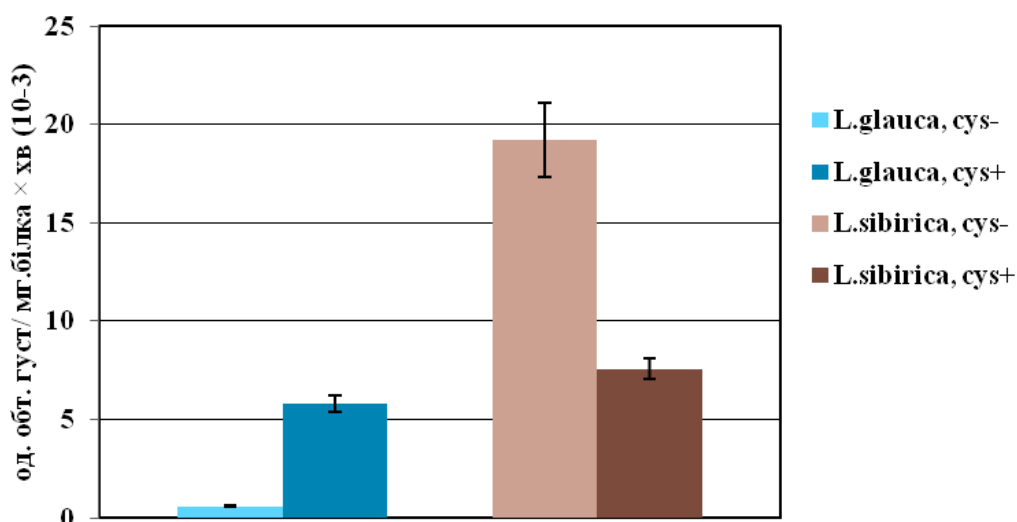


Рис.1. Поліфенолоксидазна активність експлантів *L. glauca* і *L. sibirica* за різних умов культивування

Fig.1. Polyphenol oxidase activity in explants *L. glauca* and *L. sibirica* under different culture conditions

Таблиця

Вміст поліфенолів і флавоноїдів в експлантах *L. glauca* і *L. sibirica* за наявності / відсутності в середовищі цистеїну ($M \pm m$, $p \leq 0,05$)

Table

The content of polyphenols and flavonoids in *L. glauca* and *L. sibirica* explants in the presence / absence of cysteine in the medium ($M \pm m$, $p \leq 0,05$)

Вміст %	Cys +	<i>L. glauca</i>	<i>L. sibirica</i>
поліфеноли	+	9,5±0,7*	18,3±0,19**
	-	16,9±0,9	17,6±0,91
флавоноїди	+	0,07±0,009	6,63±0,50***
	-	0,08±0,008	0,18±0,02**

Відомо, що накопичення фенолів у тканинах рослин відбувається за дії низки екстремальних зовнішніх факторів. Це дозволяє говорити про неспецифічні реакції відповіді рослин на їх вплив, що проявляється в підвищенні вмісту фенольних сполук та забезпечує стійкість рослин (Кушнір, 2005; Половникова и Воскресенская, 2008).

Щодо флавоноїдів в системі *in vitro* показано, що вони є більш потужними антиоксидантами, ніж вітаміни С і Е (Птицын, 2007), тому, на основі порівняльного аналізу кількісного вмісту флавоноїдів, можна припустити, що *L. sibirica* володіє більш високим адаптивним потенціалом. Це узгоджується із візуальними спостереженнями за станом експлантів, культивованих без цистеїну. Зокрема, з'ясовано, що окислення тканин експлантів даного виду в стресових умовах відбувається пізніше у середньому на десять днів.

Оскільки окислення фенольних сполук напряму пов'язане з функціонуванням поліфенолоксидази, наступним етапом наших досліджень був аналіз її кількісних та якісних показників. Так, при вирощуванні експлантів

обох досліджуваних видів за відсутності у поживному середовищі антиоксиданту, їх поліфенолоксидазна активність відрізняється майже у 20 разів із переважанням у *L. sibirica*. Додавання цистеїну в середовище росту призводить до суттєвих змін, наслідком яких є майже стовідсоткове вирівнювання кількісних показників: за рахунок різкого зростання значень у *L. glauca* і зниження у 2,5 рази в *L. sibirica* (рис.1). Одним із субстратів поліфенолоксидази є поліфеноли. Ймовірно, що саме через низьку поліфенолоксидазну активність в експлантах *L. glauca* у стресових умовах спостерігається підвищення вмісту поліфенольних сполук. Висока ферментативна активність в експлантах іншого досліджуваного виду свідчить про активну, хоча й не достатню з огляду на кінцевий результат, участь поліфенолів у знешкодженні вільних радикалів. Можна припустити, що в експлантах *L. glauca* за відсутності в середовищі росту цистеїну, поліфеноли виступають прооксидантами, приймаючи участь в окисленні тканин, фактично призводячи до їх більшої уразливості. В той же час, для *L. sibirica* не виявлено помітних змін у кількості поліфенолів, однак поліфенолоксидазна активність за наявності цистеїну значно нижча.

Відомо, що у видів, які володіють підвищеною стійкістю до дії стресових чинників, поліфенолоксидаза присутня і у так званій «прихованій формі». Під впливом стресових факторів може відбуватися збільшення фонду вільних форм ферменту за рахунок їх виходу із зв'язаного стану. Крім цього, підвищення активності відбувається паралельно зі збільшенням ступеня техногенного навантаження на рослини (Половникова и Воскресенская, 2008).

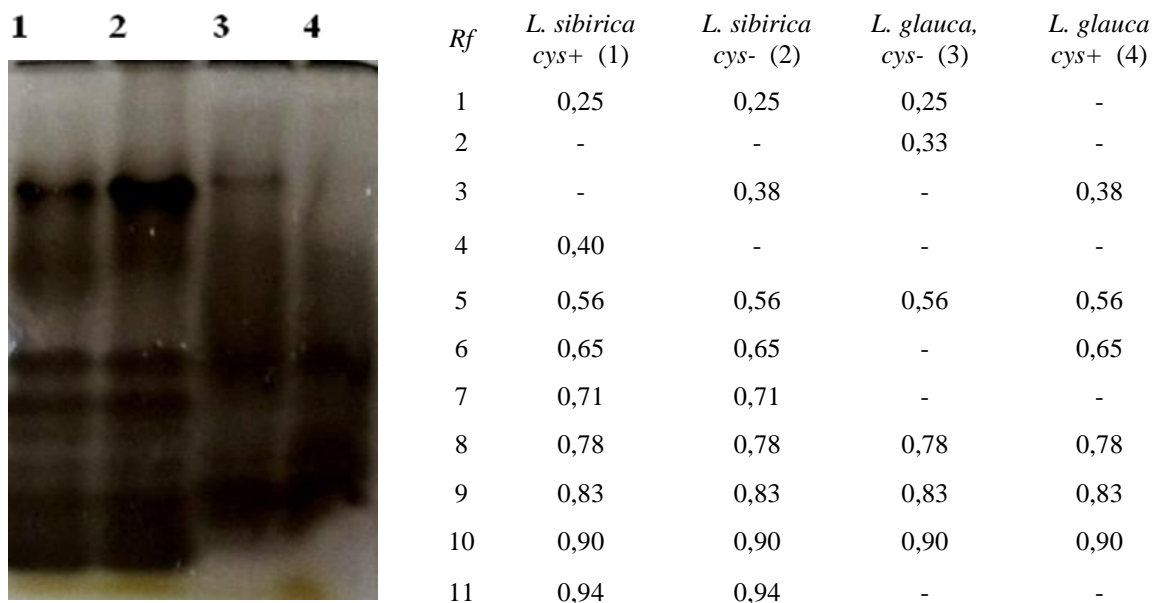


Рис. 2. Електрофоретичний розподіл поліфенолоксидази *L. glauca* і *L. sibirica* за наявності / відсутності екзогенного цистеїну в середовищі культивування

Fig. 2. The electrophoretic division of *L. glauca* and *L. sibirica* polyphenol oxidase in the presence / absence of the exogenous cysteine in the cultivating medium

Відомо також, що висока ферментативна активність призводить до посиленого виходу поліфенолів із місць депонування (Perro and Brumaghi, 2009). Відомо, що в стресових умовах, змінюється ізоферментний спектр клітинних ферментів, зокрема, з'являються нові ізоформи чи змінюється активність уже існуючих (Марченко та ін., 2008). З метою отримання відомостей щодо участі різних ізоформ поліфенолоксидази в захисті тканин експлантів від їх пошкодження внаслідок окислення, провели їх електрофоретичне розділення. Так, було встановлено, що поліфенолоксидаза *L. sibirica* представлена дев'ятьма компонентами з різною електрофоретичною рухливістю. Із них вісім присутні на електрофореграмі незалежно від умов вирощування (рис. 2). Відмінності якісного характеру стосуються тільки двох компонентів з Rf 0,38 та 0,40. Електрофоретичний спектр ізоформ поліфенолоксидази *L. glauca* представлений шістьма сполуками. З них стабільно виявляються чотири. На особливу увагу заслуговує компонент з Rf 0,25, оскільки за стресових умов росту він набуває мажорного забарвлення у *L. sibirica* і з'являється у *L. glauca*.

Отже, на підставі отриманих результатів можна стверджувати, що *L. sibirica* порівняно із *L. glauca* володіє значно вищим адаптивним потенціалом. За сприятливих умов культивування це виражається у значно вищому вмісті поліфенолів і флавоноїдів. Розвиток стресу в експлантах *L. glauca* супроводжується

суттєвим зниженням поліфенолоксидазної активності, у той же час як в експлантах *L. sibirica* вона істотно зростає. Ізоферментний спектр поліфенолоксидази в експлантах *L. sibirica* представлений більшим числом компонентів. Із них особливу роль в інтенсифікації процесів окислення тканин експлантів у стресових умовах відіграє сполука з Rf 0,2.

Список літератури:

1. Fand C. Characterization of polyphenol oxidase and antioxidants from pawpaw (*Asimina triloba*) Fruit / C. Fand // University of Kentucky Master's These. – 2007. – P. 603-620.
2. Mayer M. A. Polyphenol oxidases in plants end fungi: *Going places* a review / M. A. Mayer // *Phytochemistry*. – 2006. – Vol. 67. – P. 2318-2331.
3. Perro N. R. Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Bindin / N. R. Perro, J. L. Brumaghi // *Cell Biochem Biophys*. – 2009. – №53. – P. 75-100.
4. Rozzaque M. A. Purification end Characterization of polyphenoloxidase from *Guava infected* with Fruit-rot Disease / M. A. Rozzaque, Z. A. Saud, N. Absar, M. R. Karim // *Pakistan Soursnol of Biological Sciences*. – 2000. – №3. – P. 407-410.
5. Sae-Soon K. Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng / K. Sae-Soon, K. Woo-Yean // *S. Ginseng Res*. – 2013. – Vol.37, №1. – P. 117-123.
6. Thygesen P. W. Polyphenol oxidase in *Potato* / P. W. Thygesen, I. B. Dry, S. P. Robinson // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 109. – P. 525-531.

7. Zivcovic S. Pehydration – related chepges of peroxidase and polyphenol oxidase activity in fronds the resurrection fern *Asplenium ceterach* L. / S. Zivcovic, M. Popovic, S. Dregisic – Maksimovic, I. Momcilovic // *Acrh. Biol. Sci.* – 2010. – №62. – P. 1071-1081.
8. Алявина А.К. Локализация различных классов фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения / А. К. Алявина, Н. В. Загоскина // Сборник статей по матер. III Всерос. науч.-практической конференции. Биотехнология. – Волгоград, 2010. – 370 с.
9. Казначеева М. С. Дослідження кількісного вмісту активних форм кисню та антиоксидантів в тканинах цибулі ріпчастої, різних за рівнем стійкості до хвороб сортів / М. С. Казначеева // *Фізіологія рослин.* – 2011. – Вип. 13. – С. 202-205.
10. Карпин О. Антиоксидантна активність і вміст поліфенолів у рослинах *Carex hirta* L. та *Faba Vona Medic (Vicia Fabal)* за дії нафтового забруднення / [О. Карпин, О. Цвілинюк, О. Терек та ін.] // *Біологічні студії.* – 2009. – Т.3, №2. – С. 109-114.
11. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – Київ: Наукова думка, 2005. – 272 с.
12. Марченко М. М. Характеристика електрофоретичних спектрів естераз насіння *Saussurea discolor* (Willd.) DC. та *S. porcii* Degen. / М. М. Марченко, А. Є. Шелифіст, Л. М. Чебан // *Доповіді національної академії наук України.* – 2008. – №1. – С. 177-180.
13. Половникова М. Г. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды / М. Г. Половникова, О. Л. Воскресенская // *Физиология растений.* – 2008. – Т.55, №5. - С. 777-785.
14. Птицын А. В. Технология выделения флавоноидов винограда *Vitis vinifere* сорта «Изабелла» для косметики и изучение их свойств: дис. ... канд. хим. наук: 03.00.23 «Биотехнология» / Птицын Андрей Владимирович. – М., 2007. – 130 с.
15. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я. П. Дідуха. – К.: Гобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
16. Чечуй О. Ф. Вміст фенольних сполук в насінні *Glycine max* L. при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого впливом іонів кобальту та кадмію / О. Ф. Чечуй // *Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Сер. Біол.* – 2011. – Вип. 30. – С. 197-200.

THE CHARACTERISTIC OF THE FUNCTIONING OF THE SELECTED COMPONENTS OF PLANT ANTIOXIDANT SYSTEM IN *LIGULARIA GLAUCA* (L.) HOFFM. AND *L. SIBIRICA* (CASS.) TISSUES UNDER THE DIFFERENT GROWING CONDITIONS

A. E. Shelyfist, M. D. Dzvinchuk

The quantitative content of the amounts of polyphenols, flavonoids and polyphenol oxidase activity of Ligularia glauca (L.) J. Hoffm. and L. sibirica (Cass.) explants was observed by analyzing the functioning of the antioxidant protection system of plants. The plants were grown in the presence and absence of the exogenous cysteine in the growth medium. The research subjects were L. glauca i L. sibirica explants which were grown under in vitro conditions in the presence of 60 mg/l cysteine in medium and without it. The Murasihe-Skoog medium was the base for the preparation of the culture mediums. The content of the amounts of polyphenols and flavonoids was determined spectrophotometrically in terms of routine and chlorogenic acid accordingly. The electrophoretic studies of the polyphenol oxidase isoforms were performed in native conditions in the 5% concentrating and 12% sharing polyacrylamide gels. The tris-glycine buffer pH 8,3 was used as the electrode buffer. The gels were incubated in 0,1% L-DOPA in the sodium phosphate buffer pH 7,0 for the identification of enzyme. It is shown that L. glauca and L. sibirica explants are able to accumulate large enough number of the polyphenolic compounds. However, their content is twice lower in L. glauca raw in the presence of in the growth medium. In L. sibirica explants the flavonoids content is more than twice predominated by such a different species. This difference increases significantly under their cultivating condition in the presence of exogenous cysteine. The polyphenol oxidase activity of explants depends also on the cultivating peculiarities. The minimum enzyme activity is set for L. glauca explants, which were grown with the absence of exogenous cysteine in the culture medium. The activity values for both explored types are different almost in 20 times. It is shown, that the isozyme spectrum of L. sibirica polyphenol oxidase consists of ten components, while L. glauca of six. It was discovered his dependence on the cultivating conditions. Thus, L. sibirica consistently shows nine components, while L. glauca electrophoretogram – four. The component with Rf becomes majeure colour under stressful growth conditions in L. sibirica and appears in L. glauca. Now we can talk about higher adaptive capacity of L. sibirica based on the qualitative and quantitative analysis of components of the enzymatic and nonenzymatic part of the antioxidant L. glauca and L. sibirica protection system.

Keywords: *Ligularia glauca*, *Ligularia sibirica*, polyphenol oxidase, polyphenols, flavonoids, cysteine, in vitro, electrophoresis, explant.

Одержано редколегією 23.12.2013