

АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ В ЛИСТКАХ РОСЛИН ТОМАТА ЗА ДІЇ БІОЛОГІЧНИХ І ХІМІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Коломієць Ю.В., кандидат біол. наук, доцент,
Григорюк І.П., доктор біол. наук, професор,
член-кореспондент НАН України,

Національний університет біоресурсів та природокористування України,
Буценко Л.М., кандидат біологічних наук, доцент,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

*За обробки рослин томата сорту Чайка хімічними препаратами з діючими речовинами фосфіт алюмінію, 570 г/л + фосфориста кислота, 80 г/л та манкоцебом в концентрації 640 г/кг максимальне підвищення активності пероксидази в листках рослин відбувалось на 12 год. За умов застосування біопрепаратів на основі живих клітин *Bacillus subtilis* і *Azotobacter chroococcum* її активність була максимальною на 24 год. й коливалась в межах 77,7 – 112, 7 од.мг⁻¹•с⁻¹.*

Ключові слова: томат, пероксидаза, біопрепарати, пестициди.

Вступ. Препарати хімічного, біологічного і природного походження зумовлюють системну індуковану стійкість проти фітопатогенів шляхом стимулювання захисних реакцій рослинного організму [1]. Вони активують комплексну мережу сигнальних шляхів, які включають регуляторні молекули-месенджери (саліцилову і жасмонову кислоти та їх похідні, індоліл-3-оцтову кислоту, пероксид водню, окис азоту та інші сполуки), в результаті чого відбувається синтез *de novo* PR-білків, пов'язаних з патогенезом (*pathogenesis-related proteins*, PR). PR-білки реалізують різні механізми захисту клітин, найбільш раннім з яких є інтенсивне утворення активних форм кисню (АФК) [2, 3].

Під контролем АФК знаходяться реакції надчутливості і апоптозу, завдяки яким за умов патогенезу навколо збудника формується зона із мертвих рослинних клітин, які насичені антимікробними сполуками. АФК і продукти окиснювальної

© Коломієць Ю.В., Григорюк І.П., Буценко Л.М., 2016

модифікації біомолекул, що утворюються під їх впливом, виступають у ролі вторинних месенджерів за трансдукції сигналу для активації експресії захисних генів [4]. Утворені АФК впливають на метаболічні процеси рослин і фітопатогенів. Однак у стійких рослин окиснювальні процеси компенсуються за рахунок більшого вмісту антиоксидантів.

З відкриттям сигнальної і захисної ролі АФК особлива увага надається оксидоредуктазам, що регулюють їх рівень в клітині. Серед них особливий інтерес представляють пероксидази, активність яких корелює з розвитком стійкості рослин проти біо- та абіотичних стресів [5, 6]. Активація ферменту найважливіша ланка сигнальної системи, функція якої є передача і множення елісаторного сигналу, що завершуються експресією захисних генів й біосинтезам білків, які визначають відповідь рослини на інфікування та вплив елісаторів. Будучи конституційно необхідною, пероксидаза (як поліфункціональний фермент), бере участь в окисно-відновних реакціях фотосинтезу, процесах дихання, метаболізмі білків і регулюванні ростових процесів рослини, що дозволяє їй оперативно реагувати на інфікування фітопатогенами. Її субстратами слугують фітогормони (абсцизова і гіберелова кислоти, ауксини), які спричиняють регуляцію складу фізіологічно активних речовин в тканинах рослин [7]. Пероксидаза утилізує АФК у реакціях полімеризації фенольних сполук з утворенням лігніну. Безпосередню участь в синтезі лігніну, що обмежує надходження поживних речовин до патогена в зоні його проникнення в тканини рослини, беруть аніонні пероксидази [8].

Мета досліджень. Визначення активності окисно-відновного ферменту пероксидази в листках рослин томата за обробки хімічними і біологічними препаратами.

Методика досліджень. Для проведення досліджень нами взятий томат сорту Чайка, який за нашими даними в культурі *in vitro* проявляв стійкість проти збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та чорної бактеріальної плямистості [9]. Рослини томата сорту Чайка вирощували в умовах науково-дослідного поля «Плодоовочевий сад» Національного університету біоресурсів і природокористування України. Використовували хімічні засоби захисту рослин з діючими речовинами, зокрема Фітал (алюмінію фосфіт, 570 г/л + фосфориста кислота, 80 г/л); Метаксил (металаксил, 80 г/кг + манкоцеб, 640 г/кг) та Купроксат (сульфат міді триосновний, 345 г/л). Біопрепарати застосовували в концентраціях, які

рекомендовано виробником, зокрема Фітохелп, який містить концентровану суміш природних бактерій *Bacillus subtilis* (4×10^9 КУО/см³), мікро- і макроелементи, біологічно активні продукти життєдіяльності мікроорганізмів (БТУ-центр, Україна) [10], Фітоцид – живі клітини і спори природної ендоспорової бактерії *Bacillus subtilis* ($1 \times 10^9 - 4 \times 10^9$ КУО/см³) їх активні метаболіти (БТУ-центр, Україна) [10], Азотофіт – клітини природної азотфіксуючої бактерії *Azotobacter chroococcum* (1×10^9 КУО/см³), макро- та мікроелементи, БАП життєдіяльності бактерій (БТУ-центр, Україна) [10].

Активність ферменту пероксидази в листках рослин томата вимірювали спектрофотометричним методом за оптичною густиною продуктів реакції, які утворюються шляхом окиснення бензидину щосекундно протягом 120 с. за довжини хвилі 590 нм. до обробки, через 1, 6, 12 та 24 год. після обприскування рослин препаратами. Наважку тканин масою 200 – 300 мг розтирали в холодній фарфоровій ступці холодним товкачиком в 2 мл ацетатного буфера (рН 4,7; 5,0; 5,5). Отриманий гомогенат центрифугувати 5 хв за 12 000 г. Для зберігання проби ставили в холодильник за температури 4 °С. Реакційна суміш містила 150 мкл 0,2 М Na-ацетатного буфера (рН 4,7; 5,0; 5,5), 150 мкл 0,01 % розчину солянокислого бензидину 50 мкл екстракту, 200 мкл 0,3 % перекису водню та 200 мкл дистильованої води. Контрольна кювета містила 150 мкл 0,2 М Na-ацетатного буфера (рН 4,7; 5,0; 5,5), 200 мкл 0,01 % розчину солянокислого бензидину, 50 мкл екстракту та 400 мкл дистильованої води [11].

Розрахунок активності ферменту пероксидази розраховували за формулою [11]:

$$A = \frac{E(a \cdot v)}{c \cdot t}$$

де E – екстинкція = 0,125; a – відношення кількості рідини, яку взято для приготування витяжки, см³/мг; v – ступінь постійного розведення витяжки в реакційній суміші; c – товщина шару, см; t – час, с.

Результати досліджень. У листках рослин томата сорту Чайка нами визначено оптимальні значення активності слабозв'язаних з клітинною стінкою пероксидаз. Зокрема, відбувалось зміщення оптимуму рН для пероксидази, що пов'язано з перевагою синтезу форм ферменту за умов обробки хімічними і біологічними препаратами (рис.). Визначено, що для рослин, які оброблено біопрепаратами, характерні більш високі значення активності

пероксидази 51,4 – 112,5 од.мг⁻¹•с⁻¹ за рН=4,7 і рН=5,5, що свідчить щодо індукції синтезу аніонних і катіонно-аніонних її форм. Виявлено два піки активності у листках рослин томата за дії біопрепаратів Фітоциду та Фітохелпу на основі живих клітин природних бактерій *Bacillus subtilis*. Оптимальні значення активності пероксидаз для листків рослин за обробки хімічними препаратами були характерні за рН=4,7, що супроводжувалось посиленою генерацією аніонних пероксидаз. Так, зміна активності молекулярних форм пероксидаз, ймовірно, забезпечує стійкість рослин проти комплексу чинників зовнішнього середовища.

Для аналізу інтенсивності синтезу АФК, який спричинений хімічними і біологічними препаратами, й вивчення адаптаційних властивостей рослин томата сорту Чайка досліджували добову динаміку активності пероксидази (табл.). У процесі експерименту з'ясовано, що протягом доби активність пероксидази в листках рослин залишалася на початковому рівні – 15,0 – 15,6 од.мг⁻¹•с⁻¹.

Активність пероксидази у листках рослин томата, які оброблені хімічними препаратами Фітал і Метаксил, була максимальною на 12 год., тоді як на 24 год. відбувалось її зниження на 41,0 – 78,2 %. У цілому вплив пестицидів зводиться до різнобічної дії на обмін речовин в рослинах. Вони змінюють проникність клітинної мембрани, інтенсивність фотосинтезу, дихання і активність пов'язаних з ними окиснювально-відновних ферментів. Інтенсивність й спрямованість цих процесів залежить від природи, норм, термінів і форм застосування препарату та умов середовища [8].

У відповідь на обробку біопрепаратами нами визначено поступове підвищення активності пероксидази на 1, 6, 12 та 24 год. У листках рослин, оброблених *Bacillus subtilis*, активність ферменту збільшувалася і була максимальною на 24 год. 94,7 – 112, 7 од.мг⁻¹•с⁻¹. За даними [12], ендofітні бактерії *Bacillus subtilis* захищають рослини від патогенів, продукують фізіологічно активні речовини і формують системну індуковану стійкість. За обробки Азотофітом, на основі *Azotobacter chroococum*, активність пероксидази підвищувалася до 77,7 од.мг⁻¹•с⁻¹. Біопрепарати Азотофіт і Фітохелп проявляли високу антибактеріальну активність до збудників бактеріального раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* та чорної бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria* [13]. Таким чином, більш висока тенденція активності пероксидази у листках рослин, які оброблені біопрепаратами на основі живих клітин *Bacillus subtilis* та *Azotobacter*

chroococum, підтверджує підвищення активності неспецифічних захисних реакцій.

Висновки. За обробки рослин томата сорту Чайка хімічними і біологічними препаратами визначено підвищення активності пероксидази, яка коливалась залежно від діючої речовини препарату. Досліджувані препарати з діючими речовинами фосфіт алюмінію, 570 г/л + фосфориста кислота, 80 г/л і манкоцебом в концентрації 640 г/кг зумовлювали максимальне підвищення активності пероксидази в листках рослин на 12 год., яка становила 111,5 – 112,5 од.мг⁻¹•с⁻¹, тоді як на 24 год. її зниження на 41,0 – 78,2 %. За умов застосування біопрепаратів на основі живих клітин *Bacillus subtilis* і *Azotobacter chroococum* активність пероксидази була максимальною на 24 год. і коливалась у межах 77,7 – 112, 7 од.мг⁻¹•с⁻¹. Підвищення активності пероксидази в листках під дією хімічних і біологічних препаратів підтверджує ефективність їхнього використання для активації процесів росту та імунітету рослин томата.

Бібліографія

1. Сергієнко В. Г. Вплив біологічних препаратів на активність окисно-відновних ферментів рослин томатів / В. Г. Сергієнко, О. Д. Чергіна // Захист і карантин рослин. – 2011. – Вип. 57. – С. 179 – 187.
2. Карпун Н. Н. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе / Н. Н. Карпун, Э. Б. Янушевская, Е. В. Михайлова // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 540 – 549.
3. Neil M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences / M. Neil, R. M. Bostock // Annals of Botany. – 2002. – Vol. 89 (5). – P. 503 – 512.
4. Гарифзянов А. Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений / А. Р. Гарифзянов, Н. Н. Жуков, В. В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 2. – Режим доступа к журн. : <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4600>.
5. Активные формы кислорода как система : значение в физиологии, патологии и естественном старении / В. И. Донцов, В. Н. Крутько, Б. М. Мрикаев, С. В. Уханов // Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С. 50 – 69.

6. Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants / S. Bhattacharjee // *Curr. Sci.* – 2005. – Vol. 89. – P. 1113–1121.

7. Поликсенова В. Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам / В. Д. Поликсенова // *Вестник БГУ.* – 2009. – № 1. – С. 48 – 60.

8. Механизмы индукции резистентности растений к фитопатогенам гуминовыми веществами / С. Н. Удинцев, Т. И. Бурмистрова, А. В. Заболотская, Т. П. Жиликова // *Вестник Томского государственного университета. Биология.* – 2011. – № 4 (16). – С. 100 – 107.

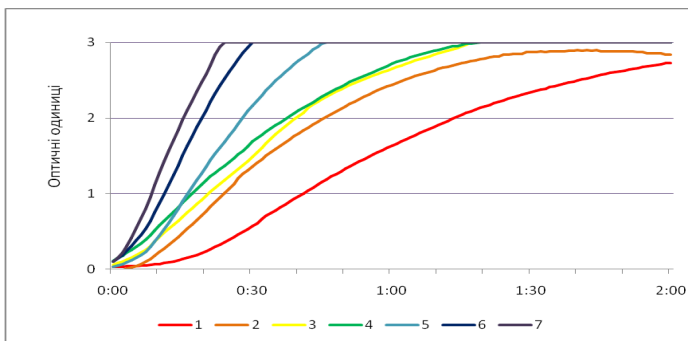
9. Коломієць Ю. В. Застосування методу клітинної селекції для оцінки якості і стійкості сортів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) проти збудників бактеріальних хвороб / Ю. В. Коломієць, І. П. Григорюк, Л. М. Буценко // *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин.* – 2015. – № 3–4 (28–29). – С. 33 – 37.

10. Каталог продукції компанії «БТУ-Центр». – К. : Торговий дім «БТУ-Центр», 2016. – 60 с.

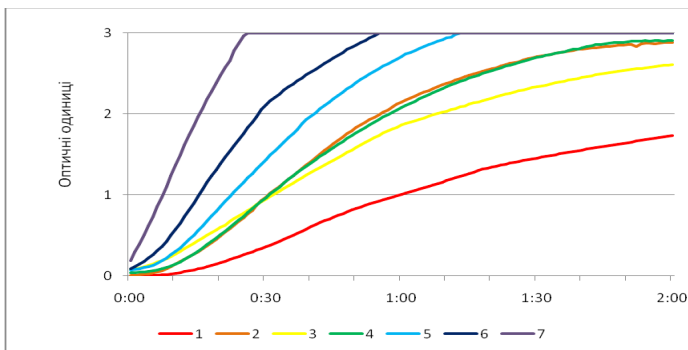
11. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений / Х. Н. Починок. – К. : Наук. думка, 1976. – 333 с.

12. Влияние бактерий рода *Bacillus* на возбудителя бактериального рака томатов / А. А. Рой, Л. А. Пасичник, Л. С. Церковняк, С. Ф. Ходос, И. К. Курдиш // *Мікробіол. журн.* – 2012. – 74, №5. – С. 74 – 80.

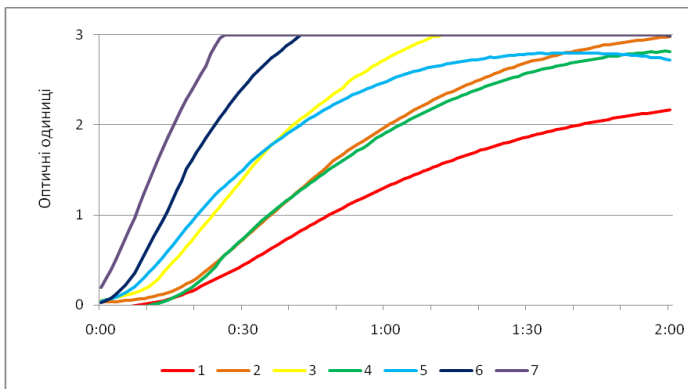
13. Коломієць Ю. В. Вплив мікробних препаратів на збудників бактеріальних хвороб томатів / Ю. В. Коломієць, І. П. Григорюк, Л. М. Буценко // *Овочівництво і баштанництво : історичні аспекти, сучасний стан, проблеми і перспективи розвитку : II Міжнародна наук.-практ. конф., 21 – 22 березня 2016 р. : матеріали.* – Ніжин, 2016. – Т. 2. – С. 156 – 160.



А (рН 4,7)



Б (рН 5,0)



В (рН 5,5)

Рис. Вплив рН ацетатного буфера на активність аніонних пероксидаз в листках рослин томата сорту Чайка за обробки препаратами: 1 – контроль, 2 – Фітал, 3 – Купроксат, 4 – Метаксил, 5 – Азотофіт, 6 – Фітохелп, 7 – Фітоцид.

Зміни активності ферменту пероксидази (од.мг⁻¹•с⁻¹)
у листках рослин томата сорту Чайка за обробки препаратами

Препарат	До обробки	1 год.	6 год.	12 год.	24 год.
Контроль	15,0±0,04	15,4±0,04	15,0±0,02	15,6±0,03	15,4±0,04
Фітал	16,3±0,02	27,7±0,06	55,5±0,03	112,5±0,02	24,5±0,02
Купроксат	19,3±0,05	36,0±0,02	7,62±0,02	31,5±0,05	13,5±0,06
Метаксил	14,3±0,03	67,5±0,03	81,1±0,05	111,5±0,03	65,8±0,06
Азотофіт	18,2±0,02	30,7±0,05	43,0±0,04	54,5±0,04	77,7±0,04
Фітохелп	16,2±0,02	24,0±0,04	32,6±0,02	41,5±0,02	94,7±0,03
Фітоцид	17,6±0,04	23,2±0,02	23,2±0,02	80,5±0,04	112,7±0,03

Коломиец Ю.В., Григорюк И.А., Буценко Л.Н.

Активность пероксидазы в растениях томата при действии биологических и химических препаратов.

Резюме. При обработке растений томата сорта Чайка химическими препаратами с действующими веществами фосфит алюминия, 570 г/л + фосфористая кислота, 80 г/л и манкоцеб в концентрации 640 г/кг максимальное значение активности пероксидазы в листьях растений было через 12 часов. При применении биопрепаратов на основе живых клеток *Bacillus subtilis* и *Azotobacter chroococcum* ее активность была максимальной через 24 часа и колебалась в пределах 77,7 – 112,7 од.мг⁻¹•с⁻¹.

Kolomiets Yu.V., Grygoryuk I.A., Butsenko L.N.

Effect of biological and chemical preparations on activity of peroxidase in tomato plants.

Summary. It was establish that treatment of tomato plants of sorts Chayka of chemical preparations with active ingredients alumina phosphite, 570 g/l of phosphorous acid + 80 g/l and mancozeb in a concentration of 640 g/kg maximum peroxidase activity in plants leaves was over 12 hours. In the application of biological products on the basis of living cells *Bacillus subtilis* and *Azotobacter chroococcum* peroxidase activity was maximal at 24 hours and ranged from 77,7 – 112,7 ed.mg⁻¹•s⁻¹.