

УДК 632.954:633.15
© 2013

Г.С. РОССИХІНА-ГАЛИЧА,
здобувач

**Ю.В. ЛИХОЛАТ,
Ю.І. ГРИЦАН,**
доктори біологічних наук

**ПРООКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНА
РІВНОВАГА НАСІННЯ
ЯК ПОКАЗНИК РЕАКЦІЇ
КУКУРУДЗИ ОРЖИЦЯ 237МВ
НА ГЕРБІЦИДНИЙ ВПЛИВ**

*Дніпропетровський національний
університет імені Олеся Гончара–
Дніпропетровський державний
аграрний університет*

Встановлено, що за дії гербіцидів у насінні кукурудзи гібриду Оржиця 237МВ виявлено інтенсифікацію перебігу реакції окиснення ліпідів, функціонування СОД та пероксидази. Найменша негативна дія зафіксована у разі використання препаратів харнес, майСтер і аденго.

Для ефективної боротьби з бур'янами в сучасному сільському господарстві традиційно використовують гербіцидні препарати [7]. Однак відомо, що вони впливають на онтогенез культурних рослин [1], накопичуються у репродуктивних органах, призводять до погіршення врожаю та якості насіння [12], індукують оксидативний стрес, який проявляється в інтенсифікації пероксидного окиснення ліпідів [10, 11]. Підтримка окисно-відновного гомеостазу рослинних організмів за дії чинників навколишнього середовища, у тому числі гербіцидів, забезпечується антиоксидантною системою захисту. До неї входять ферменти супероксиддисмутази (СОД), каталаза, пероксидаза, які характеризуються високою специфічністю дії до певних форм кисню [3, 13].

Мета дослідження: за показниками прооксидантно-антиоксидантної рівноваги достигаючого і стиглого зерна кукурудзи вивчити особливості накопичення прооксидантів і функціонування антиоксидантів за дії гербіцидів, які найчастіше використовуються під час вирощування цієї культури.

Методика досліджень. Об'єктом дослідження було достигаюче та стигле насіння кукурудзи – *Zea mays L.* (середньоранній гібрид Оржиця 237МВ), зібране в агроценозах, оброблених гербіцидами у таких

дозах: аденго – 0,5 л/га; стелар – 1,25 л/га; харнес – 2,5 л/га; діален С – 2,5 л/га; майСтер – 1,25 л/га; пропоніт – 2 л/га. За контрольне вважали насіння кукурудзи, зібране на ділянках без гербіцидної обробки, з ручним виконанням бур'янів. Ґрунтовий покрив – звичайні середньосуглинкові чорноземи, з умістом гумусу 4–5 %. З усереднених зразків зерна п'яти ділянок отримували екстракти, які центрифугували 20 хв при 16000 об./хв, після чого в супернатантах визначали показники з використанням фотоелектроколориметра КФК-2МП та мікробюретки.

У стиглому зерні визначали активність супероксиддисмутази (СОД) за рівнем гальмування процесу відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) в присутності НАДН і феназинметасульфату (ФМС) [9]. Реакційна суміш містила 1,2 мл 0,15 М Na-фосфатного буферу (рН 7,8), 0,1 мл 0,160 мМ ФМС, 0,3 мл 0,610 мМ НСТ, 0,3 мл супернатанту. Реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл 1 мМ НАДН і зупиняли 1мл льодяної оцтової кислоти.

Каталазну активність (КАТ; КФ 1.1.1.6) визначали титриметричним методом [11] з розчином перманганату калію після інкубування супернатанту протягом 30 хв при 25 °С з пероксидом водню і виражали в ммольах H_2O_2 /хв·г наважки.

Активність бензидин-пероксидази вста-

новлювали за швидкістю реакції окиснення бензидину [2]: у реакційну суміш, яка містила 0,2 мл супернатанту й 0,8 мл ацетатного буферу, додавали 1 мл 0,1М розчину бензидину. Зміни оптичної густини реєстрували при 470 нм, активність ферменту виражали в одиницях оптичної густини/хв•г сирової маси.

Концентрацію гідропероксидів ліпідів визначали за кольоровою реакцією з роданистим амонієм [5]. Реакційна суміш містила 1 мл супернатанту, етанолу, 5%-вий розчин солі Мора; реакцію запускали додаванням 20%-го роданистого амонію, зміни оптичної щільності реєстрували при довжині хвилі 480 нм, показники виражали в одиницях оптичної густини/хв•г сирової ваги.

Вміст ТБК-активних продуктів (ТБКАП) визначали за М.М. Мусієнком [8]. Реакційну суміш, що містила 2 мл супернатанту, 2 мл розчину 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК), інкубували 30 хв при 100 °С, охолоджували та вимірювали оптичну густину при 532 нм. Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали в нмоль/хв•г сирової маси.

Статистичну обробку результатів, отриманих у триразовій повторності, здійснено за допомогою пакету Microsoft Statistica 6.0. Розбіжності між вибірками вважали значущими при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Чутливим тестом на інтенсифікацію процесів окиснення, обумовлених дією гербіцидних препаратів, є виявлення вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ). Вони є порівняно нестійкими сполуками, які легко піддаються гемолітичному розпаду по RO–ОН зв'язку, у результаті чого утворюються різні кінцеві продукти ПОЛ, до яких відноситься, зокрема, малоновий діальдегід (ТБК-активні продукти) [5]. У наших дослідженнях вплив гербіцидів на інтенсивність накопичення гідропероксидів ліпідів у досягаючому зерні кукурудзи гібриду Оржиця 237МВ виявлено в умовах польового агроценозу вегетації 2011/2012 рр. (рисунок,а). Установлено, що у фазу формування в зерні дослідних варіантів кількість ГПЛ підвищена відносно контрольного зерна на 24 % за впливу сульфонілсечовини майСтру, на 27 % за дії хлорацетаніліду харнес і трикомпонентного досходового сис-

темного препарату аденго, на 38 % за впливу двокомпонентного гербіциду стелар та 40 % за системної дії препарату пропоніту і при поєднанні харнесу з діаленом С. Більш суттєва різниця між дослідом і контролем зареєстрована у фазу молочної стиглості, коли в зернівці активно перебігають синтетичні процеси. У стиглому зерні вміст гідропероксидів знижався, і різниця між дослідом та контролем була мінімальною.

Найчастіше ступінь ліпідної пероксидації в рослинах оцінюється за рівнем накопичення ТБК-активних продуктів. Посилене утворення ТБКАП є наслідком окиснення лінолевої та ліноленової кислот фосфоліпідів та галактоліпідів мембран. Ці сполуки здатні взаємодіяти із вільними аміногрупами білків, компонентами фосфоліпідів, ініціювати появу в мембранах етилену. Все разом це може призвести до змін властивостей як мембран у цілому, так і їх окремих компонентів, що позначиться на окисно-відновному гомеостазі організму [5].

У досягаючому зерні кукурудзи гібриду Оржиця 237МВ виявлено накопичення вмісту ТБК-активних продуктів (рисунок,б). У фазу формування насіння за дії усіх препаратів зафіксовано підвищений рівень даного продукту в 1,3 раза (внесення харнесу і аденго), в 1,2 раза (внесення майСтер), в 1,4 раза (стелар, пропоніт і бакова суміш харнес + діален С).

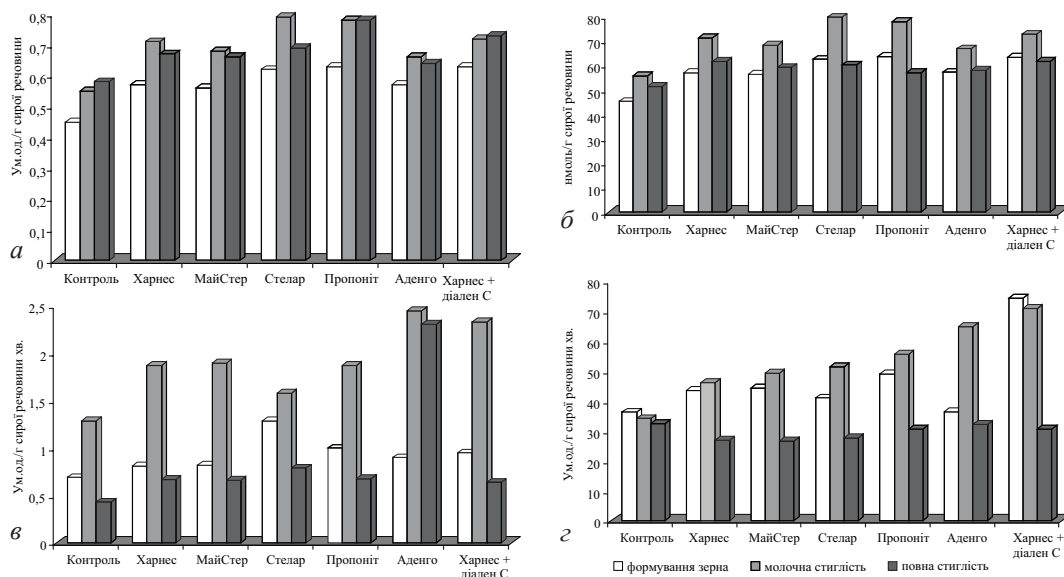
Максимальна різниця між дослідом і контролем відзначена на стадії молочної стиглості, коли в зернівці активно протікають синтетичні процеси. Кількість ТБКАП коливалась у цей період від 66,85 нмоль/г сирової речовини до 79,77 залежно від препарату проти контролю (55,75 нмоль/г сирової речовини). У фазу повної стиглості процеси окиснення мали затухаючий характер, що пов'язано із втратою вологи при переході зерна до покою.

Кореляційний аналіз показав тісну залежність між вмістом ТБК-активних продуктів і кількістю гідропероксидів ліпідів. Коефіцієнт кореляції в середньому становив $r = 0,89-0,97$.

Підтримку процесів ПОЛ на необхідному і одночасно безпечному для клітин рівні –

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

Проксидантно-антиоксидантна рівновага насіння як показник реакції кукурудзи Оржиця 237МВ на гербіцидний вплив



Вплив гербіцидних препаратів на вміст у зерні кукурудзи гібриду Оржиця 237МВ:
а – гідропероксидів ліпідів; б – ТБК-продуктів; в – СОД; г – пероксидази

життєво важлива умова їх нормального росту і функціонування, забезпечується багатокомпонентною антиоксидантною системою захисту [4, 6].

Достигаюче зерно кукурудзи гібриду Оржиця 237МВ характеризувалося коливанням динаміки активності СОД (рисунок, в). У фазу формування насіння за дії хлорацетанілідів харнес та сульфонілсечовини майСтру зафіксовано підвищення активності ферменту на 17–19 %, за дії трикомпонентного препарату аденго і бакової суміші харнес + діален С – на 31 і 38 % відповідно. Найвища активність супероксиддисмутази встановлена у варіанті дії двокомпонентного післясходового гербіциду стелару – 87 % та інгібітору біосинтезу білка та нуклеїнових кислот пропоніту – 45 %.

Коли у фазу молочної стиглості в зернівки активно відбуваються синтетичні процеси і попередніми дослідженнями виявлено накопичення ТБКАП, реєстрували зростання активності СОД. Обробка материнських рослин гербіцидами харнес і пропоніт стимулювала активність ферменту на 45 %, стелар і майСтр – на 22 і 47 %. У варіанті дії аденго і бакової суміші харнес+діален С – на 90 і 81 % відповідно.

У фазу повної стиглості спостерігалось зниження активності супероксиддисмутази, що було пов'язано зі затуханням процесів окиснення, обумовлених підготовкою насіння до глибокого спокою.

Коефіцієнт кореляції між вмістом ТБКАП та активністю СОД коливався від +0,92 до +0,98 ($p < 0,05$).

Зазначимо, що при цьому достовірних змін активності ферменту – каталази, який знешкоджує пероксид водню, зафіксовано не було. Ймовірно в даному випадку цей ензим не бере участі в захисті тканин від оксидативного стресу, спричиненого дією гербіцидів. Таку функцію виконує бензидин-пероксидаза (рисунок, г). Наприклад, у фазу формування насіння за дії всіх препаратів зафіксовано підвищення активності ферменту: у варіантах внесення хлорорганічного препарату харнесу і сульфонілсечовини майСтру на 20–22 %; за дії двокомпонентного хімікату стелару й інгібітору білкового обміну пропоніту – на 13 і 35 % відповідно. Найвища активність пероксидази (на 105 %) встановлена у варіанті дії бакової суміші харнес+діален С. Виняток становили зразки з ділянки, обробленої трикомпонентним гербіцидом системної дії аденго, в яких достовірної різниці з контролем не встановлено.

У фазу молочної стиглості, коли в зернівці активно протікають синтетичні процеси, як і в попередніх дослідженнях, накопичуються ТБКАП і зростає активність СОД, зафіксовано збільшення активності пероксидази. Обробка материнських рослин гербіцидами харнес і майстер стимулювала активність ферменту на 35 і 44 %, стелар і пропоніт – на 51 і 62 %. Максимальні значення пероксидазної активності фіксували у варіанті аденго і

бакової суміші харнес+діален С (на 89 і 107 % відповідно).

Зниження активності пероксидази відмічали у фазу повної стиглості, що було пов'язано зі затуханням процесів окиснення, обумовлених підготовкою насінин до глибокого спокою. Коефіцієнт кореляції між вмістом ТБКАП та активністю пероксидази коливався від +0,85 до +0,89 ($p < 0,05$).

Висновки

1. У досягаючому насінні кукурудзи, обробленої гербіцидами, виявлено інтенсифікацію перебігу реакції окиснення ліпідів та функціонування компонентів антиоксидантного захисту (СОД, пероксидази), вираженість якої залежала від виду застосованого гербіциду. Встановлено, що найменша негативна дія спричинена гербіцидами харнес, майстер і аденго.

2. Уповільнення накопичення продуктів пероксидації, відзначене у стиглому насінні,

пов'язано з високою активністю супероксиддисмутази, стабільним функціонуванням каталази та пероксидази.

3. За дії гербіцидів у насінні рослин кукурудзи гібриду Оржиця 237МВ у процесі досягання підвищена здатність до належної активації досліджених ферментних захисних систем та їх функціонування на рівні, який забезпечив би відновлення і підтримку гомеостазу.

Бібліографія

1. Адаптогенез растений к пестицидам / [Рябенко Н.А., Коцюбинская Н.П., Домашнева Е.В. и др.] – Днепропетровск : Пороги, 2000. – 193 с.
2. Бояркин А.Н. Колориметрическое определение активности пероксидазы / А.Н. Бояркин // Биохимия. – 1961. – Т. 16, № 2. – С. 252–254.
3. Обработка гербицидом Гранстар вызывает окислительный стресс в листьях злаковых / А.Н. Гарькова, М.М. Русаева, О.В. Нуштаева [и др.] // Физиология растений. – 2011. – 58, № 6. – С. 930–943.
4. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях / [Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др.] – К. : Наукова думка, 2003. – 270 с.
5. Курганова Л.Н. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке / Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А. // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 5. – С. 725–730.
6. Лукаткин А.С. Влияние экзогенных модификаторов перекисного окисления липидов на холодовое повреждение листьев огурца / А.С. Лукаткин, Т.Е. Левина // Физиология растений. – 1997. – 44, № 3. – С. 397–403.
7. Мордерер Е.Ю. Избирательная фитотоксичность гербицидов / Е.Ю. Мордерер. – К. : Логос, 2001. – 240 с.
8. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 200 с.
9. Переслегина І.А. Активність антиоксидантних ферментів слюни здорових дітей / І.А. Переслегина // Лабораторное дело. – 1989. – № 11. – С. 20–23.
10. Россихина Г.С. Вплив гербіцидної обробки на ліпопероксидацію і системи її регулювання в зерні кукурудзи / Г.С. Россихина, О.М. Вінниченко // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2004. – Вип. 37. – С. 227–231. – (Серія: Біологічна).
11. Россихина Г.С. Стан антиоксидантної ферментативної системи рослин кукурудзи за дії ґрунтових гербіцидів / Г.С. Россихина // Вісник Львів. ун-ту. – 2010. – Вип. 53. – С. 188–198. – (Серія: Біологічна).
12. Хромих Н.О. Вплив гербіцидів нового покоління на фізіолого-біохімічні показники насіння кукурудзи / Н.О. Хромих, Г.С. Россихина, В.В. Лашко // Вісник ХНАУ. – 2011. – Вип. 3. – С. 50–55. – (Серія: Біологія).
13. Jung S. Expression Level of Specific Isozymes of Maize Catalase Mutants Influences Other Antioxidants on Norflurazon-Induced Oxidative Stress / S. Jung // Pest. Biochem. Physiol. – 2003. – Vol. 75. – P. 9–17.

Рецензент – доктор біологічних наук, професор І.Х. Узбек