



УДК 577.171.55

Т. А. Калачова, О. М. Яковенко, О. М. Бондаренко, В. С. Кравець

Регуляція рівня фенольних антиоксидантів у тканинах сої при дії саліцилової кислоти

(Представлено членом-кореспондентом НАН України А. І. Вовком)

*Досліджено регуляцію рівня фенольних сполук та динаміку відновної активності тканин сої (*Glycine max*) при дії саліцилової кислоти. Встановлено, що обробка саліциловою кислотою спричиняє зростання загальної відновної активності фотосинтетичних тканин та підвищення рівня загальних фенолів, α - і γ -токоферолів та флавоноїдів. Отримані результати вказують на перспективність використання саліцилової кислоти як індуктора нагромадження вторинних метаболітів з антиоксидантним потенціалом, що може підвищувати цінність продуктів з сої як природного джерела біологічно активних речовин.*

Швидкі темпи виробництва сої в Україні та світі зумовлені її особливостями порівняно з іншими сільськогосподарськими культурами. Головними з них є багатий і різноманітний хімічний склад насіння й вегетативної маси, висока поживна цінність продукції та можливість універсального використання в харчових, кормових і технічних галузях, зокрема як джерело біологічно активних речовин. З огляду на це актуальними є дослідження шляхів нагромадження фенольних антиоксидантів та їх метаболізму в тканинах рослин сої. Серед антиоксидантів фенольної природи особливу увагу привертають флавоноїди та токоферолі [1]. Розуміння ролі флавоноїдів у процесах адаптації рослин до стресових чинників набуває розвитку разом із визначенням механізмів регуляції вмісту та складу флавоноїдів, що продукуються рослинами у відповідь на сигнали середовища [2]. Концентрація флавоноїдів у насінні сої становить у середньому 72% вмісту загальних фенолів і змінюється залежно від генотипу та впливу зовнішніх факторів [3]. Ведеться активне обговорення механізмів взаємозв'язку синтезу і депонування специфічних флавоноїдів та змін вмісту і напрямів транспорту фітогормонів.

На сьогодні створюються сорти сої з підвищеним вмістом флавоноїдів, що забезпечується активацією їх синтезу у відповідь на дію стресових факторів. Біосинтез флавоноїдів в клітинах рослин відбувається фенілпропановим шляхом з депонуванням готових продуктів у цитоплазмі [4]. Ключові ферменти біосинтезу флавоноїдів — халконсинтаза, ізо-

© Т. А. Калачова, О. М. Яковенко, О. М. Бондаренко, В. С. Кравець, 2013

флавоносинтаза та флавонон-3-гідроксилаза — також задіяні у формуванні стійкості до бактеріальних та вірусних інфекцій [5]. Перекривання біосинтетичних шляхів флавоноїдів (сполук з антиоксидантними властивостями) та саліцилової кислоти (прооксидантного біорегулятора і медіатора резистентності) може бути основою для конструювання нових рослин з підвищеним вмістом антиоксидантів за умов біотичного стресу [6].

Мета нашого дослідження полягала у визначенні впливу саліцилової кислоти на рівень фенольних сполук як складової антиоксидантної системи тканин рослин, відповідальної за пролонговані адаптивні реакції. Для цього було досліджено регуляцію рівня фенольних сполук, зокрема флавоноїдів та токоферолів у тканинах сої *Glycine max* сорту Ворскла при дії саліцилової кислоти.

Визначення загального вмісту фенольних сполук у тканинах сої проводили на 1-у й 7-у добу після обробки сої на стадії трьох справжніх листків саліциловою кислотою (1 ммоль/л). Перед вимірюванням поверхню листкових пластинок відмивали у дистильованій воді. Наважку 20 мг розтирали в 2 мл 80% метанолу та екстрагували 48 год при 20 °С. До 0,25 мл екстракту додавали 1,25 мл дистильованої води та 75 мкл 5% розчину NaNO_2 . Далі після 6 хв додавали 150 мкл 10% розчину $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, а через 5 хв вносили 0,5 мл розчину 1 моль/л NaOH та розмішували. Загальний вміст флавоноїдів визначали за допомогою спектрофотометричного аналізу. Вимірювали екстинкцію при довжині хвилі 510 нм. Результати перераховували в еквіваленті кверцетину (мг QE/г зразка) [7]. Визначення загального вмісту фенолів проводили з додаванням реактиву Фоліна-Чіолкалтеу [8]. Загальну відновну активність вимірювали в реакції з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом [9]. Для визначення вмісту токоферолів рослинний матеріал гомогенізували в 3 мл суміші метанол : хлороформ (об'ємне співвідношення 2 : 1) з додаванням іонолу 0,01%. Після 20 хв інкубації додавали 1 мл хлороформу і 1,8 мл води, перемішували та центрифугували. Нижню фазу висушували під током азоту та розчиняли у 150 мкл суміші дихлорометан : метанол (об'ємне співвідношення 1 : 5). Розділення токоферолів та їх визначення проводили за допомогою хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973 inert 1100 у колонці C18 3 мкм $2,1 \times 100$ мм у системі розчинників метанол : вода (об'ємне співвідношення 95 : 5). Вміст вимірювали відповідно до стандартів α - і γ -токоферолів (Sigma-Aldrich) [10].

Отримані експериментальні дані демонстрували зростання загального вмісту фенолів на ~30% через 1 добу після дії фітогормону, а через 7 діб після введення саліцилової кислоти підвищення становило вже 50%. Водночас дія саліцилової кислоти спричиняла підвищення вмісту флавоноїдів на 25% у порівнянні з контролем (табл. 1). Ці дані свідчать про активацію біосинтетичних процесів, спрямованих на знешкодження окисного стресу та запобігання стрес-індукованим порушенням біомолекул. Імовірно, саме таким чином обробка саліциловою кислотою рослин аспарагусу (*Asparagus officinalis* L.) після збору врожаю істотно затримувала деградацію при зберіганні, запобігаючи руйнуванню хлорофілу та підтримуючи вміст фенолів і відновну активність тканин на рівні контролю та відповідно збільшуючи

Таблиця 1. Загальний вміст фенольних сполук та флавоноїдів у фотосинтетичних тканинах сої на 1-у та 7-у добу після екзогенної дії саліцилової кислоти (1 ммоль)

Показник, мкг/г сирової ваги	Контроль	1 доба	7 доба
Загальні феноли	61 ± 9	85 ± 5	100 ± 4
Флавоноїди	8,8 ± 0,2	9,7 ± 0,1	11,7 ± 0,2

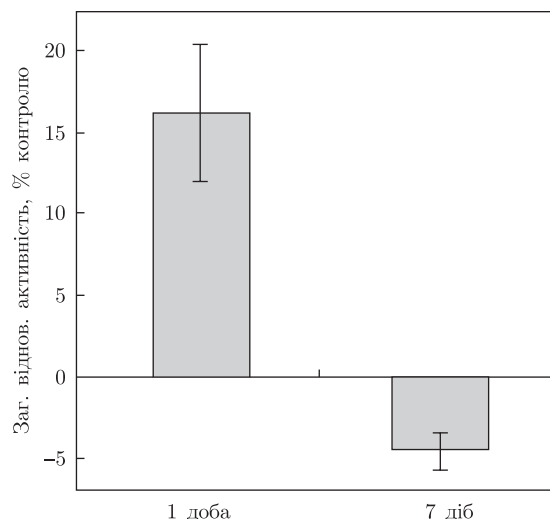


Рис. 1. Показник змін загальної відновної активності тканин сої через 1-у добу та 7 дб після екзогенної дії саліцилової кислоти (1 ммоль/л)

вміст флавоноїдів [11]. На культурі клітин кореневих волосків *Pueraria candollei* також було показано індукцію депонування флавоноїдів при дії елісаторів (метилжасмонату, хітозану, суспензії агробактерій, екстракту дріжджів та саліцилової кислоти). Цікаво, що дія метилжасмонату стимулювала продукцію флавоноїду дайдзеїну на 6-у добу обробки, в той час як ефект саліцилової кислоти спостерігався вже на 3-ю добу після внесення в культуральне середовище [12].

Незважаючи на інтенсивні дослідження метаболізму флавоноїдів та токоферолів сої, мало що відомо про взаємозв'язок між антиоксидантною активністю тканин та вмістом цих сполук. Нами було проаналізовано загальну відновну активність тканин сої після дії саліцилової кислоти (рис. 1). Було встановлено, що через 1 добу дії саліцилової кислоти спостерігається збільшення загальної відновної здатності тканин сої, однак через 7 дб після обробки рівень зв'язування 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу вирівнявся з контрольним. На рослинах імбирю (*Zingiber officinale* Roscoe) раніше було показано, що обробка саліциловою кислотою підвищує загальну відновну активність, що корелюється з вмістом антоціаніну та фізетину. Разом з тим було виявлено зростання активності халконсинтази [13]. Таким чином, сплеск антиоксидантної активності може бути наслідком збільшення вмісту речовин з радикал-зв'язувальними властивостями, одночасно з прямою активацією ферментних систем детоксифікації активних форм кисню. Нами встановлено, що екзогенна дія саліцилової кислоти викликає підвищення антиоксидантної активності вегетативних тканин сої за добу після введення, що відповідає нагромадженню фенольних сполук, зокрема флавоноїдів, у той час як відносна частка токоферолів зменшується (рис. 2). У попередніх дослідженнях було показано акумуляцію пероксиду водню через 1 добу при дії саліцилової кислоти, при тому що рівень перекисного окиснення ліпідів залишався сталим, що свідчить про активацію антиоксидантних систем. Однак виявлені у вказаних умовах зміни активності каталази, пероксидази та супероксиддисмутази були недостатніми для повної компенсації ушкоджуючого впливу активних форм кисню [7]. Отже, саме дія фенольних сполук з антиоксидантними властивостями (флавоноїдів й токоферолів) видається ключовою ланкою у пролонгованих адаптивних реакціях рослин.

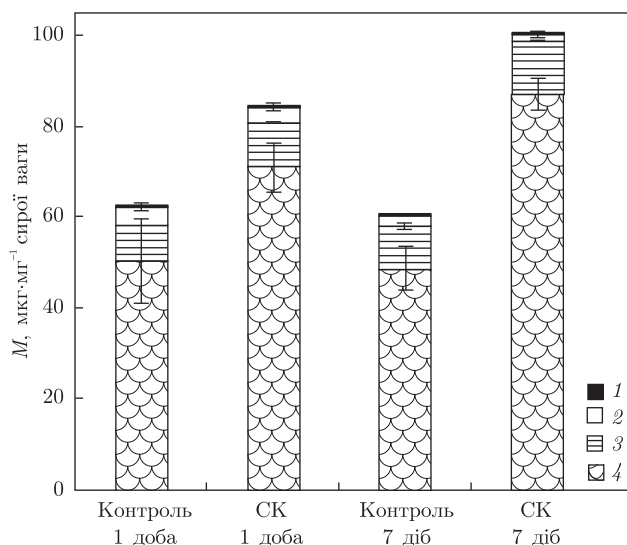


Рис. 2. Частка токоферолів, флавоноїдів та інших фенольних сполук у фотосинтетичних тканинах сої на 1-у й 7-у добу після екзогенної дії саліцилової кислоти (1 ммоль/л):

1 – γ -токоферол; 2 – α -токоферол; 3 – флавоноїди; 4 – інші фенольні сполуки

Проте через 7 днів після обробки саліциловою кислотою зростання загального вмісту фенольних сполук та власне флавоноїдів супроводжувалось зменшенням загальної відновної активності. Частка α - й γ -токоферолів серед загальних фенольних сполук зменшилась, що вказує на їх регуляторну та пряму антиоксидантну дію впродовж тривалих часових проміжків (див. рис. 2). Водночас у проростків сої рівень перекисного окиснення ліпідів на 7-у добу дії фітогормону залишався на рівні контролю, що свідчить про активацію компенсаторних механізмів забезпечення балансу активних форм кисню під час формування адаптивних реакцій рослинного організму на дію медіаторів біотичного стресу [7].

Таким чином, нами вперше було показано, що саліцилова кислота може виступати індуктором нагромадження вторинних метаболітів з антиоксидантним потенціалом у рослин, зокрема токоферолів і флавоноїдів, та, як наслідок, підвищувати цінність продуктів з сої як природного джерела біологічно активних речовин.

Дослідження виконано за підтримки грантів НАН України № 2.1.10.32-10, 8-13 та 9.1-06-13.

1. Chirumbolo S. Quercetin in cancer prevention and therapy // Integr. Cancer Therapies. – 2013. – **12**. – P. 97–102.
2. Brenda W.-S. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Curr. Opin. Plant Biol. – 2002. – **5**. – P. 218–223.
3. Chennupati P., Seguin P., Chamoun R., Jabaji S. Effects of High-Temperature stress on soybean isoflavone concentration and expression of key genes involved in isoflavone synthesis // J. Agric. Food Chem. – 2012. – **60**. – P. 421–427.
4. Pavet V., Olmos E., Kiddle G. et al. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis // Plant Phys. – 2005. – **139**. – P. 127–130.
5. Cheng H., Wang J., Chu S. et al. Diversifying selection on flavanone 3-hydroxylase and isoflavone synthase genes in cultivated soybean and its wild progenitors // PLoS ONE. – 2013. – **8**. – P. 154–158.
6. Xu M., Dong J., Wang H., Huang L. Complementary action of jasmonic acid on salicylic acid in mediating fungal elicitor-induced flavonol glycoside accumulation of Ginkgo biloba cells // Plant, Cell & Envir. – 2009. – **32**. – P. 960–967.

7. Kalachova T. A., Iakovenko O. M., Kretinin S. V., Kravets V. S. Effects of salicylic and jasmonic acid on phospholipase D activity and the level of active oxygen species in soybean seedlings // Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biol. – 2012. – **6**. – P. 243–248.
8. González M., Guzmán B., Rudyk R. et al. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis // Acta Farm. Bonaerense. – 2003. – **22**. – P. 243–248.
9. Yousuf S., Choudhary M. I., Rahman A. U. Separation of phenylpropanoids and evaluation of their anti-oxidant activity // Adv. Prot. in Oxidative Stress II. Methods in Mol. Biol. – 2009. – P. 357–377.
10. Yang W., Cahoon R. E., Hunter S. C. et al. Vitamin E biosynthesis: Functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase // Plant J. – 2011. – **65**. – P. 206–217.
11. Wei Y., Liu Z., Su Y. et al. Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities, and free polyamines of asparagus // J. Food Sci. – 2011. – **76**. – P. 126–132.
12. Udomsuk L., Jarukamjorn K., Tanaka H., Putalun W. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation // Biotech. Lett. – 2011. – **33**. – P. 369–374.
13. Ghasemzadeh A., Jaafar H., Karimi E. Involvement of Salicylic Acid on Antioxidant and Anticancer Properties, Anthocyanin Production and Chalcone Synthase Activity in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Varieties // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – **13**. – P. 828–844.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 15.05.2013

Т. А. Калачева, О. Н. Яковенко, О. Н. Бондаренко, В. С. Кравец

Регуляция уровня фенольных антиоксидантов в тканях сои при воздействии салициловой кислоты

*Исследована регуляция уровня фенольных соединений и динамика восстанавливающей активности тканей сои (*Glycine max*) при воздействии салициловой кислоты. Установлено, что обработка салициловой кислотой приводит к росту общей восстанавливающей активности фотосинтетических тканей и повышению уровня общих фенолов, α - и γ -токоферолов и флавоноидов. Полученные результаты указывают на перспективность использования салициловой кислоты в качестве индуктора накопления вторичных метаболитов с антиоксидантным потенциалом, что может повышать ценность продуктов из сои как природного источника биологически активных веществ.*

T. A. Kalachova, O. M. Iakovenko, O. M. Bondarenko, V. S. Kravets

Regulation of phenolic antioxidant level in soybean tissues under salicylic acid treatment

*The regulation of the phenolic compounds level and the dynamics of the total reducing activity of soybean tissues (*Glycine max*) under the influence of salicylic acid are investigated. The treatment by salicylic acid leads to an increase of the total reducing activity of photosynthetic tissues and the content of total phenolic compounds, α - and γ -tocopherols and flavonoids. The results indicate the prospects to use salicylic acid as an inducer of the secondary metabolites accumulation, which may increase the value of soy products as a natural source of biologically active substances.*