

О.А.КОВАЛЁВА, С.П.ИЗБАВИТЕЛЕВ, Т.Г.ЯНЧЕВСКАЯ,
С.В.МУРАШКО, Л.В.ОБУХОВСКАЯ, Т.Б.МАКАРОВА, Н.А.КОПЫЛОВА

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ РАДИАЦИИ НА ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОПЛАСТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ И ГОРОХА

Введение. Знание природы чувствительности различных сельскохозяйственных культур к ультрафиолетовой радиации (УФР) и адаптивных механизмов ее регуляции в последние годы приобретает все большее теоретическое и практическое значение в связи с интенсификацией антропогенного воздействия на атмосферу Земли. Имеющиеся в литературе многочисленные данные свидетельствуют о низкой устойчивости сельскохозяйственных растений к действию УФР-В ($\lambda=280-320$ нм) [1]. При моделировании условий биологического действия УФР-В диапазона на сельскохозяйственные растения показана существенное уменьшение их продуктивности при увеличении потока УФР [2, 3]. В то же время, рядом авторов отмечается неоднозначность действия УФР на синтетические процессы в растительном организме. Так, уже многократно экспериментально доказана способность УФР увеличивать ферментативную активность внутриклеточных биохимических процессов [4]. При этом уровень активности отдельных ферментов может увеличиваться в 100 раз. Установлена способность УФР как непосредственно влиять на каталитическую активность ряда ключевых ферментов (в первую очередь ФАЛ и ХС) вторичного метаболизма растений, так и активировать процессы их синтеза через фоторецепторные системы клетки [5-8].

Подтверждением ключевой роли УФР в процессах фотоморфогенеза, вторичного метаболизма и фотосинтеза высших растений и их адаптации к повышенным дозам длинноволнового ($\lambda > 320$ нм) солнечного УФ-излучения служат сельскохозяйственные растения высокогорного происхождения: картофель, табак (Перу) [1-3]. При этом они отличаются от долинных с.-х. культур (большинство зерновых культур) более высокой интенсивностью фотосинтеза и существенно большими урожаями [9-11]. Но и искусственное облучение с.-х. растений коротковолновым ($\lambda < 280$ нм) УФ-излучением в ряде случаев также дает положительные результаты, поскольку активирует физиологические процессы в растительной клетке специфическим образом [10], в частности, оказывая существенное влияние на структуру и функцию хлоропластов [12].

Изучение механизмов регуляторного действия УФР на различные физиологические процессы в растительной клетке вызывает необходимость проведения комплексных исследований фотохимической активности изолированных хлоропластов, установление концентрации в листьях основных пигментов (хлорофиллов а и b, их отношения, каротиноидов), флавоноидов, а также переменной флуоресценции хлорофилла как чувствительного индикатора физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений. Нам представляется, что этот вопрос может быть успешно решен при многократном непродолжительном облучении УФР меристемных регенерантов и проростков растений картофеля и гороха на различных этапах онтогенеза с применением искусственных источников УФР (лампы ДРТ), ФАР (лампы ДНАЗ) и фотореактивирующего света (лампы ДРЛФ).

В настоящей работе дается экспериментальное подтверждение направленной структурно-функциональной регуляции процесса фотосинтеза, вторичного метаболизма и фотоморфогенеза малыми дозами искусственной УФР.

Объекты и методы исследования.

Объектом исследования служили 7-10-дневные проростки растений гороха сорта Вегетативный желтый и 18-дневные регенеранты меристемных растений картофеля среднераннего сорта Никита, которые выращивали в биотехнологических модулях с лампами ДНАЗ-400 и ДРЛФ-400 (фотопериод – 16/8 ч) в пластиковых контейнерах на ионообменном субстрате Триона при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ [13, 14]. Регенеранты и проростки растений картофеля и гороха облучали полным УФ-спектром (А+В+С) с однократными дозами $E_1 = 120 \text{ Дж/м}^2$ (10 мин); $E_2 = 240 \text{ Дж/м}^2$ (20 мин); и $E_3 = 360 \text{ Дж/м}^2$ (30 мин). Для контроля величины дозы облучения растений использовали УФР-дозиметр ДАУ-81. Источником УФ-излучения служила ртутная лампа ДРТ-1000. После облучения растения переносились на биотехнологический комплекс с искусственными источниками света. Контролем служили растения, не подвергшиеся воздействию УФР.

Переменную флуоресценцию хлорофилла отделенных листьев картофеля и гороха регистрировали с помощью двухлучевого флуориметра переменного тока с цилиндрическим фосфороскопом, аналогичного по своей конструкции установке, описанной в работе [15].

Для исследования фотохимической активности хлоропласты из листьев картофеля и гороха выделяли в среду, содержащую 0,25 М сахарозу в 0,2 М трис-НСI буфере, рН=7,5. Скорость электронного транспорта в ФС-2 определяли спектрофотометрически на СФ-26 по кинетике изменения восстановления феррицианида калия при $\lambda = 420 \text{ нм}$ [16].

Суммарное содержание флавоноидов в листьях картофеля и гороха оценивали спектрофотометрическим методом [17]. Серии контрольных и опытных измерений выполняли в 3-5-кратной повторности для всех вариантов облучения УФР растений картофеля и гороха. В таблицах приводятся средние значения измерений.

Результаты и обсуждение

Непосредственное влияние солнечной ультрафиолетовой радиации на растения инициировало в процессе эволюции возникновение защитной функции, заключающейся в активном синтезе специальных веществ, способных эффективно поглощать избыточную ультрафиолетовую радиацию в диапазоне А/В и клеточный биосинтез которых, по-видимому, тесно коррелирует с дозой УФР. Такие вещества сейчас хорошо известны – фенилпропаноиды и флавоноиды – и их эволюционный биосинтез является исключительно прерогативой высших растений [18, 19]. Показано [6], что УФР и видимый свет стимулируют биосинтез флавоноидов, влияя главным образом на активность участвующих в этом процессе ключевых (ХС и ФАЛ) ферментов, в том числе и через механизмы регуляции экспрессии генов в растениях [5, 7, 20].

В проведенных нами модельных экспериментах (аналогичные исследования проводились на культуре *Azolla microphylla* Kaulf. в работе [21]) установлено, что при однократном облучении проростков гороха полным УФ спектром с помощью лампы ДРТ-1000 дозами от 120 Дж/м² до 360 Дж/м² наблюдалось стабильное увеличение в листьях содержания суммарных флавоноидов по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1).

Таблица 1. Соотношение величин изменений суммарного содержания флавоноидов в листьях под влиянием однократных доз и разным числе повторных УФР облучений относительно контроля (К)

Соотношение величины содержания флавоноидов УФР / контроль	Кратность облучения растений УФР			
	1	2	3	4
горох с. Вегетативный желтый				
УФР (E ₁ =120 Дж/м ²)/К	1,379	0,857	0,726	-
УФР (E ₂ = 240 Дж/м ²)/К	1,655	1,014	0,817	-
УФР (E ₃ = 360 Дж/м ²)/К	1,724	1,552	1,406	-
картофель с. Никига				
УФР (E ₁ =120 Дж/м ²)/К	1,097	0,812	1,249	0,833

Из табл. 1 видно, что при повторных облучениях образцов (2-3 экспозиции с временным интервалом в 48 ч), наблюдается постепенное уменьшение соотношения опыт/контроль суммарных флавоноидов в листьях расте-

ний. Следует также отметить, что при однократном облучении растений дозой УФР в 360 Дж/м^2 (E_3) соотношения опыт/контроль суммарных флавоноидов незначительно выше по сравнению с дозами в 120 Дж/м^2 (E_1) и 240 Дж/м^2 (E_2). В аналогичных условиях эксперимента изменения соотношения опыт/контроль суммарных флавоноидов в листьях регенерантов картофеля под действием УФР имеют динамику преимущественно колебательного характера.

Поскольку в последнее время фенилпропаноиды и флавоноиды были обнаружены в значительных количествах в хлоропластах многочисленных видов растений, это позволило предположить, что они могут иметь важную, но пока неизвестную общерегуляторную функцию в этих органеллах, а также в растительной клетке в целом (например, в регуляции процессов фотоактивации и метилирования ДНК). По-видимому, для автономной системы структурно-функциональной организации хлоропластов это может указывать на существенную роль фенилпропаноидов и флавоноидов в фундаментальных процессах регуляции генной экспрессии под влиянием УФР и ФАР в растениях [5, 22]. Было показано, что увеличение степени устойчивости клеток растений к повреждающему действию коротковолновой УФР коррелирует с увеличением объема облученных клеток, количеством в них нуклеиновых кислот и содержанием флавоноидов [23].

В этой связи интересно отметить, что при повторных облучениях проростков гороха УФР (примерно, через каждые 48 ч при всех дозах E_1 , E_2 и E_3), соотношения опыт/контроль суммарных флавоноидов постепенно уменьшается, и при 3-х кратном облучении достигает максимальных различий (табл. 1). При этом нами было также отмечено усиление тушения интенсивности переменной флуоресценции хлорофилла (современная техника анализа ее параметров подробно описана в работе [24]) листьев гороха (табл. 2), а также увеличение скорости реакции Хилла изолированных хлоропластов гороха с каждой новой дозой облучения УФР (табл. 3).

Изменение указанных фотохимических параметров были максимальны при длительности однократной дозы облучения УФР в диапазоне 240 Дж/м^2 . двукратной повторности облучения через 48 ч и 8-9-дневном возрасте растений гороха.

Таблица 2. Соотношение величин изменений параметров (F_m ; F_t ; F_t/F_m) переменной флуоресценции хлорофилла (ПФХ) листьев гороха сорта *Вегетативный желтый* под влиянием однократных доз и разным числе повторных УФР облучений относительно контроля (К)

Соотношение величины параметров ПФХ УФР/ контроль	Однократная доза УФР, Дж/м ²	Кратность облучения растений УФР		
		1	2	3
$F_m(E_{1,2})/F_m(K)$	$E_1 = 120$	0,769	0,849	0,697
	$E_2 = 240$	0,701	0,793	0,727
$F_t(E_{1,2})/F_t(K)$	$E_1 = 120$	0,484	0,713	0,474
	$E_2 = 240$	0,472	0,451	0,353
$F_t(E_{1,2})/F_m(E_{1,2}) : F_t(K)/F_m(K)$	$E_1 = 120$	0,750	0,895	0,538
	$E_2 = 240$	0,678	0,561	0,486

Где: F_m – максимальная амплитуда изменений интенсивности ПФХ под действием актиничного белого света; F_t – амплитуда изменений интенсивности ПФХ, измеренная через 3 минуты после момента включения актиничного белого света.

Таблица 3. Соотношение величин изменений фотохимической активности (по скорости восстановления феррианида калия, ΔD при $\lambda = 420$ нм) хлоропластов из листьев гороха сорта *Вегетативный желтый* под влиянием разных относительно контроля (К) однократных доз и при повторных УФР облучениях

Соотношение величины поглощения ΔD УФР Дж/м ² / контроль	Кратность облучения растений УФР	Время (мин) освещения хлоропластов ФАР		
		3	6	9
$\Delta D(E_1 = 120)/\Delta D(K)$	1	1,045	1,100	1,088
	2	1,250	1,029	0,922
$\Delta D(E_2 = 240)/\Delta D(K)$	1	1,214	1,178	1,225
	2	1,375	1,303	1,298
$\Delta D(E_3 = 360)/\Delta D(K)$	1	0,371	0,560	0,645
	2	0,787	0,765	0,878
	3	0,888	0,842	0,901
	4	1,033	0,852	0,907

Таблица 4. Соотношение величин изменений параметров (F_m ; F_t ; F_t/F_m) переменной флуоресценции хлорофилла (ПФХ) листьев картофеля сорта Никита под влиянием однократной дозы и повторных УФР облучениях относительно контроля (К)

Соотношение величины параметров ПФХ УФР/ контроль	Однократная доза УФР, Дж/м ²	Кратность облучения растений УФР			
		1	2	3	4
$F_m(E_1)/F_m(K)$	$E_1 = 120$	1,303	1,140	0,890	0,342
$F_t(E_1)/F_t(K)$	$E_1 = 120$	1,072	0,917	0,942	0,258
$F_t(E_1)/F_m(E_1) : F_t(K)/F_m(K)$	$E_1 = 120$	0,798	0,796	1,048	0,781

Где: F_m – максимальная амплитуда изменений интенсивности ПФХ под действием актиничного белого света; F_t – амплитуда изменений интенсивности ПФХ, измеренная через 3 минуты после момента включения актиничного белого света.

Таблица 5. Соотношение величин изменений фотохимической активности (по скорости восстановления феррицианида калия, ΔD при $\lambda = 420$ нм) хлоропластов из листьев картофеля сорта Никита под влиянием однократной дозы и повторных УФР облучениях относительно контроля (К)

Соотношение величины поглощения ΔD УФР Дж/м ² / контроль	Кратность облучения растений УФР	Время (мин) освещения хлоропластов ФАР		
		3	6	9
$\Delta D(E_1 = 120)/\Delta D(K)$	1	0,769	0,719	0,647
	2	2,625	1,956	1,672
	3	0,923	0,917	0,908

У меристемных растений картофеля в аналогичных условиях проведения экспериментов, мы наблюдали в основном колебательный характер изменений этих же параметров (табл. 1, 4, 5).

Представленные результаты, на наш взгляд, свидетельствует о различной генетически детерминированной чувствительности гороха и картофеля к действию искусственной УФР, а, следовательно, к разной степени индукции процесса фотореактивации и стимуляции (или ингибирования) активности структурно-функциональной регуляции фотосинтеза, вторичного метаболизма и фотоморфогенеза в этих растениях под влиянием УФР.

В этой связи нами было установлено, что при многократном облучении (3 и 4 экспозиции с интервалом в 24-48 ч) меристемных регенерантов картофеля и проростков гороха полным УФ-спектром излучения от лампы ДРТ-1000 с дозами от 120 до 360 Дж/м² наблюдаются незначительные изменения: увеличение скорости реакции Хилла и уменьшение интенсивности переменной флуоресценции хлорофилла (табл. 2-5). Следует отметить, что скорость реакции Хилла у облученных образцов прямо пропорционально зависела от доз и кратности их облучения УФР. Нами обнаружено также, что с увеличением однократной дозы облучения и возраста растений скорость реакции

существенно уменьшается, а с увеличением кратности облучения УФР она возрастает.

На основании анализа имеющихся в литературе данных [1-3, 7-10, 20-25] уместно предположить, что активация или ингибирование белковых и пигментных синтезов *de novo* ключевых энерготрансформирующих компонентов (ССК, РЦ, ЭТЦ) фотосистем хлоропластов с помощью искусственной УФР в растительной клетке может быть опосредована преимущественно регуляцией работы механизма фотореактивации ДНК [25, 26], либо продуктами повреждения (пиримидиновыми димерами) квантами УФР ДНК [9, 25], либо некоторыми низкомолекулярными агентами-индукторами, фотосенсибилизирующими процесс запуска функционирования ферментных систем репарации ДНК [25] определенными участками спектра УФР и ФАР.

Эти экспериментальные данные свидетельствуют также в пользу возможности запуска посредством малых дискретных доз УФР В/С-диапазона в клетках картофеля и гороха работы специфического генно-молекулярного механизма - репаративного метилирования ДНК [27], частично регулируемого посредством УФР-реактивации ДНК [27], и которое энергетически существенно отличается от ферментативной фотореактивации ДНК [26] по эффективно поглощенными растениями квантами с помощью УФР-рецепторов (криптохрома, UVB-хрома) [8; 29].

Заключение. Полученные нами результаты о действии использованных доз УФР облучения свидетельствуют, в основном, об активирующем, а не ингибирующем действии искусственной УФР на физиолого-биохимические характеристики меристемных регенерантов картофеля и проростков гороха. Представляется, что наблюдаемый нами характер амплитудно-временных изменений этих параметров у облученных УФР растений картофеля и гороха на ранних стадиях онтогенеза, отражает определенную информацию о генетически детерминированной структурно-функциональной устойчивости фотосинтетического аппарата хлоропластов к УФР – одному из факторов природного стресса сельскохозяйственных растений.

По-видимому, в природных условиях проявления различных стрессов (контрастные температуры среды обитания, водный дефицит и др.), как сопутствующих факторов процесса фотоингибирования фотосинтеза (ФИФ), необходимо постоянно учитывать возможную ключевую взаимосвязь репаративных систем [25] и механизмов генной экспрессии [20, 22] в управлении процессом фотоморфогенеза [30] посредством стимулирующих и регулирующих эффектов метаболизма, вызванных облучением относительно небольшими дозами коротковолновой (В/С-диапазона) ультрафиолетовой радиацией культурных растений.

Литература

1. Huttunen S.K.H., Laakso K. Impact of increased UV-B on plant ecosystems // *Chemosphere*. 1998. V. 36. P. 829-833.
2. Teramura A.H., Sullivan J.H. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants // *Photosynth. Res.*, 1994. V. 39. P. 463-473.
3. Fiscus E.L., Booker F.L. Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? // *Photosynth. Res.*, 1995. V. 43. P. 81-92.
4. Fritzsche K.H., Kindl H. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae // *Planta*, 1981. V. 151, N 1. P. 48-52.
5. Tobin E.M., Silverthorne J. Light regulation of gene expression in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1985. V. 36. P. 569-593.
6. Запрометов М.Н. Светорегуляция вторичного метаболизма растений // *Физиол. раст.* 1987. Т. 34, вып. 4. С. 698-711.
7. Jordan B.R., James P.E., Strid A., Anthony R.G. The effect of ultraviolet-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue: UV-B induced changes are gene-specific and dependent upon the development stage. // *Plant Cell Environ.* 1994. V. 17. P. 45-54.
8. Fuglevand G., Jackson J.A., Jenkins G.I. UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 1996. V. 8. P. 2347-2357.
9. Дубров А.П. Генетические и физиологические эффекты действия ультрафиолетовой радиации на высшие растения. – М.: Наука, 1968. – 250 с.
10. Ziska L.H., Teramura A.H., Sullivan J.H. Physiological sensitivity of plants along an elevational gradient to UV-B radiation // *Amer. J. Bot.*, 1992. V. 79. P. 863-871.
11. Шомансуров С. Изменение площади листьев фасоли под действием УФ радиации в условиях высокогорий Памира // *Изв. АН Тадж. ССР. Отд. биол. наук*. 1981. № 2.С. 97-99.
12. Селга М.П., Яневиц Д.А., Рудь И.С. Действие УФ-радиации на фотосинтетический аппарат растений и роль ее в светокультуре / В сб.: Биологическое действие ультрафиолетового излучения. – М.: Наука, 1975. С. 207-208.
13. Избавителев С.П., Хлопова З.С., Макарова Т.Б., Шевкова С.Н., Белая Т.Г. активация морфоструктурных и физиолого-биохимических характеристик проростков гороха при их облучении малыми дозами УФ-радиации / В сб.: Тезисы матер. I Междун. науч. конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Мн. 1999. С. 53-54.
14. Янчевская Т.Г., Избавителев С.П., Копылова Н.А., Макарова Т.Б., Мурашко С.В., Ковалева О.А. Физиология особенностей роста и развития регенерантов меристемных растений картофеля ранних и среднеранних сортов под действием УФ-облучения / В сб.: Тезисы матер. III Междун. науч. конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Мн. 2003.С. 186-187.
15. Карапетян Н.В., Бухов Н.Г. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений // *Физиол. раст.*, 1986. Т. 33, № 5. С. 1013-1026.
16. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа. 1975. 392 с.

17. Точкова Т.В., Бубенчикова В.Н. // Научные труды ВНИИ фармауки. 1991. Т. 29. С. 173-177.
18. Kubitzki K. Phenylpropanoid metabolism in land plant evolution // J. Plant Physiol. 1987. V. 131. P. 17-24.
19. Stafford H.A. Flavonoid evolution: an enzymic approach // Plant Physiol. 1991. V. 96. P. 680-685.
20. Savenstrand H., Broshe M., Strid A. Regulation of gene expression by low levels of ultraviolet-B radiation in *Pisum sativum*: Isolation of novel genes by suppression subtractive hybridization // Plant and Cell Physiol. 2002. V. 43, N 4. P. 402-410.
21. Jayakumar M., Eyini M., Selvinthangadurai P., Lingakumar K., Premkumar A., Kulan-daivelu G. Changes in pigment composition and photosynthetic activity of aquatic fern (*Azolla microphylla* Kaulf.) exposed to low doses of UV-C (254 nm) radiation // Photosyn-thetica. 1999. V. 37. № 1. P. 33-38.
22. Тищенко Е.Н., Кунцевич В.И. Метилирование ДНК и экспрессия генов растений // Физиол. и биохим. культур. растений. 2002. Т. 34, № 3. С. 213-226.
23. Murphy T.M., Hamilton C.M., Street H.E.A. Strain of *Rosa damscend* cultured cells resis-tant to ultraviolet light // Plant Physiol. 1979. V. 64, N 6. P. 936-941.
24. Rohacek K., Bartak M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic con-cepts, useful parameters, and some applications // Photosynthetica. 1999. V. 37, N 3. P. 339-363.
25. Данильченко О.А., Гродзинский Д.М., Власов В.Н. Значение ультрафиолетового из-лучения в жизнедеятельности растений // Физиол. и биохим. культур. растений. 2002. Т. 34, № 3. С. 187-198.
26. Sutherland V.M. Photoreactivation // BioScience. – 1981. – V. 31. – P. 439-444.
27. Сойфер В.Н. Молекулярные механизмы мутагенеза – М.: Наука, 1969. – 511 с.
28. Бурьянов Я.И., Кирьянов Г.И. Итоги науки и техники, Сер. Молекуляр. биология; Т. 23. М.: ВИНТИ, 1987. 219с.
29. Ahmad M., Cashmore A.R. Seeing blue: the discovery of cryptochrome // Plant Molecular Biology. 1996. V. 30. P. 851-856.
30. Wellmann E. UV radiation in photomorphogenesis. // Encyclopedia of Plant Physiology (Photomorphogenesis), New Series. Springer - Verlag, Berlin. 1983. V. 16B. P. 745-756.

Summary

The influence of artificial ultraviolet radiation (UVR) on pea and potatoes plants has been studied in laboratory conditions. Plants were exposed to low UV-radiation level produced by PHP lamps (220+380 nm); 120 J/m²; 240 J/m² и 360 J/m²). UV-radiation causing a significant increase contents of the flavonoid pigments in leaves and also activated the overall photosynthetic activity, as measured by chlorophyll-a fluorescence induction and Hill reaction of isolates chloroplasts. Our experiments provide evidence for distinguishing between the UVR-induced responses on growth and physiological activities. The results suggest that the former may be controlled through auxins, the latter is probably by direct action of UVR on the cell organelles.