

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-В-ОБЛУЧЕНИЯ

В.И.М. Тоайма¹, Н.Л. Радюкина²,
Г.А. Дмитриева^{1, 2}, Вл.В. Кузнецов^{1, 2}

¹Кафедра ботаники, физиологии, патологии растений и агробиотехнологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

В статье рассматривается методика изучения действия УФ-В-облучения (6,0, 12,3 и 36,9 Дж/кв. м) на лекарственные растения: полынь *Artemisia lerchiana* L., чернушку *Nigella sativa* L., базилик *Ocimum basilicum* L., выращенные в водной культуре в условиях фитотрона. Исследованные растения способны адаптироваться к действию низкой и средней доз УФ-В-радиации без значительных энергозатрат на усиление биосинтеза как низкомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты, так и высокомолекулярных. Степень повреждения растений при действии данного стрессора незначительна. В первые часы растения в основном использовали конститутивный уровень антиоксидантов, и лишь через 24 часа требовалось пополнение их пула. Каротиноиды, флавоноиды и пролин используются растениями уже через 4 часа после облучения, синтез антоцианов усиливается через 12 ч.

Ключевые слова: базилик *Ocimum basilicum* L., полынь *Artemisia lerchiana* L., чернушка *Nigella sativa* L., УФ-В-радиация, пролин.

Введение. Изучение действия неблагоприятных факторов окружающей среды на растения является одной из фундаментальных задач физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений. Неблагоприятные факторы окружающей среды подразделяются на биотические (к ним относятся насекомые, микроорганизмы, грибы, вирусы) и абиотические (засоление, недостаток влаги, экстремальные температуры, гипоксия, ультрафиолетовая радиация и другие). В результате интенсивной хозяйственной деятельности человека в последнее время риски, связанные с неблагоприятным действием факторов окружающей среды на растения, увеличились. Это обстоятельство нередко приводит к снижению продуктивности культурных растений и уменьшению биоразнообразия дикорастущих видов.

В ряду абиотических факторов особое место занимает действие УФ-радиации, на долю которой приходится 7% испускаемой Солнцем энергии (волны длиной

180—400 нм). Озоновый экран стратосферы задерживает большую часть вредного УФ-излучения (200—320 нм) [1]. Однако в результате усиления выбросов в атмосферу хлорофлюорокарбонатов и других загрязнителей происходит истощение озонового слоя. Следствием этого является увеличение мощности ультрафиолетовой радиации, достигающей земной поверхности. УФ-В-излучение негативно сказывается на морфологии и физиологии растений. Действие повышенных доз ультрафиолетовой радиации приводит к уменьшению биомассы растения, количества зрелой пыльцы, снижению фотосинтетической продуктивности [1].

Одним из наиболее повреждающих последствий действия стрессоров различной природы и УФ-В-радиации, в частности, является окислительный стресс [2]. Окислительный стресс возникает и развивается в результате нарушения баланса между образованием активных форм кислорода (АФК) и функционированием систем антиоксидантной защиты растения. К АФК относятся высокореакционные соединения, образующиеся в результате неполного восстановления кислорода. Взаимодействие активных радикалов с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами приводит к мутагенезу, нарушению структуры и функции мембран (прежде всего в хлоропластах), ферментов, фотосинтеза (инактивации фотосистемы II, снижению активности рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (РуБФК/О), уменьшению концентрации хлорофиллов и каротиноидов), водного обмена и, в итоге, к остановке клеточного цикла и смерти. Именно по этой причине способность растений контролировать уровень АФК в клетке может в значительной степени коррелировать с их устойчивостью к различным повреждающим воздействиям. Для нейтрализации АФК растения используют антиоксидантную систему, представляемую как низкомолекулярными соединениями (аскорбиновая кислота, α -токоферол, глутатион, фенолы, флавоноиды, антоцианы, пролин, полиамины), так и специализированными ферментами (супероксиддисмутаза (СОД), различные пероксидазы, каталаза и ферменты аскорбат-глутатионового цикла) [2].

К настоящему времени исследователями накоплено много фактического материала о функционировании низкомолекулярных и высокомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты [3; 4]. Анализ литературных данных позволяет сделать несколько выводов: функционирование антиоксидантной защитной системы зависит от вида растения, от степени и продолжительности действия стрессора и, наконец, от вида стрессора. Кроме того, УФ-В-облучение, наравне с действием гербицидов, является удобным модулятором окислительного стресса, что позволяет проверить адаптационный потенциал растений в лабораторных условиях.

Целью данной работы являлась оценка антиоксидантного потенциала лекарственных растений при различных дозах УФ-В-облучения.

Материалы и методы. Объектом исследования служили лекарственные растения: полынь *Artemisia lerchiana* L., чернушка *Nigella sativa* L., базилик *Ocimum basilicum* L. Растения выращивались на водной культуре с полной нормой питательной среды Джонсона в камере фитотрона при 12-часовом световом периоде и освещении люминесцентными лампами (мощность освещения — 37,6 Вт/кв. м), при температуре воздуха 23/16 °С (день/ночь) и относительной влажности 55/70%

(день/ночь). Растения в фазе 4—5 настоящих листьев облучали различными дозами УФ-В-радиации (6, 12,3 и 36,9 Дж/кв. м) в течение 5, 10 или 30 минут. Через 4, 12, 24 и 48 часов после перенесения растений в нормальные условия листья и корни фиксировали жидким азотом и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа. В образцах определяли содержание малонового диальдегида (МДА) [4], хлорофилла *a* и *b* [5], каротиноидов [5], антоцианов, фенолов, флавоноидов, пролина [5; 6], активность антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) [4], пероксидазы (ПО) [4].

Обработка данных, полученных в трех биологических и трех аналитических повторностях, проведена методами математической статистики с использованием MS Excel 2003.

Результаты и обсуждение. Проведенные эксперименты показали, что для исследованных растений доза УФ-В-облучения 36,9 Дж/кв. м в течение 30 минут является летальной: у всех растений наблюдались некрозы и потеря тургора. При дозах 6,0 Дж/кв. м в течение 5 минут (1-й вариант) и 12,3 Дж/кв. м в течение 10 минут (2-й вариант) внешних признаков повреждения не наблюдалось, поэтому изучение функционирования антиоксидантной защитной системы проводилось в двух указанных выше вариантах.

Одной из главных мишеней АФК является фотосинтетический аппарат растения, в том числе и молекулы хлорофилла (табл. 1). Как видно из табл. 1 и 2, в течение суток, прошедших после 5-минутного облучения растений базилика дозой 6,0 Дж/кв. м, концентрация хлорофилла *a* постепенно уменьшилась до 66% от его содержания в контроле. Затем она стала расти и к концу вторых суток составила уже 104%. Концентрация хлорофилла *b* уменьшалась не так быстро, а через 48 часов достигла 112%. Концентрация каротиноидов в этом варианте опыта практически не изменилась. Облучение в течение 10 мин дозой 12,3 Дж/кв. м вызвало менее сильное уменьшение концентрации хлорофиллов, но все равно к концу вторых суток она не достигла контрольного уровня. Одновременно концентрация каротиноидов уменьшилась почти в 2 раза.

Таблица 1

Влияние УФ-В-облучения на процентное содержание фотосинтетических пигментов (% от контроля)

Пигменты	Доза и продолжительность облучения			
	6 Дж\кв. м, 5 мин		12,3 Дж\кв. м, 10 мин	
	Время после облучения, час			
	24	48	24	48
Базилик				
Хлорофилл <i>a</i>	66	104	76	72
Хлорофилл <i>b</i>	81	112	93	88
Каротиноиды	102	102	54	61
Польнь				
Хлорофилл <i>a</i>	106	111	100	93
Хлорофилл <i>b</i>	118	131	116	111
Каротиноиды	62	64	78	76
Чернушка				
Хлорофилл <i>a</i>	88	72	85	77
Хлорофилл <i>b</i>	63	21	116	63
Каротиноиды	95	75	93	84

Влияние УФ-В-радиации на содержание МДА (% от контроля)

Орган	Продолжительность и доза облучения							
	6,0 Дж/кв. м, 5 мин				12,3 Дж/кв. м, 10 мин			
	Время после облучения, час							
	4	12	24	48	4	12	24	48
Базилик								
Лист	72	102	106	121	87	110	92	103
Корень	100	91	170	127	136	100	136	101
Полынь								
Лист	117	168	173	204	195	123	162	219
Корень	127	153	120	147	190	100	141	140
Чернушка								
Лист	108	72	106	107	98	72	762	143
Корень	84	95	221	147	121	79	116	105

Растения полыни реагировали на УФ-облучение по-другому: концентрация хлорофилла *a* и особенно хлорофилла *b* после 5-минутного облучения дозой 6,0 Дж/кв. м начала увеличиваться уже в первые сутки и достигла соответственно 106 и 118%, а к концу вторых суток составляла 111% и 131% от первоначальной. Облучение растений полыни в течение 10 минут дозой 12,3 Дж/кв. м в первые сутки не повлияло на содержание хлорофилла *a*, а концентрация хлорофилла *b* даже увеличилась до 116%. К концу следующих суток концентрация хлорофиллов уменьшилась соответственно до 93% и 111%. Содержание каротиноидов в результате облучения уменьшилась до 62—64%, причем более продолжительное и сильное облучение вызвало меньшее ее снижение (до 76%).

Облучение растений чернушки, независимо от варианта опыта, вызвало снижение концентрации всех фотосинтетических пигментов. Исключение составил хлорофилл *b*: его концентрация сначала увеличилась до 116%, а потом упала до 63%. Содержание каротиноидов в обоих вариантах опыта постепенно (в течение 48 часов) снижалось.

Снижение содержания хлорофиллов *a* и *b* у всех изученных растений начиналось через 12 часов после перенесения их в нормальные условия.

Анализ данных показывает, что различные фотосинтетические пигменты у растений разных видов неодинаково страдают от УФ-облучения. Наиболее устойчивыми оказались пигменты у полыни.

Другой мишенью для АФК являются мембранные липиды, в результате перекисного окисления которых образуется МДА. Изменение содержания МДА в листьях и корнях растений одновременно считается одним из критериев развития окислительного стресса при действии различных стресс-факторов [3].

У всех исследованных растений в обоих вариантах опыта содержание МДА повышалось. Особенно заметно содержание МДА повышалось в листьях полыни, что свидетельствует о повреждении клеточных мембран, вызванном облучением (табл. 2). Сравнение содержания МДА в разных органах показало, что у базилика к концу вторых суток в листьях и корнях содержание МДА было почти одинаковым, у полыни и чернушки содержание МДА в листьях было выше, чем в кор-

нях. Следовательно, мембраны различных органов повреждаются по-разному, и в реакции растений разных видов также обнаруживаются различия.

Итак, уменьшение содержания каротиноидов (табл. 1), способных нейтрализовать АФК, привело к накоплению АФК и, как следствие, к повреждению мембран.

Как уже отмечалось, каротиноиды, флавоноиды, антоцианы характеризуют антиоксидантный потенциал клетки. Они выполняют защитную функцию — снижают содержание АФК: образование АФК происходит в растительных клетках постоянно, но усиливается под действием стрессоров различной природы.

Данные табл. 3 показывают, что в ответ на облучение содержание флавоноидов у всех растений уменьшилось. Некоторым исключением явилось увеличение их концентрации на 5% у полыни через 24 часа после 10-минутного облучения дозой УФ-радиации 12,3 кДж/кв. м.

Таблица 3

Влияние УФ-В-облучения на процентное содержание флавоноидов, антоцианов и каротиноидов (% от контроля)

Пигменты	Продолжительность облучения, минуты			
	5		10	
	Время после облучения, час			
	24	48	24	48
Базилик				
Флавоноиды	45	62	67	56
Антоцианы	200	101	318	156
Каротиноиды	102	102	54	61
Полынь				
Флавоноиды	71	69	105	63
Антоцианы	132	256	169	111
Каротиноиды	62	64	78	76
Чернушка				
Флавоноиды	72	73	77	94
Антоцианы	80	66	60	55
Каротиноиды	95	75	93	84

Стресс-индуцируемое накопление антоцианов наблюдалось в листьях базилика и полыни через 12 часов в обоих вариантах опыта (табл. 3). Для листьев чернушки характерен в 3 раза более высокий конститутивный уровень антоцианов, что, возможно, является причиной отсутствия усиления синтеза антоцианов при действии стрессора.

Содержание каротиноидов (табл. 1) у базилика и полыни в первые сутки после облучения в обоих вариантах опыта не изменилось, а у чернушки постепенно уменьшалось. При более высокой дозе и более продолжительном облучении (вариант 2) содержание каротиноидов у всех видов исследованных растений снижается до 61—84%, причем сильнее всего у базилика.

Широко распространенный в растениях совместимый осмолит пролин в последнее время рассматривается не только как осмопротектор, но и как антиоксидант [7]. Изменение его содержания в условиях эксперимента начиналось через 4 часа после облучения и косвенно указывало на его участие в процессе «тушения»

АФК. Причем у базилика содержание пролина изменялось незначительно при обеих экспозициях УФ-облучения и в корнях, и в листьях, у полыни наблюдалась незначительная аккумуляция, у чернушки — снижение содержания пролина (табл. 4).

Таблица 4

**Содержание общего фенола и пролина в листьях и корнях растений при действии
УФ-В-радиации, мк М/г сырой массы**

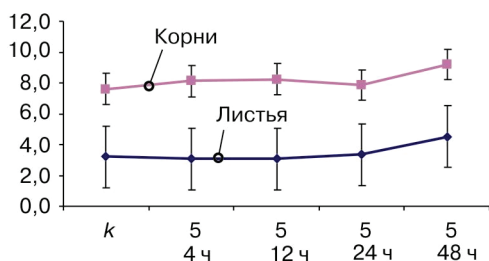
Вещество	Орган	Контроль	6 Дж/кв. м, 5 мин				12,3 Дж/кв. м., 10 мин			
			Время после облучения, час							
			4	12	24	48	4	12	24	48
Базилик										
Общий фенол	Лист	14,19 ± ± 0,198	15,99 ± ± 0,189	14,75 ± ± 0,0992	15,66 ± ± 0,108	21,11 ± ± 0,1172	13,17 ± ± 0,1803	17,96 ± ± 0,097	21,94 ± ± 0,1803	30,55 ± ± 0,0906
	Корень	9,97 ± ± 0,180	9,89 ± ± 0,126	9,83 ± ± 0,1803	9,60 ± ± 0,135	10,88 ± ± 0,1803	7,46 ± ± 0,1623	8,30 ± ± 0,095	10,89 ± ± 0,0947	10,89 ± ± 0,0947
Пролин	Лист	0,231 ± ± 0,125	0,186 ± ± 0,018	0,209 ± ± 0,009	0,152 ± ± 0,027	0,255 ± ± 0,161	0,220 ± ± 0,000	0,190 ± ± 0,027	0,180 ± ± 0,116	0,212 ± ± 0,035
	Корень	0,145 ± ± 0,009	0,241 ± ± 0,018	0,161 ± ± 0,053	0,125 ± ± 0,009	0,130 ± ± 0,018	0,208 ± ± 0,000	0,119 ± ± 0,009	0,139 ± ± 0,009	0,195 ± ± 0,009
Полынь										
Общий фенол	Лист	6,64 ± ± 0,187	4,68 ± ± 0,117	6,45 ± ± 0,1352	5,91 ± ± 0,126	5,53 ± ± 0,1082	8,16 ± ± 0,1803	5,81 ± ± 0,541	6,67 ± ± 0,3606	8,40 ± ± 0,0279
	Корень	1,79 ± ± 0,018	4,11 ± ± 0,100	3,57 ± ± 0,9016	3,04 ± ± 0,541	2,17 ± ± 0,2074	7,32 ± ± 0,1803	4,48 ± ± 0,46	3,10 ± ± 0,1361	2,11 ± ± 0,3065
Пролин	Лист	0,238 ± ± 0,009	0,427 ± ± 0,161	0,411 ± ± 0,018	0,330 ± ± 0,080	0,384 ± ± 0,080	0,400 ± ± 0,000	0,832 ± ± 0,152	0,644 ± ± 0,089	0,518 ± ± 0,009
	Корень	0,388 ± ± 0,000	0,270 ± ± 0,018	0,250 ± ± 0,009	0,263 ± ± 0,000	0,456 ± ± 0,018	0,280 ± ± 0,018	0,812 ± ± 0,035	0,285 ± ± 0,009	0,528 ± ± 0,098
Чернушка										
Общий фенол	Лист	10,09 ± ± 0,271	11,10 ± ± 0,343	12,65 ± ± 0,3246	11,11 ± ± 0,357	9,58 ± ± 0,4688	8,84 ± ± 0,2975	11,20 ± ± 0,262	12,39 ± ± 0,2344	10,57 ± ± 0,1803
	Корень	7,97 ± ± 0,316	7,93 ± ± 0,406	6,41 ± ± 0,0920	8,33 ± ± 0,424	8,22 ± ± 0,0948	6,50 ± ± 0,1893	7,15 ± ± 0,252	6,67 ± ± 0,3426	6,89 ± ± 0,3065
Пролин	Лист	10,493 ± ± 1,527	8,036 ± ± 0,152	10,066 ± ± 0,665	9,033 ± ± 2,085	11,587 ± ± 0,278	4,607 ± ± 0,053	5,470 ± ± 0,943	11,480 ± ± 1,348	19,193 ± ± 0,018
	Корень	0,203 ± ± 0,009	0,187 ± ± 0,009	0,370 ± ± 0,009	0,330 ± ± 0,018	0,366 ± ± 0,018	0,272 ± ± 0,018	0,300 ± ± 0,000	0,411 ± ± 0,027	0,358 ± ± 0,053

Из данных табл. 4 можно предположить, что растения разных видов в разной степени используют различные антиоксидантные системы для защиты от АФК и УФ-радиации.

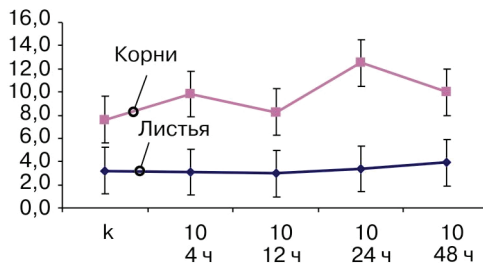
В ответ на действие УФ-В облучения (5 мин) в листьях и корнях всех изученных растений в течение всего эксперимента не наблюдалась стресс-зависимой индукции активности ключевого фермента антиоксидантной защиты — СОД (рис. 1). Однако в корнях базилика и полыни общая активность СОД увеличивалась уже через 4 часа после 10 минут облучения, а у чернушки незначительно снижалась в тот же промежуток времени. Возможно, конститутивный уровень общей активности СОД в листьях растений являлся достаточным для детоксикации супероксидрадикала, но, с другой стороны, возможно, изменялся вклад одной из трех изоформ СОД, что поддерживало общую активность фермента на постоянном уровне.

Базилик *Ocimum basilicum L.*

Активность,
у.е./мг белка

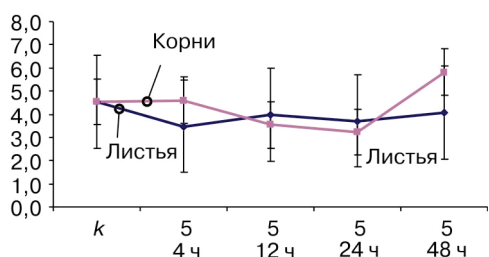


Активность,
у.е./мг белка

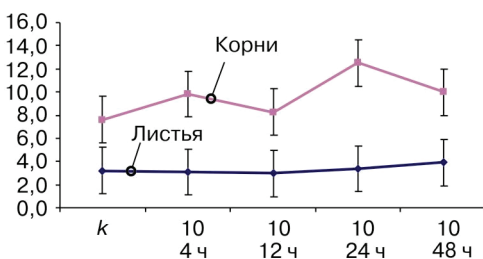


Полынь *Artemisia lerchiana L.*

Активность,
у.е./мг белка

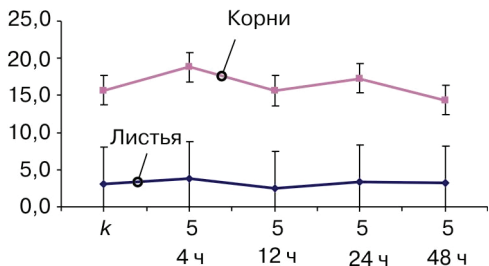


Активность,
у.е./мг белка

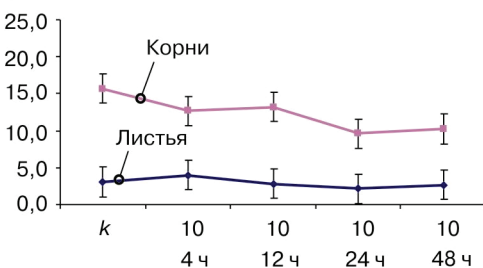


Чернушка *Nigella sativa L.*

Активность,
у.е./мг белка



Активность,
у.е./мг белка



I

II

Рис. 1. Динамика активности супероксиддисмутазы (СОД) в листьях и корнях базилика, полыни и чернушки при действии доз УФ-В-радиации

I — 6,0 Дж/кв. м; II — 12,3 Дж/кв. м; k — контроль

Общая активность гваякол-зависимой пероксидазы (мкмоль гваякола/мг белка-мин) также практически не изменялась при действии УФ-облучения в течение всего эксперимента.

По-видимому, основной вклад в детоксикацию пероксида водорода, образующегося в реакции, катализируемой СОД, вносили низкомолекулярные антиоксиданты: каротиноиды, антоцианы и флавоноиды. Уровень каротиноидов и фла-

воноидов незначительно снижался в листьях исследованных растений по сравнению с конститутивным уровнем уже через 4 часа после облучения (табл. 2).

Выводы. На основании полученных данных можно сделать вывод, что все исследованные растения способны адаптироваться к действию низкой и средней доз УФ-В-облучения. Степень их повреждения при действии данного стрессора, определяемая по содержанию МДА и хлорофиллов *a* и *b*, незначительна. У всех исследованных растений конститутивный антиоксидантный потенциал позволяет противостоять повреждающему действию УФ-облучения без значительных энергозатрат на усиление биосинтеза как низкомолекулярных компонентов антиоксидантной защиты, так и высокомолекулярных. Следует отметить, что в первые часы воздействия (стадия стресс-реакции) растения в основном использовали конститутивный уровень антиоксидантов и лишь через 24 часа требовалось пополнение их пула. Кроме того, вклад каждой из изученных составляющих антиоксидантной системы неравнозначен и действие их начинается на разных этапах адаптационного процесса. Каротиноиды, флавоноиды и пролин используются данными растениями уже через 4 часа после облучения, синтез антоцианов усиливается через 12 часов. Практически постоянный уровень активности СОД и пероксидазы, возможно, обусловлен более эффективным функционированием низкомолекулярных антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н. Экранирование видимого и УФ-излучения как механизм фотозащиты у растений // Физиология растений. — 2008. — Т. 55. — № 6. — С. 803—822.
- [2] Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress. A Review // Ann. Bot. — 2003. — V. 91. — P. 179—194.
- [3] Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А., Синицына Ю.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке // Физиология растений. — 1997. — Т. 44. — С. 725—730.
- [4] Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // Физиология растений. — 2008. — Т. 55. — № 5. — С. 721—730.
- [5] Соловченко А.Е., Чивкунова О.Б., Мерзляк М.Н., Решетникова И.В. Спектрофотометрический анализ пигментов в плодах яблони // Физиология растений. — 2001. — Т. 48. — С. 801—808.
- [6] Li J., Ou-Lee T.M., Raba R., Amundson R.G., Last R.L. Arabidopsis Flavonoid Mutants are Hypersensitive to UV-B Radiation // Plant Cell. — 1993. — V. 5. — P. 171—179.
- [7] Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. — 1999. — Т. 46. — С. 321—336.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL IN MEDICAL PLANTS UNDER UV-B-IRRADIATION

W.I.M. Toaima¹, N.L. Radyukina²,
G.A. Dmitrieva^{1,2}, V.I.V. Kuznetsov^{1,2}

¹Department of botany, plant physiology, plant pathology and agrobiotechnology
Russian People's Friendship University
Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

²Timirjazev Institute of Plant Physiology
Russian Academy of Science
Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

The UV-B irradiation action (6 — 36,9 dg/m²) on medical plants *Artemisia lerchiana L.*, *Nigella sativa L.*, *Ocimum basilicum L.*, grown in water culture, was studying. In plant leaves and roots the content of malondialdehyde, pigments, phenols, flavonoids, proline, and activities of antioxidant enzymes were determined. Investigated plants were able to resist to action of UV-B-irradiation (low and middle dose) without any power input for increasing of biosynthesis of low and high molecular component of antioxidant defense system. The damage level under stress conditions was low. At first hours plants used the constitutive level of antioxidants and after 24 h it was needed the antioxidant pool refilling. Carotenoids, flavonoids and proline were used by plants in 4 h after irradiation, the antocian synthesis increased after 12 h.

Key words: *Ocimum basilicum L.*, *Artemisia lerchiana L.*, *Nigella sativa L.*, UV-B irradiation, proline.