



УДК 581.143.524.633.342

© 2012

**А. Н. Берестяная, академик НАН Украины Д. М. Гродзинский**

**Динамика концентрации хлорофилла в онтогенезе  
семядольных листьев *Linum usitatissimum*,  
подвергшихся УФ-В облучению**

*Влияние ультрафиолета отражается на многих процессах растительного организма. В работе рассматривается аспект старения. Исследована динамика содержания хлорофилла в процессе старения семядольных листьев *Linum usitatissimum*, характеризующая скорость деградиционных процессов в клетке. Анализируется воздействие разных доз УФ-В облучения на скорость возрастной деградации хлорофилла. Показано, что с увеличением дозы ускоряются темпы распада хлорофилла. Обсуждаются вероятные механизмы, связывающие старение и деградацию пигментов.*

На сегодня среди ряда глобальных экологических проблем биосферы наиболее актуальной остается проблема разрушения озонового слоя в атмосфере и повышения уровня УФ излучения. За последние 20 лет содержание озона в атмосфере снизилось на 4%, что привело к возрастанию уровня УФ на 8%. Это излучение достигает поверхности земли и оказывает негативное влияние на живые организмы, в частности на растения [1]. По оценкам экспертов, скорость убывания озона в атмосфере Земли на данный момент достигла 0,5% в год [2, 3]. При сохранении нынешних темпов снижения уровень УФ в атмосфере будет стремительно увеличиваться. В результате повысится воздействие как интенсивного облучения УФ-В лучами, так и более жестких коротковолновых лучей. Их повреждающее воздействие может ослаблять сформированные в ходе эволюции механизмы защиты растения от УФ-В радиации и приводить к нарушению физиологических и биохимических процессов. Может измениться соотношение продолжительности онтогенеза у разных видов растений [4]. В связи с этим возникает необходимость исследования влияния повышенного уровня УФ-В радиации на продолжительность этапов онтогенеза растений.

Как известно, высокие дозы УФ излучения оказывают ряд повреждающих воздействий на растительную клетку, таких как димеры тимина, сшивки, окислительный стресс, повреждение мембран, снижение эффективности системы репарации, повышение частоты мутаций ДНК [5, 6]. Содержание защитных пигментов, таких как флавоноиды, антоцианы, также уменьшается в процессе старения. Снижается и содержание хлорофилла [5, 7]. Это обусловлено повышением активности гидролитических ферментов (хлорофиллазы), что

приводит к усилению распада многих веществ, таких как хлорофилло-белковый комплекс, и замедлению синтеза новых. По скорости снижения этого пигмента можно судить о темпах старения растения [8]. Высокие дозы УФ-В излучения, которые, как уже отмечалось, обладают повреждающим воздействием, аналогично вызывают деградацию хлорофилла [9].

Ранее нами была исследована возрастная динамика уменьшения содержания антоцианов в лепестках *Ipomoea purpurea*, подвергшихся УФ облучению [10]. Мы проанализировали воздействие разных доз на скорость возрастной деградации антоцианов. Было показано, что в пределах исследованного диапазона только одна доза —  $12,5 \text{ кДж/м}^2$  — способствовала замедлению распада антоцианов при старении растения. Это позволяет судить о снижении темпов деградационных процессов в клетке и запуске механизмов, защищающих от повреждающих излучений.

Необходимо было определить, является ли старение отдельных органов показателем старения целого растительного организма. Для дальнейшего исследования нами были выбраны семядольные листья льна. На данном объекте определяли динамику содержания хлорофилла, по скорости распада которого можно судить о темпах деградационных процессов, сопровождающих старение растения. Контроль за влиянием на эти процессы УФ-В излучения является важным с точки зрения установления характера воздействия [11]. Как известно, чем выше доза УФ-В излучения, тем быстрее происходит деградация хлорофилла, активизируются гидролитические ферменты, активность которых совпадает с этапами старения [5]. Предполагается, что под влиянием УФ-В облучения процесс распада хлорофилла в семядольных листьях будет ускоряться.

В настоящей работе приведены результаты изучения возрастной динамики хлорофилла и влияния на его содержание разных доз УФ-В облучения в семядольных листьях монокарпического растения *Linum usitatissimum*.

**Материалы и методы.** Объектом исследования были выбраны семядольные листья монокарпического растения льна долгунца (*Linum usitatissimum*). Семядольные листья являются удобными для исследования, поскольку представляют собой орган, который первый претерпевает деградационные изменения в процессе старения [12].

На стадии 15-дневного побега растения подвергали облучению источником УФ-В излучения (лампа ДБ-30) в трех дозах: 4,2, 8,5 и  $12,7 \text{ кДж/м}^2$  в течение 1,5 ч. Для определения содержания хлорофилла пробы семядольных листьев взвешивали и гомогенизировали в растворе ацетон : вода = 80 : 20 (соотношение сырая масса и раствор составляло 1 : 5). Экстракцию проводили на каждой стадии онтогенеза листьев (от развития до пожелтения), которые условно обозначили как: С1 (1 сут после облучения), С2 (15 сут после облучения), С3 (30 сут после облучения), С4 (45 сут после облучения). Полученные экстракты освобождали от растительных остатков путем фильтрования. Концентрацию хлорофилла, выраженную в мг/г сырой массы, определяли спектрофотометрическим методом, по формуле  $A = (C_a + C_b)V/P$ , где  $C_a$  и  $C_b$  — поглощение хлорофилла  $a$  и  $b$ , соответствующее длинам волн 663 и 645 нм;  $V$  — объем раствора;  $P$  — навеска [13].

**Результаты и обсуждения.** Распад пигментов в семядольных листьях можно охарактеризовать по изменению окраски, что происходит в процессе старения, за счет разрушения хлорофилла. Доверительный интервал кривой показывает, что с увеличением дозы процесс деградации хлорофилла достоверно ускоряется, это видно уже через 15 сут после облучения (рис. 1).

Согласно полученным данным, во всех облученных вариантах и контроле с увеличением времени воздействия устойчиво снижается содержание хлорофилла. Реакция на облучение

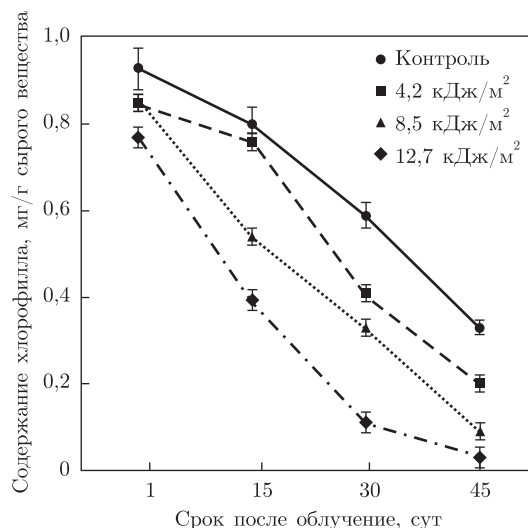


Рис. 1. Динамика содержания хлорофилла во времени

последовала сразу же. Отмечается зависимость содержания хлорофилла от дозы облучения. Плато на кривой отсутствует, что указывает на непрерывность процесса распада пигмента. Разная степень угла наклона свидетельствует о различных темпах деградации и о зависимости ее от дозы УФ-В облучения, что хорошо согласуется с данными о том, что облучение оказывает влияние на ход онтогенеза, в частности на процессы старения растений [5, 14]. Однако эти изменения проявляются по-разному, в зависимости от дозы, способа облучения и вида растений. Наблюдается как ускорение, так и замедление старения. Механизмы, участвующие в запуске процессов радиоиндуцированного старения монокарпических растений, сегодня не изучены детально [10, 15].

Для наибольшей дозы облучения темпы распада хлорофилла спустя 15 сут после облучения оказались выше, чем для остальных доз, и составляли 0,38 мг/г (табл. 1). Спустя 45 сут после облучения содержание хлорофилла в данном варианте достигло минимального по сравнению с другими вариантами значения — 0,03 мг/г сырого вещества (см. рис. 1). Для средней дозы темпы распада пигмента спустя 30 сут были меньше и составляли 0,21 мг/г. Его содержание через 45 сут после облучения было выше — 0,09 мг/г сырого вещества, чем при наибольшей дозе, но меньше, чем в контроле (0,33 мг/г сырого вещества) и при наименьшей дозе (0,2 мг/г сырого вещества). Для наименьшей дозы облучения темпы распада хлорофилла спустя 15 сут после облучения составляли 0,1 мг/г. Спустя 45 сут после облучения содержание хлорофилла было выше, чем при двух других дозах — 0,2 мг/г, но ниже, чем в контроле.

Таблица 1. Зависимость скорости уменьшения содержания хлорофилла (мг/г за отрезок времени между стадиями) от дозы облучения

Вариант	Срок после облучения		
	15 сут	30 сут	45 сут
Контроль	0,13	0,21	0,26
4,2 кДж/м <sup>2</sup>	0,1	0,35	0,21
8,5 кДж/м <sup>2</sup>	0,32	0,21	0,24
12,7 кДж/м <sup>2</sup>	0,38	0,28	0,08

Скорость протекания деградационных процессов зависит от дозы облучения. В пробах, которые были облучены самой высокой дозой, деградационные процессы протекали быстрее (см. табл. 1). Скорость снижения количества хлорофилла через 15 сут после облучения составляла 0,38 мг/г, через 30 сут — 0,28 мг/г, через 45 сут — 0,08 мг/г за каждый интервал между стадиями соответственно. Кроме того, через 45 сут после облучения содержание хлорофилла в образцах, подвергшихся воздействию самой высокой дозы, было ниже, чем в контроле и при влиянии остальных доз на тот же самый момент. Это может свидетельствовать о том, что именно облучение оказало большее влияние на распад хлорофилла, чем процессы естественной возрастной деградации пигмента. Таким образом, УФ-В облучение ускорило темпы старения семядольных листьев льна. Присутствовала прямая зависимость усиления темпов распада хлорофилла от увеличения дозы. В пробах, облученных высокой дозой — 12,7 кДж/м<sup>2</sup>, деградационные процессы протекали быстрее, чем в контроле и при остальных дозах. Это позволяет сделать вывод о том, что чем выше доза, тем быстрее скорость деградации.

Поскольку старение семядольных листьев является процессом запрограммированным, но внешние факторы также могут влиять на него, можно предположить, что деградационные процессы, сопровождающие старение, под влиянием УФ-В облучения ускорились.

Вероятный механизм, объясняющий увеличение скорости деградационных процессов, заключается в том, что под влиянием стрессовых факторов активность хлорофиллазы возрастает, что способствует распаду хлорофилла. УФ-В облучение, как стрессовый фактор, усиливает экспрессию генов гидролитических ферментов и вызывает ускоренную деградацию хлорофилла [2, 15]. Таким образом, динамика уменьшения хлорофилла во времени, характеризующая скорость деградационных процессов в клетке, может служить критерием для определения темпов старения. Это представляет интерес с точки зрения исследования возрастной адаптации монокарпического растения к повышению уровня УФ-В радиации. Аналогичные процессы наблюдаются на другом монокарпическом объекте — ипомее пурпурной. Полученные данные частично подтверждены предыдущими исследованиями [10]. Если сравнивать данные по льну с данными по ипомее пурпурной, то можно предположить, что УФ-В облучение по-разному подействовало на эти два растительных объекта. У ипомеи процессы старения замедлились, у льна — ускорились. Возможно, это связано с тем, что антоцианы представляют собой вакуолярный пигмент, а хлорофилл — пластидный, вследствие чего они по-разному реагируют на действие облучения. Пластиды реагируют на стресс и старение быстрее.

Результаты исследований распада хлорофилла под действием облучения подтверждают пригодность данного метода для изучения механизмов старения. Темпы деградации хлорофилла в семядольных листьях возросли под воздействием УФ-В облучения. Следовательно, облучение ускоряет процесс старения монокарпического растения, если об этом судить по усилению распада хлорофилла в облученных вариантах.

1. Frohnmeyer H., Staiger D. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection // *Plant Physiol.* – 2003. – **133**, No 4. – P. 1420–1428.
2. Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. – Москва: Высш. шк., 2005. – 736 с.
3. Conklin P. L., Barth C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence // *Plant, Cell and Environment.* – 2004. – **27**. – P. 956–970.
4. Москалев Ю. И. Современные представления о действии ионизирующих излучений на млекопитающих и проблемы нормирования // *Мед. радиобиология.* – 1985. – № 6. – С. 66–72.
5. Самойлова К. А. Клеточные и молекулярные механизмы биологических эффектов УФ-В излучения. – Киев: Наук. думка, 1982. – 246 с.

6. *Hakroort H. W., Ernst W. H.* Evidence that UV-B tolerance of the photosynthetic apparatus in microalgae is related to the D1-turnover mediated repair cycle *in vivo* // *J. Plant Physiol.* – 1995. – **147**, No 2. – P. 75–80.
7. *Соловченко А. Е., Мерзляк М. Н.* Экранирование видимого и УФ излучения как механизм фотозащиты у растений // *Физиология растений.* – 2008. – **55**, № 6. – С. 803–822.
8. *Гродзинский Д. М.* Старение у растений // *Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов: Сб. науч. тр. – Киев: Наук. думка, 1986. – 208 с.*
9. *Савин В. Н.* Действие ионизирующего излучения на целостный растительный организм. – Москва: Энергоатомиздат, 1981. – 120 с.
10. *Берестяная А. Н., Гродзинский Д. М.* Возрастная динамика антоцианов в лепестках *Ipotoea purpurea*, подвергшихся УФ-облучению, как критерий деградационных процессов в клетке // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2011. – **43**, № 2. – С. 179–183.
11. *Мерзляк М. Н.* Пигменты, оптика листа и состояние растений // *Сорос. образоват. журн.* – 1998. – № 4. – С. 19–24.
12. *Самуилов В. Д.* Программируемая смерть у растений // Там же. – 2001. – **7**, № 10. – С. 12–17.
13. *Рассадина В. В., Булда О. В., Алексейчук Г. Н. и др.* Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах растений // *Физиология растений.* – 2008. – **55**, № 4. – С. 604–611.
14. *Скулачев В. П.* Явления запрограммированной смерти. Организм // *Сорос. образоват. журн.* – 2001. – **7**, № 10. – С. 2–6.
15. *Milda H., Padu E.* Biochemical changes in primary wheat leaves during growth and senescence // *Biol. Plant.* – 2008. – **29**, No 6. – P. 445–452.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев*

*Поступило в редакцию 02.04.2012*

**А. М. Берестяна, академік НАН України Д. М. Гродзинський**

**Динаміка концентрації хлорофілу в онтогенезі сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, що зазнали УФ-В опромінення**

*Вплив ультрафіолету відображається на багатьох процесах рослинного організму. У роботі приділено увагу аспекту старіння. Досліджено динаміку вмісту хлорофілу в процесі старіння сім'ядольних листків *Linum usitatissimum*, яка характеризує швидкість деградаційних процесів у клітині. Аналізується вплив різних доз УФ-В опромінення на швидкість вікової деградації хлорофілу. Показано, що зі збільшенням дози прискорюються темпи розпаду хлорофілу. Обговорюються вірогідні механізми, що зв'язують старіння та деградацію пігментів.*

**A. M. Berestyana, Academician of the NAS of Ukraine D. M. Grodzinsky**

**Chlorophyll concentration dynamics in the ontogenesis of cotyledons *Linum usitatissimum* exposed to UV-B radiation**

*The UV influence is manifested in many processes running in plants. This work studies the aging aspect. The research was aimed at the dynamics of the chlorophyll content reduction in the aging process of cotyledons leaves of *Linum usitatissimum*, which characterizes the rate of degradation in cells. The influence of various UV radiation doses on the rate of age-related degradation of chlorophyll is analyzed. The experiment proved that the higher the dose, the higher the rate of degradation of chlorophyll. Various mechanisms which link the aging and the decomposition of pigments are discussed.*