
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.11.099>

УДК 577.34

О.М. Міхеєв, В.В. Жук, Л.Г. Овсянникова,
академік НАН України **Д.М. Гродзинський**

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ
E-mail: mikhalex7@yahoo.com

Гормезисний вплив УФ-С опромінення на пігментний комплекс і антиоксидантні ферменти клітин листків *Pisum sativum* L.

Досліджено гормезисну дію УФ-С опромінення на пігменти, вміст ендогенного пероксиду водню та активність антиоксидантних ферментів листків гороху. Встановлено, що після опромінення рослин адаптуючою дозою УФ-С рівень ендогенного H_2O_2 знижується. Визначення активності аскорбатпероксидази і каталази виявило стимуляцію антиоксидантних ферментів після дії УФ-С. Вміст хлорофілів у листках після дії адаптуючого УФ-С опромінення стабілізується і надалі відновлюється. Показано, що УФ-С опромінення листків гороху в адаптуючих дозах підвищує стійкість рослин до повторної дії УФ-С опромінення.

Ключові слова: *УФ-С опромінення, гормезис, пігменти, антиоксидантні ферменти.*

Стрес-біологія значну увагу приділяє УФ опроміненню як важливому екологічному чиннику. У природному середовищі на рослини діє переважно УФ-В випромінювання, яке досягає поверхні землі, однак як інструмент вивчення ефектів дії ультрафіолету на окремі системи використовують також УФ-С опромінення в діапазоні 200–280 нм. Насамперед, дослідники спостерігають інгібіторну дію УФ-С [1]. Встановлено, що короткочасна дія УФ-С на проростки огірка (*Cucumbersativus* L.) спричиняє інгібування росту гіпокотилів [2, 3]. Показано також, що дія УФ-С змінює спектри абсорбції пігментів *Cucumbersativus* L. і *Arabidopsisthaliana* L. [4]. Виявлено, що опромінення УФ-С здатне викликати оксидний стрес і запрограмовану загибель рослинних клітин [5, 6]. УФ опромінення здійснює і гормезисну (позитивну) дію на біологічні об'єкти. Гормезисна дія властива всім абіотичним факторам і проявляється в адаптації рослинних організмів до дії стресів [7]. Тому важливим є дослідження формування відповіді рослин на дію ультрафіолету на різних рівнях їх організації.

Метою наших досліджень було вивчення гормезисної дії УФ опромінення на пігментний комплекс, вміст ендогенного пероксиду водню, активність антиоксидантних ферментів листків гороху та інтенсивність їх транспірації.

Об'єктом дослідження слугував горох (*Pisum sativum* L.) сорту Ароніс, який вирощували в умовах водної культури протягом 17 діб до завершення формування третього ярусу лист-

© О.М. Міхеєв, В.В. Жук, Л.Г. Овсянникова, Д.М. Гродзинський, 2016

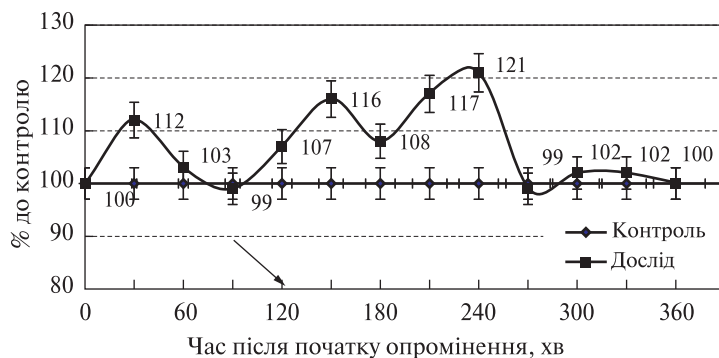


Рис. 1. Динаміка транспіраційної активності листків гороху після дії УФ-С опромінення. Стрілкою позначено час дії другої дози УФ-С

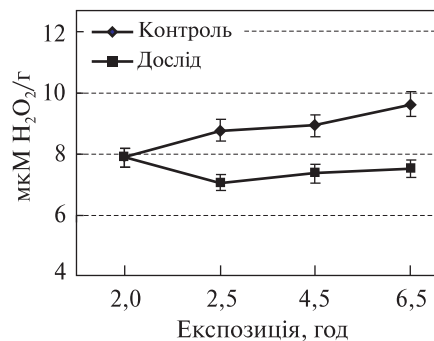


Рис. 2. Вміст ендогенного H_2O_2 в листках гороху після дії УФ-С опромінення

ків. Попередніми дослідженнями було встановлено інтервали доз, які викликали гормезисний ефект (адаптуюча доза (АД)) і необернене пригнічення рослин гороху (тестуюча доза (ТД)), що є загальноприйнятим для радіобіологічних досліджень [7]. Рослини піддавали дії УФ-С опромінювання, джерелом якого був опромінювач ОБМ-150 М з двома лампами Philips Special TUV 30 W, у дозі 136 Дж/м² при потужності 3,4 Вт/м² (АД) та в дозі 4,0 кДж/м² при потужності 6,8 Вт/м² (ТД). Інтервал між АД та ТД становив 2 год. Відбори зразків листків були такими: 1 – перед АД; 2 – перед ТД; 3 – через 2 год після ТД; 4 – через 4 год після ТД. Інтенсивність транспірації визначали за стандартним ваговим методом, визначення втрат води рослинами проводили з інтервалом 30 хв [8].

У листках визначали вміст пігментів, пероксиду водню (H_2O_2), активності аскорбатпероксидази (АПО) і каталази (КАТ). Ендогенний H_2O_2 визначали після гомогенізації листків з калій-фосфатним буфером (рН 6,5), центрифугування протягом 25 хв при 6000 g. До супернатанту додавали 0,1 % сульфату титану, знову центрифугували 15 хв при 6000 g. Інтенсивність оптичної густини розчину жовтого комплексу вимірювали при 410 нм [9].

Для визначення активності антиоксидантних ферментів листки гомогенізували у 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,0) на холоді з 0,1 мМ ЕДТА. Гомогенат центрифугували 20 хв при 12000 g. Супернатант використовували для визначення активності ферментів [10].

Активність КАТ (ЕС 1.11.1.6) визначали в реакційній суміші, яка містила калій-фосфатний буфер (рН 7,0), 0,03 % H_2O_2 і ферментний екстракт [11]. Падіння оптичної густини H_2O_2 вимірювали на 240 нм. Активність АПО (ЕС 1.11.1.11) визначали за методом Асади [12]. До ферментного екстракту додавали калій-фосфатний буфер (рН 7,0), аскорбат у концентрації 0,5 мМ і запускали реакцію додаванням 0,1 мМ H_2O_2 . Падіння оптичної густини аскорбату вимірювали при 290 нм. Вміст пігментів визначали за Ліхтенталером [13].

Встановлено, що вплив УФ-С опромінення в АД викликав значні коливання інтенсивності транспірації, які поступово затухали і досягали рівнів контрольного варіанту. Ймовірно, це відбувалося за рахунок збільшення продихової активності (рис. 1). Перевищення контрольного рівня інтенсивності транспірації після застосування ТД УФ-С опромінення вказує на наявність гормезисного ефекту.

Показано, що після опромінення рослин у АД рівень ендогенного H_2O_2 знижувався, що обумовлено посиленням його утилізації за рахунок активізації антиоксидантних систем і відновних процесів (рис. 2). Одночасно в контрольному варіанті вміст ендогенного H_2O_2

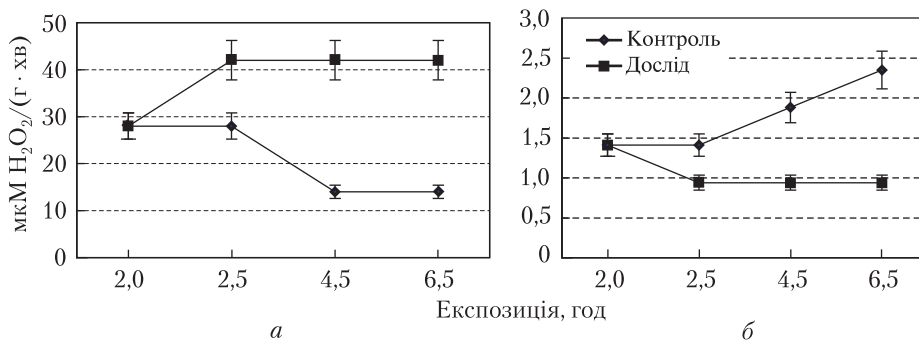


Рис. 3. Активність АПО (а) та КАТ (б) у листках гороху після дії УФ-С опромінення

зростає протягом дослідження, що спричинялося старінням клітин листків. Паралельно зменшенню рівня H_2O_2 після опромінення УФ-С спостерігалось зменшення інгібування транспіраційної активності, що свідчить про адаптацію рослин до дії ультрафіолету.

АПО вважають головним регулятором рівня основної форми активного кисню — H_2O_2 , що продукується фотосинтетичним апаратом. Саме процеси фотосинтезу відносять до найзначніших джерел активних форм кисню в рослинних клітинах. АПО є головним утилізатором H_2O_2 у хлоропластах, тому підвищення її активності важливіше для захисту клітини, ніж КАТ, яка функціонує в пероксисомах, що катаболізують відпрацьовані елементи клітин. Обидва ензими є субстратіндуцибельними, тому їх активність регулюється також кількістю субстрату.

Результати визначення активності АПО в клітинах листків гороху після дії УФ-С свідчать про стимуляцію активності ферменту, яка відповідала зниженню ендогенного вмісту H_2O_2 і була проявом гормезисної дії ультрафіолету (рис. 3, а). Активність КАТ за цих умов зменшувалася внаслідок зниження кількості відповідного субстрату, що свідчить про затримку деградаційних процесів, пов'язаних з проявом гормезисного ефекту (див. рис. 3, б). Зростання активності АПО захищає фотосинтетичний комплекс від ушкодження надлишком H_2O_2 , що бере участь у регуляції рухів замикальних клітин продихів і стану продихового апарату.

У контрольному варіанті протягом дослідження зменшувалася активність АПО і підвищувалася активність КАТ, що характерно для процесів старіння клітинних структур, особливо фотосинтетичного комплексу. Отримані нами результати свідчать про те, що зміни балансу активності АПО і КАТ, як головних утилізаторів активного кисню в клітинах, спрямовані на зниження ушкоджуючої дії оксидного стресу, спричиненого УФ-С опроміненням.

Хлорофіли належать до основних компонентів фотосинтетичного апарату і також є головними мішенями деструктивної дії оксидного стресу. Їх захист у хлоропластах забезпечує АПО. Встановлено, що вміст хлорофілів у листках після дії УФ-С опромінення в АД дозі збільшувався у відновний період, що свідчить про стабілізацію пігментного комплексу листків гороху (рис. 4).

Зростання кількості головних пігментів фотосинтетичних комплексів після дії стресового

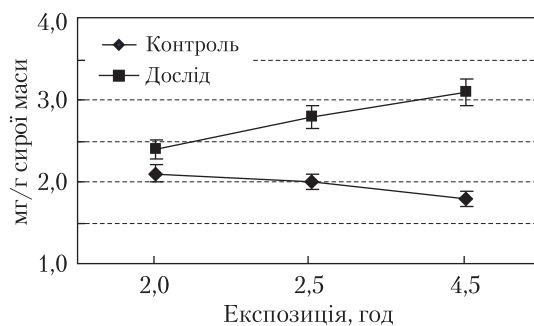


Рис. 4. Сумарний вміст хлорофілів а і б у листках гороху після дії УФ-С опромінення

чинника вказує на подовження їх функціональної здатності. Зменшення вмісту хлорофілів у контролі з часом відбувається, ймовірно, внаслідок стимульованого старіння листкової пластинки і деградації компонентів клітини.

Таким чином, УФ-С опромінення листків гороху в незначних (адаптуючих) дозах справляло гормезисну дію на рослини гороху, внаслідок чого підвищилась їх стійкість до дії повторного УФ-С опромінення. Активація головного утилізатора основної форми активного кисню в хлоропластах — H_2O_2 — АПО знижувала деструктивну дію оксидного стресу на основні пігменти фотосинтетичного комплексу і забезпечувала його функціонування для продукування ресурсів метаболітів і енергії, необхідних для життєдіяльності клітин. Рівень ферментів-антиоксидантів істотно зростає після впливу адаптуючих доз УФ-С опромінення, що свідчить про їх важливу роль у забезпеченні адаптивної реакції рослин. На організменому рівні проявом гормезисної дії ультрафіолету були зміни інтенсивності транспірації листкових пластинок, які були зумовлені станом замикальних клітин продохів, тісно пов'язаним з балансом ендогенного H_2O_2 , і активності антиоксидантного ферментного комплексу.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Гродзинский Д.М. Адаптивная стратегия физиологических процессов растений. — Киев: Наук. думка, 2013. — 301 с.
2. Shinkle J.R., Atkins A.K., Humphrey E.E., Rodgers Ch.W., Wheeler S.L., Barnes P.W. Growth and morphological responses to different UV wavebands (*Cucumis sativum*) in cucumber and other dicotyledonous seedlings // *Physiol. Plant.* — 2004. — **120**. — P. 240–248.
3. Shinkle J.R., Derickson D.L., Barnes P.W. Comparative physiology of growth responses two UV-B wavebands and UV-C in dim-red — light and white-light-grown cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings: physiological evidence for photoreactivation // *Photochem. Photobiol.* — 2005. — **81**. — P. 1069–1074.
4. Shinkle J.R., Edwards M.C., Koenig A., Shaltz A., Barnes P.W. Photomorphogenetic regulation of increases in UV-absorbing pigments in cucumber (*Cucumis sativus*) and *Arabidopsis thaliana* seedlings induced by different UV-B and UV-C wavelands // *Physiol. Plant.* — 2010. — **138**. — P. 113–121.
5. Gao C., Xing D., Li L., Zhang L. Implications of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages by plant programmed celldeath induced by ultraviolet-C overexposure // *Planta.* — 2008. — **227**. — P. 755–767.
6. He R., Drury G.E., Rotary V.J., Gordon A., Willer M., Farzaneh T., Woltering E.J., Gallois P. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H_2O_2 in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* — 2008. — **283**. — P. 774–783.
7. Мухеев А.Н. Гиперадаптация. Стимулированная онтогенетическая адаптация растений. — Киев: Фитосоциоцентр, 2015. — 423 с.
8. Гродзинський А.М., Гродзинський Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1973. — 591 с.
9. Chen L.M., Kao C.H. Effect of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation // *Bot. Bull. Acad. Sin.* — 1999. — **40**. — P. 283–287.
10. Rios-Gonzalez K., Erdei L., Lips S.H. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources // *Plant Sci.* — 2002. — **162**. — P. 923–930.
11. Upadhyaya A., Sankhla D., Davis T.D., Sankhla N., Smith B.N. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves // *J. Plant Physiol.* — 1985. — **121**. — P. 453–461.
12. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* — 1981. — **22**, No 5. — P. 867–880.
13. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods Enzymol.* — 1987. — **148**. — P. 350–382.

REFERENCES

1. Grodzinsky D.M. Adaptive strategies of plant physiological processes, Kiev: Naukova Dumka, 2013 (in Russian).
2. Shinkle J.R., Atkins A.K., Humphrey E.E., Rodgers Ch.W., Wheeler S.L., Barnes P.W. *Physiol. Plant.*, 2004, **120**: 240–248.
3. Shinkle J.R., Derickson D.L., Barnes P.W. *Photochem. Photobiol.*, 2005, **81**: 1069–1074.
4. Shinkle J.R., Edwards M.C., Koenig A., Shaltz A., Barnes P.W. *Physiol. Plant.*, 2010, **138**: 113–121.
5. Gao C., Xing D., Li L., Zhang L. *Planta*, 2008, **227**: 755–767.
6. He R., Drury G.E., Rotary V.J., Gordon A., Willer M., Farzaneh T., Woltering E.J., Gallois P.J. *Biol. Chem.*, 2008, **283**: 774–783.
7. Mikhyeyev A.N. Hyperadaptation. Stimulation of ontogenetic plant adaptation— Kiev: Phytosociocentr, 2015 (in Russian).
8. Grodzinsky A.M., Grodzinsky D.M. Short reference book of plant physiology Kiev: Naukova Dumka, 1973 (in Russian).
9. Chen L.M., Kao C.H. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 1999, **40**: 283–287.
10. Rios-Gonzalez K., Erdei L., Lips S.H. *Plant Sci.*, 2002, **162**: 923–930.
11. Upadhyaya A., Sankhla D., Davis T.D., Sankhla N., Smith B.N. *J. Plant Physiol.*, 1985, **121**: 453–461.
12. Nakano Y., Asada K. *Plant Cell Physiol*, 1981, **22**, No 5: 867–880.
13. Lichtenthaler H.K. *Methods Enzymol.*, 1987, **148**: 350–382.

Надійшло до редакції 25.04.2016

A.N. Mikhayev, V.V. Zhuk, L.G. Ovsyannikova, академик НАН України D.M. Grodzinsky

Institut of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: mikhalex7@yahoo.com

ГОРМЕЗИСНОЕ ВЛИЯНИЕ УФ-С ОБЛУЧЕНИЯ НА ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КЛЕТОК ЛИСТЬЕВ *PISUM SATIVUM* L.

Исследовано гормезисное действие УФ-С излучения на пигменты, содержание эндогенного пероксида водорода и активность антиоксидантных ферментов листьев гороха. Установлено, что после облучения растений адаптирующей дозой УФ-С уровень эндогенного H_2O_2 снижается. Определение активности аскорбатпероксидазы и каталазы выявило стимуляцию антиоксидантных ферментов после действия УФ-С. Содержание хлорофиллов в листьях после действия адаптирующего УФ-С облучения стабилизируется и в последующем восстанавливается. Показано, что УФ-С облучение листьев гороха в адаптивных дозах повышает устойчивость растений к повторному действию УФ-С облучения.

Ключевые слова: УФ-С облучение, гормезис, пигменты, антиоксидантные ферменты.

A.N. Mikhyeyev, V.V. Zhuk, L.G. Ovsyannikova, Academician of the NAS of Ukraine D.M. Grodzinsky

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: mikhalex7@yahoo.com

HORMESIS EFFECT OF UV-C IRRADIATION ON PIGMENT COMPLEX AND ANTIOXIDANT ENZYMES OF CELLS IN LEAVES OF *PISUM SATIVUM* L.

The hormesis effect of UV-C irradiation on pigments, endogenous hydrogen peroxide content, and antioxidant enzyme activity of pea leaves is studied. It is established that, after the irradiation of plants by an adapted dose of UV-C, the level of endogenous H_2O_2 decreases. Determination of the activity of ascorbate peroxidase and catalase has established the stimulation of antioxidant enzymes after the action of UV-C. The chlorophyll content in leaves after the effect of adaptive UV-C radiation is stabilized and subsequently restored. It is shown that UV-C irradiation on pea leaves in an adaptive dose increases the tolerance of plants to the repeated UV-C irradiation.

Keywords: U-C irradiation, hormesis, pigments, antioxidant enzymes.