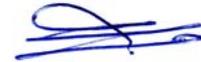


*На правах рукописи*



**Ваел Исмаил Мохаммед Тоайма**

**Действие UV-B облучения на антиоксидантную систему лекарственных растений**

03.01.05. – Физиология и биохимия растений

**Автореферат**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН и на кафедре ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии Аграрного факультета Российского университета дружбы народов, г. Москва.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

**Радюкина Наталия Львовна**

**Научный консультант**

чл.-корр. РАН

**Кузнецов Владимир Васильевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

**Загоскина Наталия Викторовна**

кандидат биологических наук, доцент

**Живухина Елена Александровна**

**Ведущая организация:** Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Защита диссертаций состоится «19» октября 2010 г. в 15 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977-80-18, e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан «15» сентября 2010 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

В связи с обострением экологической обстановки в мире, вызванным усилением техногенного давления человека на окружающую среду, резко возросло отрицательное воздействие ряда абиотических стрессоров на фитоценозы. Среди этих факторов особая роль принадлежит нарушению ионного баланса почвы в результате вторичного засоления в странах с аридным и полуаридным климатом, в том числе и в Египте, а также истощению озонового слоя стратосферы. В результате этих негативных экологических изменений растения подвергаются более интенсивному UV-B облучению и воздействию высоких концентраций солей.

Действие повышенных доз ультрафиолетовой радиации и интенсивное засоление почв, приводят к нарушению клеточного метаболизма, к снижению урожая основных с/х культур и, как следствие этого, к значительным экономическим потерям. Для разработки инновационных технологий повышения устойчивости растений к повреждающим воздействиям UV-B радиации и избыточного содержания солей лимитирующим звеном является недостаток знаний механизмов адаптации к повреждающим факторам.

В настоящее время установлено, что одним из общих стрессорных ответов растений на действие повреждающих абиотических факторов различной природы является усиление генерации активных форм кислорода и развитие окислительного стресса. Это связано, в первую очередь, с ингибированием скорости транспорта электронов не только в результате повреждения структуры и биологических функций мембран, прежде всего, хлоропластов и митохондрий, но и вследствие недостаточного пула восстановительных эквивалентов (Chaves et al., 2003). В ответ на усиление генерации активных форм кислорода, как правило, наблюдается увеличение активности антиоксидантных ферментов. В условиях окислительного стресса антиоксидантные ферменты играют ключевую роль в защите метаболизма от повреждения, однако они могут быстро инактивироваться в результате изменения внутриклеточного редокс-статуса.

Другим, защитным механизмом при окислительном стрессе, является стресс-зависимое накопление в растениях низкомолекулярных органических антиоксидантов. К подобным метаболитам относятся пролин, полиамины, а также вещества фенольной природы, такие как антоцианы, каротиноиды, флавоноиды, растворимые фенолы и другие (Blochina, 2003, Радюкина и др., 2007, 2008). Следует также отметить, что большинство вторичных метаболитов, к которым относятся фенольные соединения и алкалоиды, являются основой биологически-активного действия лекарственных растений.

Вклад фенольных соединений в защиту растений от действия UV-B облучения и засоления, а также их последовательного или совместного действия изучен далеко недостаточно. В частности, мало известно о коррелятивных отношениях между процессами функционирования антиоксидантных ферментов и стресс-зависимой аккумуляцией низкомолекулярных антиоксидантов. Помимо этого, слабо исследован вопрос о роли антиоксидантной защитной системы при кросс-адаптации растений к действию различных абиотических стрессоров, таких как, например, UV-B облучение и засоление.

Для изучения участия антиоксидантной системы в восстановлении редокс-баланса в клетке необходимо проводить комплексные исследования корреляционных взаимоотношений между функционированием антиоксидантных ферментов и стресс-зависимой аккумуляцией низкомолекулярных антиоксидантов. Расширение используемых модельных растений может быть одним из перспективных подходов для выяснения видоспецифических особенностей функционирования антиоксидантной защитной системы на фоне действия различных неблагоприятных факторов внешней среды.

Выбор в качестве объектов исследования лекарственных растений полыни (*Artemisia lercheana* Web.), базилика камфорного (*Ocimum basilicum* L.) и калинджи, или чернушки посевной, (*Nigella sativa* L.) обусловлен важностью этих видов для фармацевтической промышленности Египта. Исследование механизмов устойчивости указанных выше лекарственных растений к UV-B облучению и засолению позволяет получить новые фундаментальные знания об адаптации растений к неблагоприятным условиям аридного климата и открывает широкие перспективы для разработки технологий выращивания этих растений на полях, непригодных для сельскохозяйственных культур.

**Цель и задачи исследований.** Цель настоящих исследований заключалась в изучении закономерностей функционирования антиоксидантной защитной системы у ряда лекарственных растений Египта при действии UV-B облучения и засоления, а также в выяснении ее роли в кросс-адаптации растений к последовательному действию двух указанных факторов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить устойчивость и провести сравнительные исследования антиоксидантного потенциала растений полыни *Artemisia lercheana* Web., базилика камфорного (*Ocimum basilicum* L.), калинджи или чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) при действии UV-B облучения различной интенсивности.

2. Исследовать изменения содержания низкомолекулярных антиоксидантов (пролина, фенолов, флавоноидов, антоцианов, каротиноидов) и активностей антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и гваяколовых пероксидаз) в условиях

солевого стресса.

3. Провести сравнительные исследования изменений в содержании низкомолекулярных антиоксидантов (пролина, фенолов, флавоноидов, антоцианов, каротиноидов) и активностей супероксиддисмутазы и гваяколовых пероксидаз при последовательном (совместном) действии UV-B облучения и избыточного засоления.

**Научная новизна.** В настоящей работе впервые показано, что низкомолекулярные антиоксиданты (антоцианы, фенолы, флавоноиды), а не антиоксидантные ферменты, могут выполнять ведущую протекторную роль при кросс-адаптации растений к последовательному действию UV-B и NaCl. Установлено, что эффективность защитного эффекта UV-B облучения зависит не только от специфики вида, интенсивности солевого воздействия, но и от последовательности действия двух стрессоров. Показано также, что протекторный эффект кратковременного UV-B воздействия сводится к стимуляции накопления низкомолекулярных антиоксидантов, снижающих интенсивность окислительного стресса и тем самым повышающих устойчивость растений к повреждающему солевому воздействию.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные вносят существенный вклад в расширение фундаментальных знаний о характере взаимоотношений между низкомолекулярными антиоксидантами и антиоксидантными ферментами у растений в неблагоприятных условиях окружающей среды, инициирующих развитие окислительного стресса. Установленный нами факт способности растений аккумулировать в ответ на действие UV-B низкомолекулярные антиоксиданты, прежде всего фенольной природы, свидетельствует не только о повышении устойчивости, но и о повышении лекарственной ценности растений. Полученные данные говорят о том, что предварительное облучение растений UV-B стимулирует их защитную антиоксидантную систему, обеспечивая тем самым увеличение устойчивости не только к UV-B воздействию, но и к солевому стрессу. Впервые установленное явление кросс-адаптации растений к UV-B облучению и засолению может использоваться для разработки технологии повышения солеустойчивости лекарственных растений, что позволит выращивать их на засоленных почвах Египта, не пригодных для возделывания с/х культур. Показано, что наиболее перспективным растением для этих целей является, прежде всего, чернушка (*Nigella sativa* L.), которая устойчива не только к действию UV-B, но и к засолению. Полученные в процессе выполнения этой работы экспериментальные данные и сделанные на их основе теоретические обобщения могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических факультетов вузов.

**Апробация работы.** Результаты исследований докладывались на годичном собрании общества физиологов растений России и Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера»

(Апатиты, 2009), на семинаре Аграрного факультета РУДН, а также в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано и направлено в печать 4 работы, из них 3 – в рецензируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 105 страницах машинописного текста, включая 6 таблиц, 32 рисунков; библиография содержит 89 названий, в т.ч. 74 на иностранных языках.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Объектом исследований служили три вида лекарственных растений: полынь *Artemisia lercheana* Web., базилик камфорный (*Ocimum basilicum* L.), калинджи или чернушка посевная (*Nigella sativa* L.). Исследуемые растения представляют хозяйственную ценность для фармацевтической промышленности Египта.

Растения выращивали в условиях водной культуры в камере фитотрона при 12- часовом световом периоде и мощности освещения  $37,6 \text{ Вт/м}^2$  люминесцентных ламп Philips (F36W/54). Температура воздуха –  $23 \pm 1^\circ\text{C}/15 \pm 1^\circ\text{C}$ , относительная влажность воздуха – 55/70% день/ночь.

**Условия проведения опытов.** 6-недельные растения (стадия 4 - 5 настоящих листьев) подвергали облучению в течение 10 минут ультрафиолетовыми лампами Philips 40W/12RS, что соответствовало  $12,3 \text{ кДж/м}^2$ . Мощность облучения определялась с помощью люксметра AvaSpec-2048 (Avantes, Голландия). Затем растения переносили в нормальные условия. Образцы листьев и корней контрольных и опытных растений отбирали через 4, 12, 24, 48 ч после начала эксперимента, фиксировали жидким азотом и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до проведения анализов. С целью изучения влияния NaCl на антиоксидантную систему, растения выращивали на питательной среде с 100 мМ NaCl. Образцы листьев и корней контрольных и опытных растений отбирали через 4, 24, 36, 48 ч после начала эксперимента.

При изучении последовательного (совместного) действия NaCl и UV-B радиации растения подвергали комбинированному действию двух факторов в различной последовательности: вариант 1 – облучение растений в течение 10 мин UV-B и последующее выращивание растений в нормальных условиях; 2 - обработка растений 100 мМ NaCl; вариант 3 – 10 мин УФ-В облучение и, спустя 24 часа, добавление в среду 100 мМ NaCl.; 4 вариант – обработка растений 100 мМ NaCl, через 24 часа 10 мин облучение UV-B ( $12,3$

Дж/кв.м) и последующие выращивание растений в условиях засоления. Листья и корни фиксировали жидким азотом через 4, 12, 24 и 48 ч после обработки вторым стрессором.

Измерение сырой биомассы отдельных органов растений (листьев, корней) проводили стандартным весовым методом.

Содержание **малонового диальдегида (МДА)** определяли методом, описанным Heath and Packer (1968), по образованию окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой. Содержание **свободного пролина** определяли по методу Bates с соавторами (1973). Экстрагирование **пигментов** проводили по методу Шлыка (Шлык, 1971). Определение **растворимых фенольных соединений** проводили по методу Фолина-Дениса (Загоскина, 2003). Содержания флавоноидов и антоцианов определяли по методу Mabry (Mabry et al., 1970). **Активность супероксиддисмутазы (СОД)** измеряли спектрофотометрически по методу Beauchamp and Fridovich (1971). **Активность гваяколзависимой пероксидазы** определяли по методу Ridge and Osborn (1971). Измерение содержания белка проводили по методу Esen (Esen, 1978).

Разделение **изоформ СОД** проводили при помощи нативного электрофореза фракции белков в 12% полиакриламидном геле. Окрашивание гелей для СОД проводили по Beauchamp and Fridovich (1971).

Эксперименты проводили 2-3 раза; биологическая повторность 3-х кратная. Результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики по методу Зайцев(Зайцев 1984)

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

*Действие UV-B облучения на содержание низкомолекулярных антиоксидантов в растениях полыни, базилика и чернушки.*

Изучение устойчивости растений к действию различных доз UV-B-облучения показало, что для всех исследованных видов доза облучения 36,9 Дж/кв.м в течение 30 минут является летальной. При дозе выше 12,3 Дж/кв.м (10 минут облучения), но ниже летальной (39,9 Дж/кв.м) у всех растений наблюдались некрозы и потеря тургора. При дозе облучения 12,3 Дж/кв.м (в течение 5-6 или 10 минут) внешних признаков повреждения не наблюдалось. В связи с проведенными экспериментами изучение функционирования антиоксидантной защитной системы в дальнейшем проводилось в опытах с 10-минутным облучением при мощности 12,3 Дж/кв.м. Высокая скорость образования АФК предполагает функционирование в растении антиоксидантных защитных реакций.

В связи с вышесказанным представлялось важным провести комплексное исследование функционирования как низкомолекулярных компонентов антиоксидантной защитной системы, так и ферментов антиоксидантной природы у лекарственных растений. Как известно, антоцианы, каротиноиды и флавоноиды в нормальных условиях участвуют в поглощении световой энергии, а в стрессорных условиях являются частью фотозащитной и антиоксидантной систем. Поскольку антоцианы, каротиноиды и флавоноиды локализируются в эпидермальных клетках листа, исследования динамики их содержания проводили, прежде всего, в листьях опытных растений.

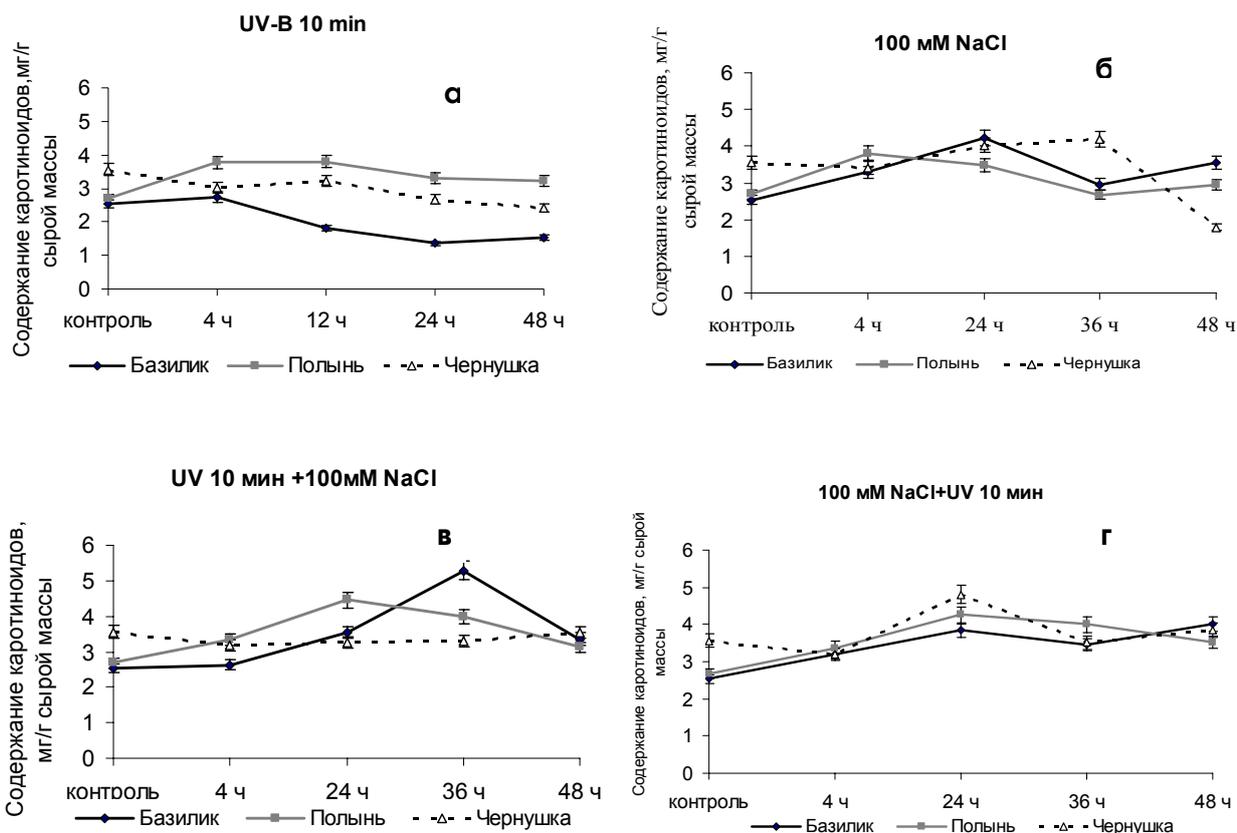


Рис. 1. Содержание каротиноидов в листьях растений, мг/г сырой массы. Обозначения: а – 10 мин UV-B, б – 100 mM NaCl, в – (10 мин UV-B, через сутки 100 mM NaCl), г – (24 час 100 mM NaCl, 10 мин UV-B, 100 mM NaCl)

Действие UV-B облучения на исследованные растения не приводило к существенным изменениям содержания каротиноидов (рис. 1а). Относительно стабильное поддержание уровня каротиноидов у растений может свидетельствовать о том, что действие UV-B не вызывало значительного повреждения мембран, поскольку каротиноиды являются липофильными антиоксидантами и предотвращающими окисление жирных кислот липидов клеточных мембран.

Исследование динамики содержания антоцианов показало, что у чернушки UV-B вызывал 3-х кратное транзиторное повышение содержания антоцианов в первые сутки после облучения. У полыни содержание антоцианов не изменялось, тогда как у базилика увеличение содержания антоцианов наблюдалось через 4-х час лаг-период (рис. 2а).

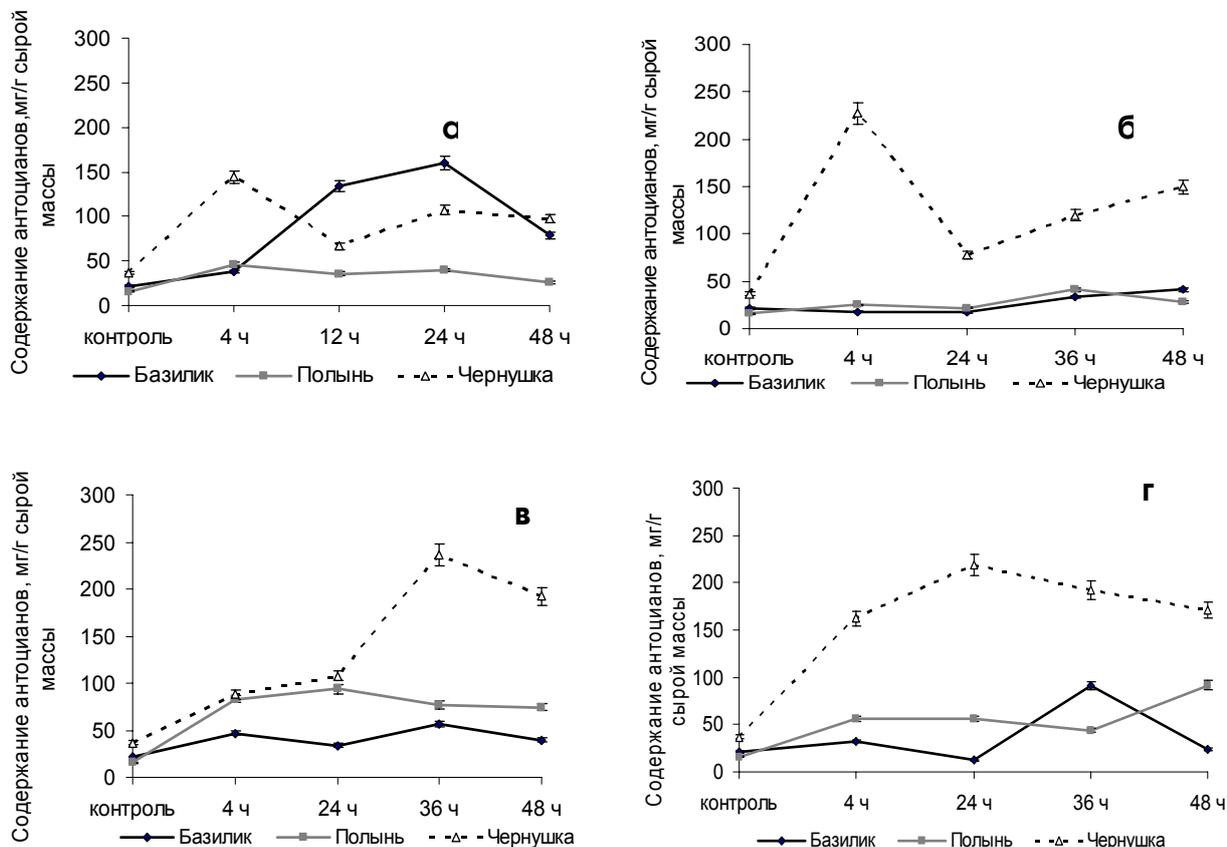


Рис. 2. Содержание антоцианов в листьях растений, мг/г сырой массы. Обозначения: а – 10 мин UV-B, б – 100 мМ NaCl, в – (10 мин UV-B, через сутки 100 мМ NaCl), г – (24 час 100 мМ NaCl, 10 мин UV-B, 100 мМ NaCl)

Как видно из рисунка 3а, действие UV-B облучения вызывало быстрое (в течение 4 часов после облучения) увеличение содержания флавоноидов у базилика и чернушки, тогда как у полыни незначительное повышение их содержания отмечалось лишь через сутки. Следует отметить, что для растений чернушки был характерен более высокий конститутивный уровень флавоноидов по сравнению с двумя другими видами растений.

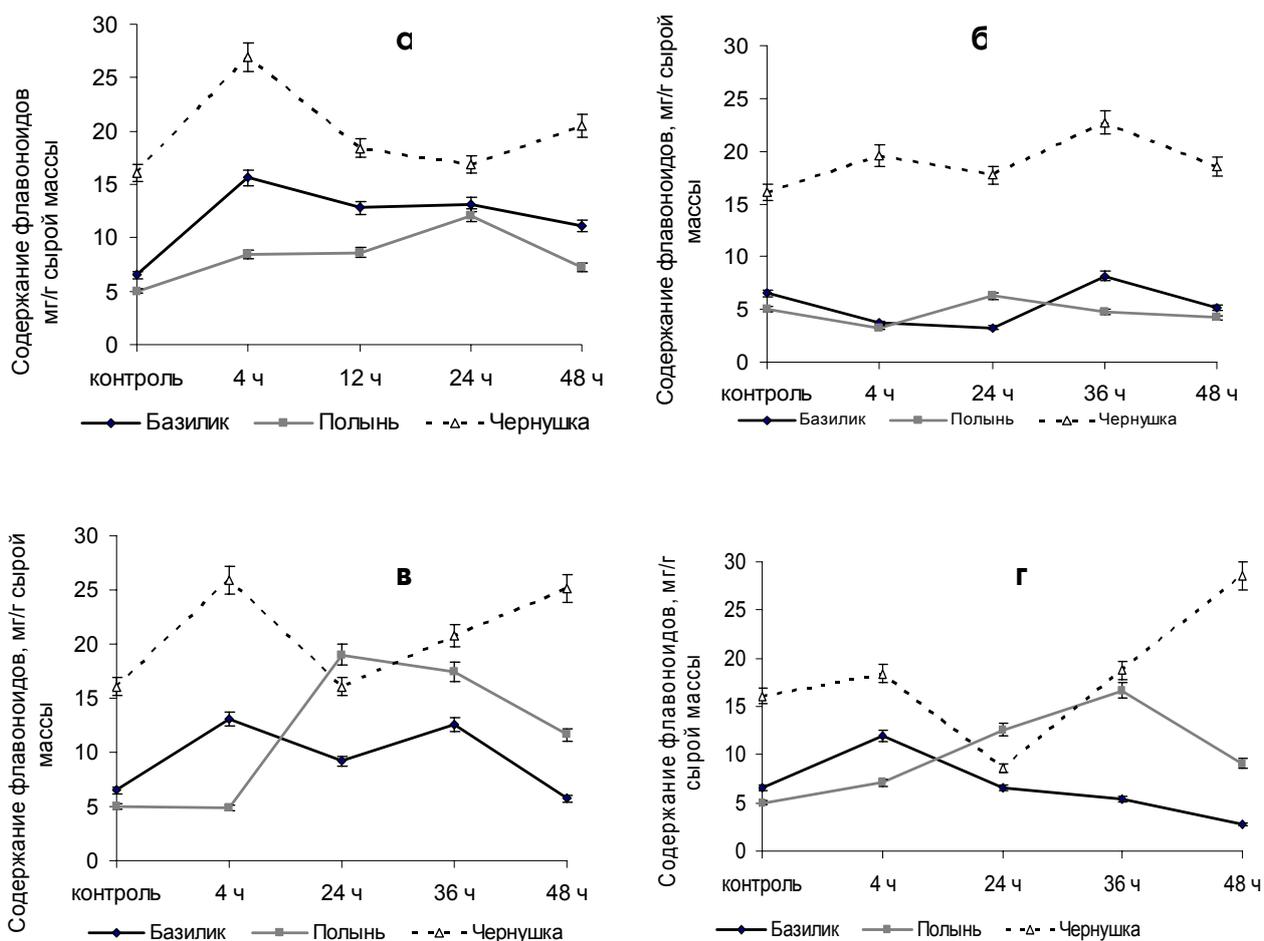


Рис. 3 Содержание флавоноидов в растениях чернушки, базилика и полыни, мг/г сырой массы. Обозначения: а – 10 мин UV-B, б – 100 мМ NaCl, в – (10 мин UV-B, через сутки 100 мМ NaCl), г – (24 час 100 мМ NaCl, 10 мин UV-B, 100 мМ NaCl)

Наиболее высокий конститутивный и UV-B-индуцированный уровень растворимых фенолов был характерен для листьев базилика (15 мг/г сыр веса), наименьший – для листьев полыни (5 мг/г сыр веса). В корнях исследованных растений содержание растворимых фенолов оставалось практически неизменным у чернушки и базилика, тогда как для полыни было характерно быстрое, но непродолжительное увеличение содержания фенолов через 4 ч после облучения. Принимая во внимание тот факт, что растворимые фенолы вовлекаются во множество метаболических реакций, увеличение их содержания может не коррелировать с изменениями в содержании как антоцианов, так и флавоноидов. Таким образом, проведенные исследования позволили выявить различия во временной динамике содержания фенольных соединений изучаемых растений. Важно также отметить, что способность того или иного растения к стресс-зависимой аккумуляции какой-либо из групп исследованных фенольных соединений может свидетельствовать о различной степени устойчивости

растений к действию UV-B облучения, а также может определяться таксономической спецификой вида.

UV-B, в отличие от многих других стрессоров, не вызывал у исследованных растений аккумуляцию универсального стресс-протекторного соединения пролина, обладающего антиоксидантным эффектом. При этом, тем не менее, следует отметить, что для листьев чернушки было характерно самое высокое конститутивное содержание пролина - 15,98 мг/ г сыр массы, тогда как у базилика и полыни его содержание не превышало 0,35- 0,37 мг/г сыр массы.

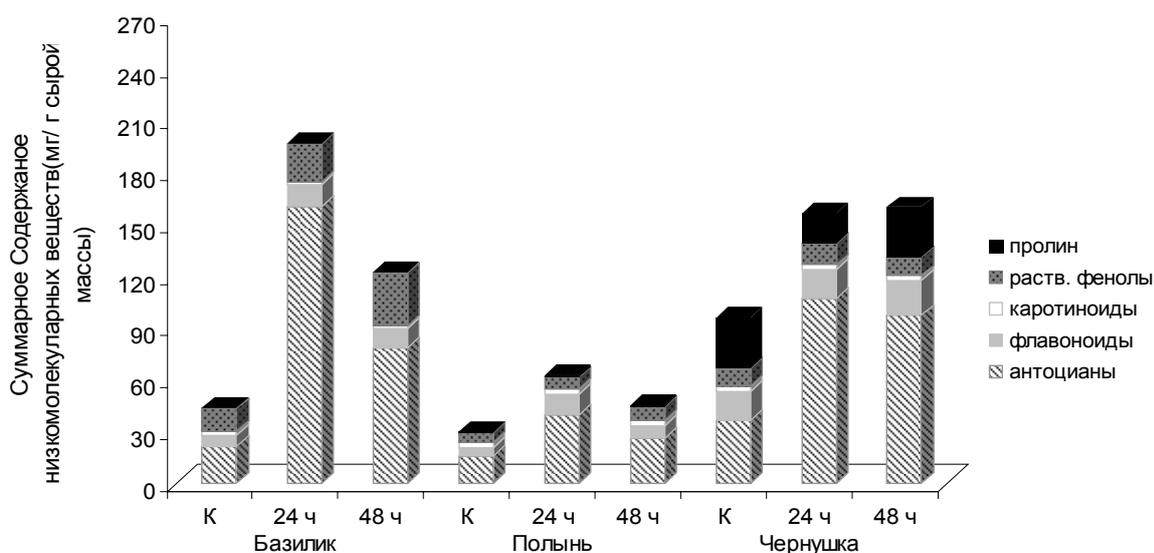


Рис. 4. Суммарное содержание низкомолекулярных веществ (мг/г сыр массы) в листьях исследованных растений через 24 ч и 48 ч после 10 мин UV-B облучения.

На рисунке 4 показан суммарный уровень низкомолекулярных соединений у исследованных лекарственных видов растений при действии UV-B облучения. Обращает на себя внимание тот факт, что временная кривая содержания анализируемых низкомолекулярных соединений у базилика и полыни носит выраженный одновершинный характер с максимумом через 24 час после действия UV-B. Анализ представленных данных свидетельствует о том, что способность к накоплению веществ фенольной природы коррелировала с устойчивостью растений к UV-B, а величина вклада каждой группы фенольных соединений характеризовалась видоспецифичностью. В контроле наибольшее содержание антоцианов было у базилика, наименьшее - у полыни; максимальное содержание флавоноидов - у чернушки, наименьшее - у полыни; самое высокое содержание растворимых фенолов характерно для базилика, значительно ниже двух других видов. Уровень каротиноидов различался у исследованных растений незначительно. Основываясь на

способности растений накапливать антиоксидантные метаболиты в контрольных условиях, можно расположить исследованные растения по степени снижения их конститутивной устойчивости к UV-B в следующий ряд: чернушка > базилик > полынь.

UV-B-индуцированная способность растений к аккумуляции протекторных метаболитов также характеризовалась видовой специфичностью. Так, через 24 ч после UV-B облучения пул низкомолекулярных соединений у базилика возрастал в 4-5 раз, у чернушки - в 1,5 раза, тогда как у полыни изменялся незначительно. Следует отметить, что в ответ на действие UV-B у базилика и чернушки в течение 48 час наблюдалось накопление антоцианов, которые оставались основным компонентом изученных низкомолекулярных соединений. Кроме антоцианов у базилика при действии UV-B возрастало количество растворимых фенолов. Изменения в содержании пролина отмечались только у чернушки, но не у базилика и полыни. Это говорит в пользу идеи о том, что аминокислотный пул (глутамата и аспартата), из которого синтезируются фенилаланин и тирозин, расходуется преимущественно на UV-B-индуцируемую аккумуляцию фенольных соединений, а не пролина. Сравнение абсолютного содержания низкомолекулярных метаболитов у растений через 48 час после действия UV-B, свидетельствует о том, что наибольшее их количество накапливается у чернушки, наименьшее – у полыни; при этом базилик занимает промежуточное положение, что соответствует уровню их устойчивости к UV-B облучению.

*Изменение активностей антиоксидантных ферментов в стрессорном ответе лекарственных растений на UV-B облучение.*

В ответ на действие UV-B облучения в листьях чернушки и базилика не наблюдалось существенных изменений активности ключевого фермента антиоксидантной защиты - СОД (рис. 5а), тогда как ее активность в полыни возрастала примерно в 2 раза. Исследование изоферментного состава данного фермента показало, что при действии UV-B облучения в листьях растений не появлялось новых изоформ СОД; при этом активность обнаруженных изоформ практически не изменялась. Реальное отсутствие выраженной UV-B-зависимой стимуляции СОД в листьях исследованных растений могло объясняться тем, что основную протекторную роль при действии UV-B в данном случае выполняли органические

антиоксиданты фенольной природ, а не антиоксидантные ферменты.

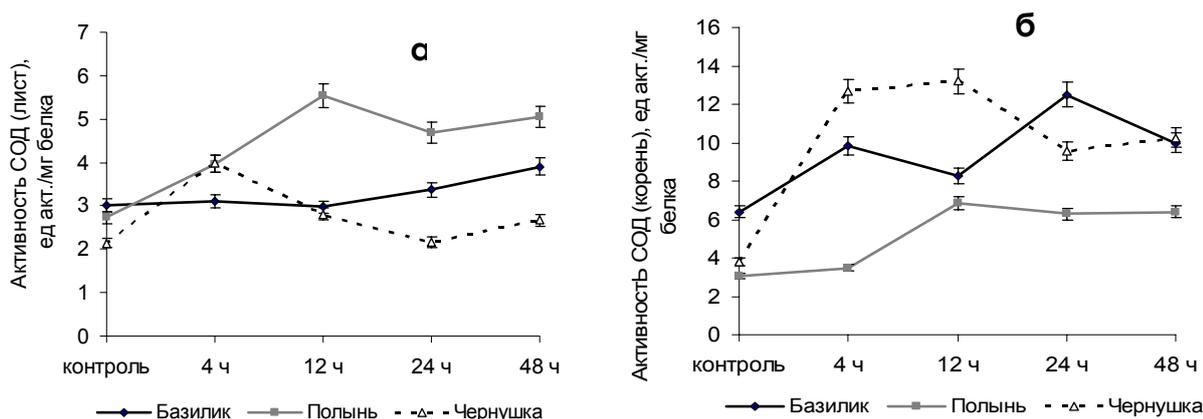


Рис.5. Активность СОД у растений после 10 мин UV-B облучения (а- лист, б- корень)

Существенно, что в корнях конститутивный уровень активности СОД у всех исследованных растений был значительно выше, чем в листьях. При этом у базилика активность СОД увеличивалась через 4 и 24 ч после облучения, тогда как у чернушки наблюдалось транзиторное увеличение активности с максимумом через 4 – 12 час. Низкая конститутивная активность СОД в корнях чернушки коррелировала с более высоким содержанием в них пролина. Такая корреляция между уровнем пролина и активностью СОД была отмечена у ряда дикорастущих растений (Радюкина и др., 2007, Шевякова и др., 2009). Подобно активности СОД, активность гваякол-зависимой пероксидазы в листьях также оставалась практически постоянной. Активность свободной формы пероксидазы в корнях была выше, чем в листьях, что также положительно коррелировало с активностью СОД (рис. 5б, 8 б). Можно полагать, что пероксидаза в корнях исследованных растений была основным  $H_2O_2$ -детоксифицирующим ферментом, тогда как в листьях ключевую роль в условиях окислительного стресса играли низкомолекулярные антиоксиданты (каротиноиды, антоцианы и флавоноиды).

#### *Исследование стрессорного ответа растений чернушки, базилика и полыни на засоление*

Многие лекарственные растения чувствительны к действию засоления (Ramin, 2005). Некоторым исключением из этого ряда является полынь, которая способна произрастать на солонцеватых почвах. При выборе интенсивности засоления нами были проведены предварительные эксперименты с различными концентрациями хлорида натрия – 100, 200 и 300 мМ. Оказалось, что концентрацию 100 мМ NaCl выдерживали все исследуемые виды растений, хотя через сутки они обнаруживали некоторые признаки негативного действия соли, в частности потерю тургора. Более высокие концентрации NaCl вызывали сильные внешние проявления стресса, особенно у растений базилика. По этой

причине для последующих исследований была выбрана концентрация 100 мМ NaCl, ранее использованная нами в исследованиях на других видах гликофитов (Радюкина и др., 2007). Принимая во внимание тот факт, что при изучении действия UV-B облучения на лекарственные растения была показана важная роль фенольных соединений в поддержании резистентности, представлялось вполне вероятным, что фенольные соединения могут вовлекаться в защиту растений также и от повреждающих факторов иной природы, в частности засоления.

В отличие от UV-B облучения, засоление вызывало заметное повышение содержания каротиноидов у всех исследованных растений (рис.1б). Вместе с тем, как видно из рисунка 2б, при действии засоления способность к аккумуляции антоцианов в листьях обнаруживалась лишь у чернушки. Временная динамика содержания антоцианов у этого растения носила близкий характер при действии UV-B облучения и 100 мМ NaCl, однако в условиях засоления повышение содержания антоцианов было более значительным и в 5 раз превосходило исходный уровень, тогда как при UV-B облучении – лишь в 3-раза. У базилика засоление, напротив, не влияло на аккумуляцию антоцианов, чем принципиально отличалось он реакции этого вида на UV-B (рис. 2 б). В то же самое время у полыни ни один из двух стрессоров не приводил к изменениям в содержании антоцианов.

Помимо этого, засоление, в отличие от действия UV-B облучения, не вызывало повышения содержания флавоноидов ни у одного из исследованных видов растений (рис. 3 б). Вместе с тем при солевом стрессе наблюдалось увеличение содержания растворимых фенолов как в листьях, так и в корнях растений. Возможно, ингибирование NaCl ферментов синтеза высокомолекулярных фенольных соединений – флавоноидов и антоцианов - способствовало увеличению содержания растворимых фенолов.

Универсальный ответ растений на засоление, который проявляется в аккумуляция пролина, проявлялся лишь в листьях чернушки и корнях полыни. Причем, в этих растениях максимуму пролина в листьях, как правило, соответствовал минимум в корнях, что указывало на возможность его межорганного транспорта (рис.6а,б).

Анализ данных, представленных на рис. 7, показывает, что динамика суммарного содержания низкомолекулярных соединений у исследованных растений при засолении существенно отличалась от таковой при UV-B облучении (рис. 4). Это проявлялось, прежде всего, в том, что если при UV-B облучении временная кривая накопления низкомолекулярных протекторных соединений носила четко выраженный одновершинный характер, то при засолении наблюдалась их постепенная аккумуляция, уровень которой достигал максимума к 48 час солевого стресса. Кроме того, у базилика при засолении значительно меньше аккумулировалось антоцианов, но несколько увеличивалось содержание

растворимых фенолов и каротиноидов, тогда как у полыни незначительно возрос уровень пролина и каротиноидов.

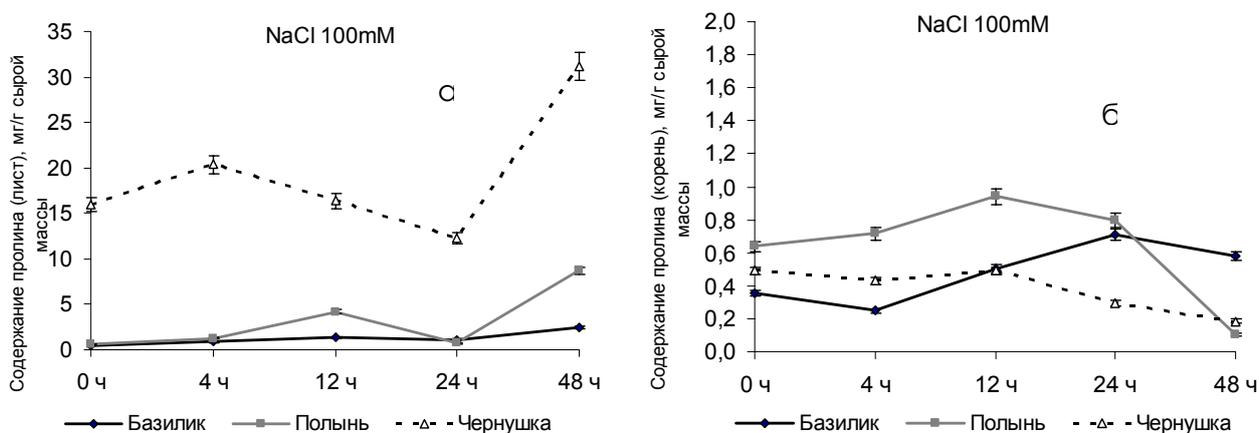


Рис.6. Изменение содержания пролина в растениях при засолении. (а- лист, б- корень)

У чернушки при засолении увеличение пула низкомолекулярных соединений было меньшей мере выражено, чем при действии UV-B облучения (1,5 раза), хотя способность к интенсивному накоплению антоцианов сохранялась. Это могло быть связано с тем, что растения чернушки характеризовались высоким уровнем конститутивного и стресс-индуцированного содержания пролина (рис. 7), который, действуя как антиоксидант или химический шаперон, предотвращал инактивацию ключевых ферментов фенольного метаболизма (фенилаланинаммиаклиазы и халконсинтазы) при засолении и тем самым способствовал поддержанию на высоком уровне пула фенольных соединений.

*Влияние хлоридного засоления на активности антиоксидантных ферментов у растений базилика, полыни и чернушки.*

Полученные данные свидетельствуют о том, что, подобно действию UV-B облучения, засоление вызывало некоторое увеличение активности СОД в листьях полыни и базилика, но не чернушки (рис. 8а). При этом в листьях базилика и полыни появлялись NaCl-индуцированные Cu/Zn изоформы СОД. В корнях стимуляция активности СОД при засолении наблюдалось у базилика, в незначительной степени - у полыни (рис. 8б). Причем, у полыни слабое транзитное повышение активности СОД в корневой системе совпадало по времени с минимальным содержанием пролина (рис. 6б и 8б). Активность свободной формы

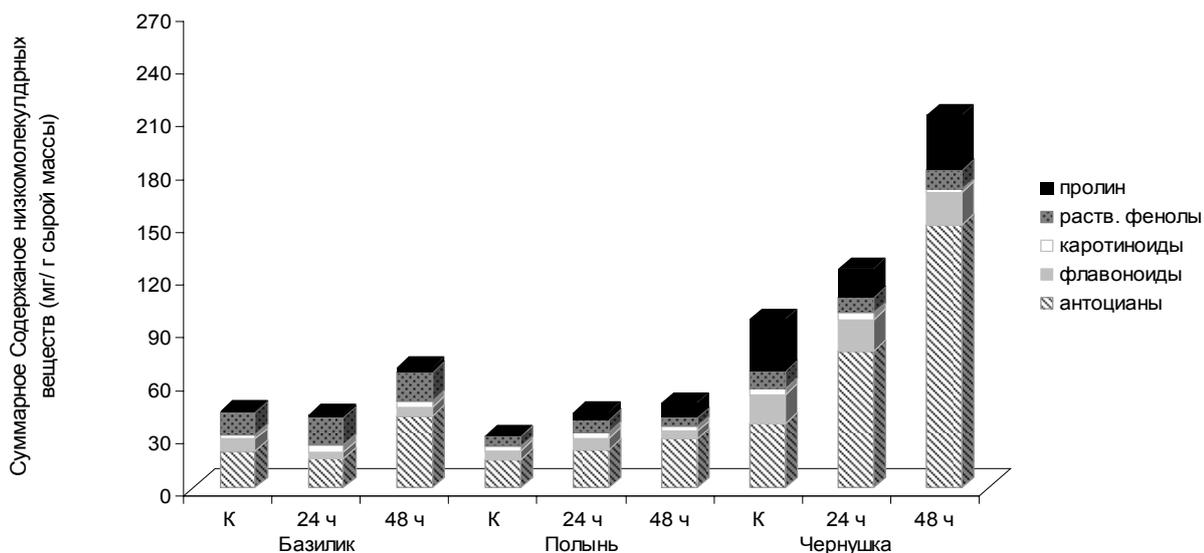


Рис. 7. Суммарное содержание низкомолекулярных соединений через 24 ч после начала обработки NaCl

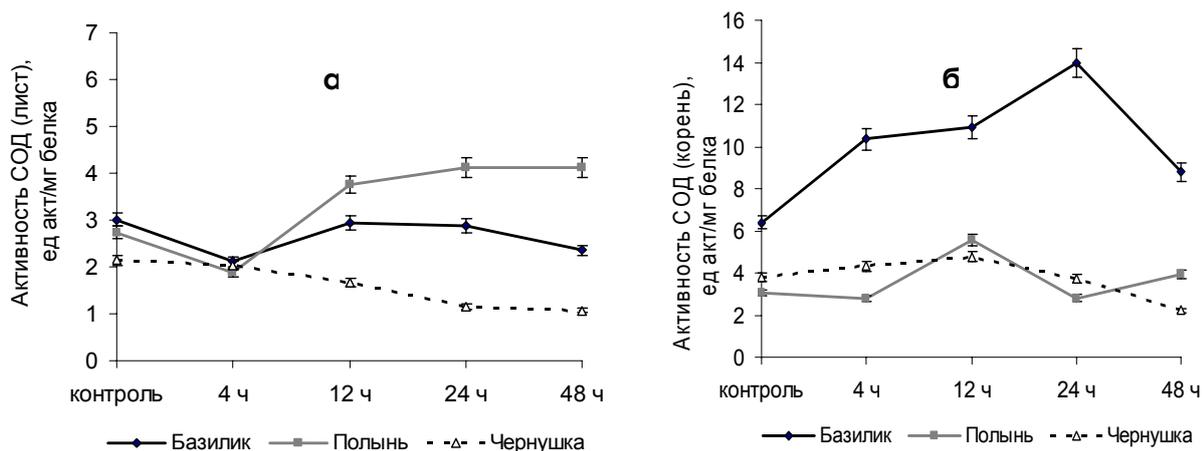


Рис. 8. Активность СОД в растениях при действии засоления (а – листья, б - корни)

гваякол-зависимой пероксидазы в листьях исследуемых растений также оставалась практически неизменной, тогда как в корнях полыни и базилика наблюдалось значительное повышение активности этого фермента после 24 ч произрастания на среде с NaCl. Суммируя представленные выше данные можно заключить, что из исследуемого набора параметров при раздельном действии засоления и UV-B облучения наиболее серьезные различия наблюдались в изменении суммарного содержания низкомолекулярных антиоксидантов. Активности же антиоксидантных ферментов преимущественно изменялись в корнях исследованных растений; при этом временная динамика изменения активности ферментов была аналогичной при действии UV-B и NaCl. Следует при этом отметить, что конститутивный уровень активности СОД был более высоким у базилика и полыни, чем у

чернушки, и обратно коррелировал с суммарным содержанием низкомолекулярных соединений. Можно на этом основании сделать заключение, что способность исследуемых растений к интенсивному биосинтезу низкомолекулярных соединений, очевидно, является определяющим фактором развития стресс-толерантности этих видов.

*Стрессорный ответ лекарственных растений на последовательное (совместное) действие UV-B облучения и хлоридного засоления.*

В природных условиях растения находятся, как правило, под действием нескольких отрицательных факторов; характер взаимодействия этих факторов может носить синергический, аддитивный или антагонистический характер. Так, например, известно, что устойчивость растений хлопчатника к засолению может быть индуцирована предварительным тепловым шоком (Kuznetsov et al., 1993), тогда как кратковременная предобработка растений тыквы UV-B, напротив, снижала их термотолерантность (Борисова и др., 1999). В связи с этим, важно было исследовать динамику содержания ряда низкомолекулярных антиоксидантов, а также антиоксидантных ферментов (СОД и гваяколовой пероксидазы) у лекарственных растений в условиях последовательного (одновременного) действия UV-B облучения и NaCl. С этой целью были использованы две схемы опытов: первая – растения подвергались 10 мин UV-B облучения и затем, спустя 24 час) 100 мМ NaCl; вторая – растения 24 часа подвергались засолению (100 мМ NaCl), затем - 10 мин UV-B облучению и снова засолению.

*Динамика содержания низкомолекулярных антиоксидантов в лекарственных растениях при последовательном действии UV-B облучения и NaCl.*

На рисунках 1в – 3в представлена временная динамика содержания антоцианов, каротиноидов и флавоноидов при последовательном действии UV-B и хлорида натрия. Как видно из рисунка 2в, при такой схеме опыта аккумуляция антоцианов у чернушки начиналась примерно на сутки позже, чем при действии каждого из факторов в отдельности. У базилика UV-B индуцированное накопление антоцианов в отсутствие NaCl (Рис. 2а), полностью снималось последующим действием засоления (Рис. 2в). У полыни последовательное действие двух факторов вызывало незначительное увеличение содержания антоцианов (Рис. 2в).

Содержание флавоноидов и, в меньшей степени, каротиноидов повышалось у всех исследованных растений при последовательном действии UV-B облучения и NaCl (Рис. 1в, 3в). Динамика содержания флавоноидов отличалась от таковой при действии UV-B и засоления по отдельности. У полыни и базилика совместное действие двух факторов

вызывало повышение содержания флавоноидов, в то время как ни один из стрессоров в отдельности таким эффектом не обладал. В отличие от 2-х указанных выше видов растений, у чернушки засоление практически не влияло на динамику содержания флавоноидов, наблюдаемую в условиях кратковременного действия UV-B. Совместное действие двух факторов вызывало более продолжительное повышение содержания растворимых фенолов в листьях и корнях базилика, тем не менее, для полыни оно было ниже, чем в других вариантах опыта.

Накопление пролина в листьях растений при последовательном действии UV-B облучения и NaCl наблюдалось у всех исследованных видов (Рис. 9а). При этом максимальное содержание пролина обнаруживалось в листьях чернушки, тогда как в листьях полыни и базилика его уровень возрастал лишь в 3-5 раз. В корнях чернушки и базилика уровень пролина несколько возрастал, достигая максимума через 24 час, тогда как у полыни он оставался на постоянном уровне (Рис. 9б). Следует обратить внимание на тот факт, что у чернушки максимум содержания пролина в корнях соответствовал минимуму в листьях.

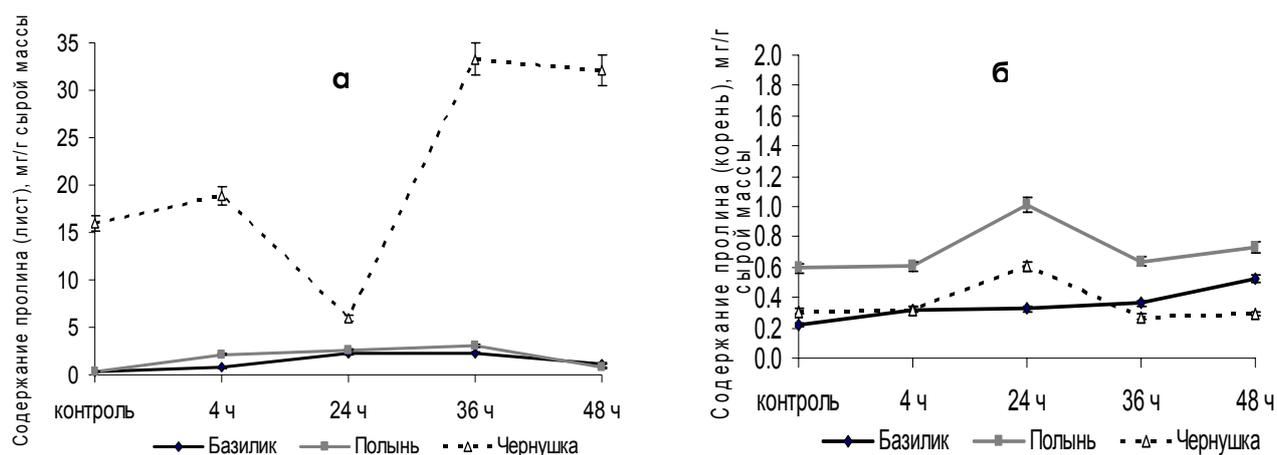


Рис. 9 Содержание пролина в листьях (а) и корнях (б) при последовательном действии 10 мин UV-B облучения и 100 мМ NaCl.

Сравнительный анализ динамики суммарного содержания низкомолекулярных защитных соединений при последовательном действии UV-B облучения и NaCl показал, что через 24 ч после начала воздействия NaCl у базилика и полыни наблюдалось увеличение содержания антоцианов, фенолов и флавоноидов, подобно тому, как это имело место при одном UV-B облучении. При этом NaCl оказывал ингибирующий эффект на процесс аккумуляции низкомолекулярных антиоксидантов по сравнению с действием одного UV-B (рис. 4, 7, 10). Тем не менее, временная кривая накопления низкомолекулярных антиоксидантов при последовательном действии 2-х факторов у полыни и базилика, в

отличие от чернушки, как и при воздействии одного UV-B облучения, носила выраженный одновершинный характер. Существенно, что через 48 ч эксперимента в листьях чернушки значительно увеличивалась доля пролина в сумме низкомолекулярных соединений. Таким образом, UV-B воздействие, предшествовавшее засолению, способствовало более интенсивной аккумуляции низкомолекулярных соединений фенольной природы, особенно антоцианов, у базилика и полыни по сравнению с действием одного NaCl, а также пролина у растений чернушки. Весьма вероятно, что предварительное UV-B облучение лекарственных растений способствовало сохранению активности ключевых ферментов фенольного метаболизма, что сопровождалось более интенсивным накоплением антиоксидантных соединений и повышением солеустойчивости растений.

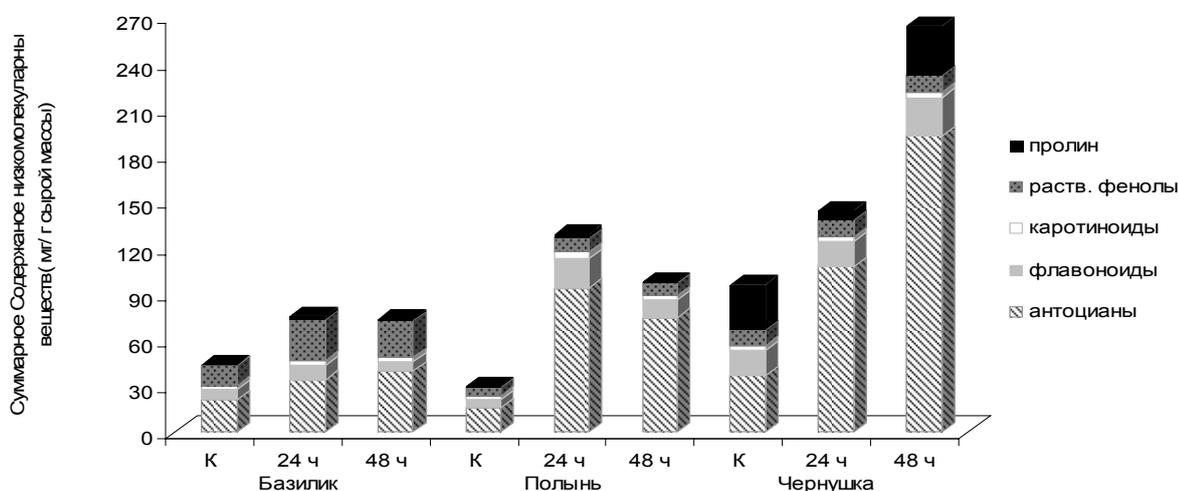


Рис 10. Суммарное содержание низкомолекулярных соединений в листьях лекарственных растений при совместном действии 10 мин UV-B облучения и 100 мМ NaCl (мг/г сырой массы).

*Изменения активностей антиоксидантных ферментов при последовательном действии 10 мин UV-B облучения и 100 мМ NaCl.*

Последовательное действие UV-B облучения и 100 мМ NaCl не вызывало существенных изменений активности СОД в листьях растений полыни и базилика по сравнению с воздействием каждого из факторов по отдельности (Рис. 11а). В то же самое время в корнях растений базилика и чернушки активность СОД была выше в условиях кратковременного воздействия одного UV-B облучения по сравнению с последовательным действием 2-х факторов (Рис. 5, 8, 11). Полученные данные показывают, что предварительный 10 мин UV-B предотвращал NaCl-индуцированное повышение активности СОД в корнях базилика (Рис. 8, 11б). При этом в листьях полыни и базилика, также как при

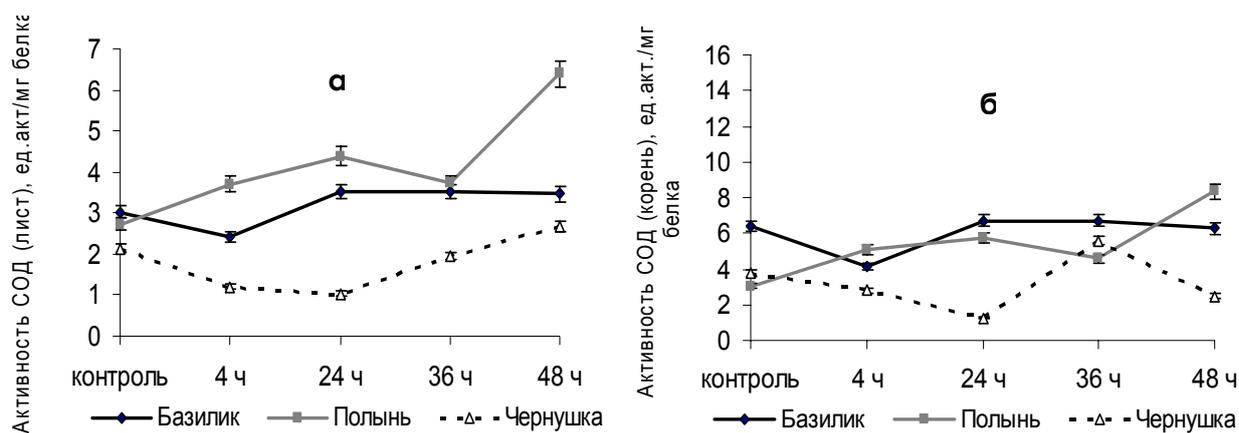


Рис. 11 Активность СОД в растениях при последовательном действии UV-B + NaCl (а - в листьях, б- в корнях)

действии одного засоления, наблюдалось изменение изоферментного состава СОД в листьях. Динамика активности пероксидазы существенно не отличалась от таковой при действии UV-B облучения, NaCl или при их последовательном действии. В то самое время в последнем случае в корнях полыни наблюдалось 2-х кратное повышение активности пероксидазы. В целом тем не менее можно полагать, что предварительное UV-B облучение растений стимулирует накопление низкомолекулярных антиоксидантов, которые снижают интенсивность окислительного стресса и тем самым повышают устойчивость растений к последующему засолению. В пользу этой точки зрения свидетельствует тот факт, что активность антиоксидантных ферментов при последовательном действии 2-х факторов не превышает, а в ряде случаев имеет даже более низкие значения по сравнению с активностью при раздельном действии каждого из факторов.

*Динамика содержания низкомолекулярных антиоксидантов в тканях растений при последовательном действии 100 мМ NaCl, 10 мин UV-B облучения .*

Изучение устойчивости растений базилика, полыни и чернушки к засолению показано, что базилик является наиболее чувствительной культурой, тогда как чернушка – наиболее устойчивой. Как было показано выше, предварительное облучение растений UV-B активировало биосинтез фенольных соединений и снижало негативный эффект последующего засоления. В связи с этим, было важно исследовать, насколько предварительное засоление может влиять на резистентность культур к действию UV-B облучения на фоне солевого стресса.

Для ответа на этот вопрос растения обрабатывали 100 мМ NaCl в течение суток, затем подвергали их 10 мин облучению UV-B и в дальнейшем исследовали антиоксидантную

систему в условиях солевого стресса. Как показывают полученные данные (рис. 1г), характер изменения содержания каротиноидов во времени, так же как и их абсолютные значения практически не отличались у всех трех видов растений при действии UV-B, 100 мМ NaCl или при их последовательном действии (Рис. 1а-г). Как и следовало ожидать, ингибирующее действие засоления на UV-B-индуцируемую аккумуляцию антоцианов у базилика на последнем этапе эксперимента частично снималось кратковременным UV-B облучением (рис. 2а,г). У чернушки аккумуляция антоцианов при использованной постановке опыта была значительно более выражена, чем во всех других вариантах обработки растений и продолжалась в течение всего экспериментов. Полынь отвечала на обработку UV-B после предварительного засоления незначительным ростом содержания антоцианов (рис. 2г). Динамика содержания флавоноидов у всех исследуемых видов растений мало отличалась от таковой при последовательном действии UV-B и 100мМ NaCl (Рис. 3г). Следует отметить, что действие двух факторов в любой последовательности вызывало увеличение содержания флавоноидов в отличие от действия факторов в отдельности (рис.3 а-г). Содержание растворимых фенолов повышалось в листьях только у базилика, тогда как в корнях - у базилика и полыни. Динамика содержания фенолов у всех растений не отличалась от таковой в экспериментах с UV-B облучением, предшествовавшим солевому стрессу.

Аккумуляция пролина при последовательном действии засоления и UV-B облучения наблюдалось в листьях чернушки и в корнях базилика и полыни (рис. 12а,б).

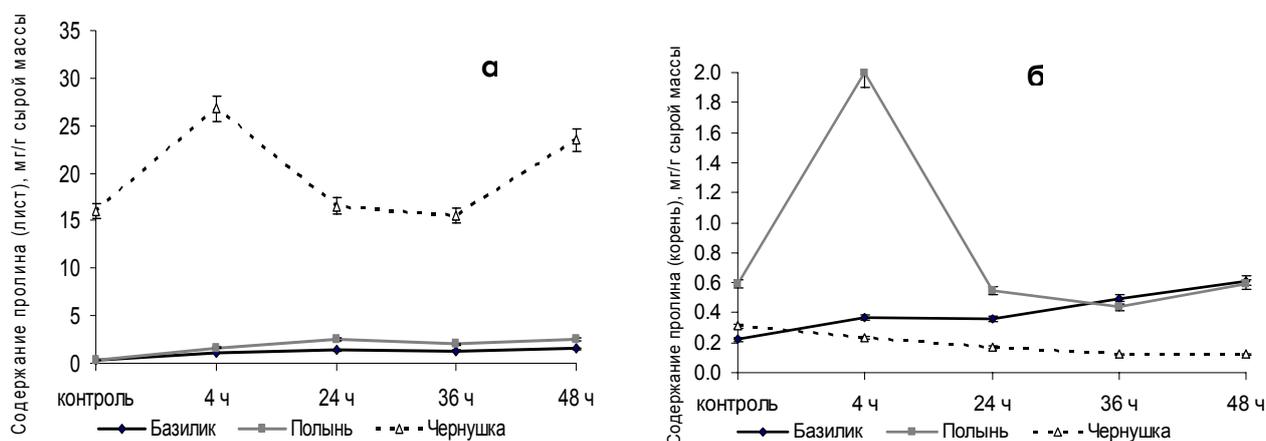


Рис. 12 Содержание пролина в растениях при последовательном действии 100 мМ NaCl и 10 мин UV-B облучения на фоне солевого стресса (а – листья, б – корни)

Анализируя диаграмму, представленную на рис. 13, следует отметить, что согласно этой схеме эксперимента растения непрерывно находились в условиях солевого стресса, который прерывался через 24 ч от начала засоления 10 мин UV-B облучением. При этом временная кривая аккумуляции низкомолекулярных антиоксидантов у базилика и полыни по своему

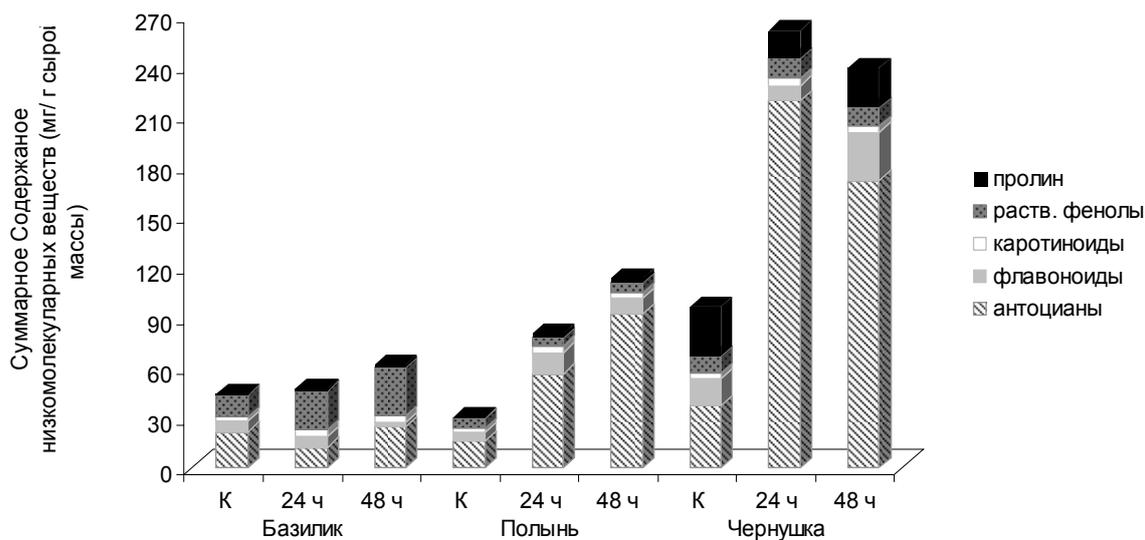


Рис. 13. Суммарное содержание низкомолекулярных антиоксидантов в листьях растений при последовательном действии 100 мМ хлорида натрия и 10 мин UV-B облучения.

характеру была аналогична кривой, наблюдаемой в условиях засоления (Рис. 7), а не в условиях кратковременного UV-B облучения (Рис. 4). Вместе с тем прерывание солевого стресса 10 мин UV-B облучением сопровождалось стимуляцией накопления низкомолекулярных антиоксидантов по сравнению с действием одного NaCl (Рис. 4 и 13). Более подробный анализ показывает, что при действии UV-B облучения в условиях засоления у базилика увеличивалась доля растворимых фенолов и антоцианов, что также приводило к увеличению суммарного вклада низкомолекулярных соединений, тогда как у полыни суммарное содержание низкомолекулярных соединений увеличивалось по сравнению с контролем, тогда как вклад каждой группы антиоксидантов практически не изменялся. У чернушки сумма низкомолекулярных соединений возрастала в 2-3 раза за счет увеличения доли антоцианов, превышая их содержание не только при действии одного NaCl, но и UV-B облучения. При этом стимулирующее действие кратковременного UV-B облучения в условиях солевого стресса проявлялось в максимальной аккумуляции низкомолекулярных антиоксидантов уже через 24 час стрессорного воздействия (Рис. 13). Таким образом, способность данного растения аккумулировать низкомолекулярные антиоксиданты зависит не только от специфики вида, но также от природы и последовательности стрессорного воздействия.

*Изучение активностей антиоксидантных ферментов в растениях при последовательном действии 100 мМ хлорида натрия и 10 мин UV-B облучения.*

В опытах с различной последовательностью действия NaCl и UV-B на лекарственные растения не было выявлено существенных различий во временной зависимости изменения активности СОД (Рис.14 а,б). В то же самое время активность СОД в корнях при последовательном действии засоления и UV-B облучения значительно уступала активности этого фермента при UV-B, а в случае с растениями базилика, также и при солевом стрессе (Рис. 5, 8, 14). Можно предположить, что независимо от последовательности действия NaCl и UV-B, кратковременное воздействие UV-B сопровождается стимуляцией накопления низкомолекулярных антиоксидантов, следствием чего является снижение интенсивности окислительного стресса и повышение устойчивости растений к повреждающему солевому воздействию. Тем не менее, при последовательном действии засоления и ультрафиолета наблюдались изменения изоферментного состава изоформ СОД, а также повышалась активность пероксидазы в листьях базилика и в корнях полыни.

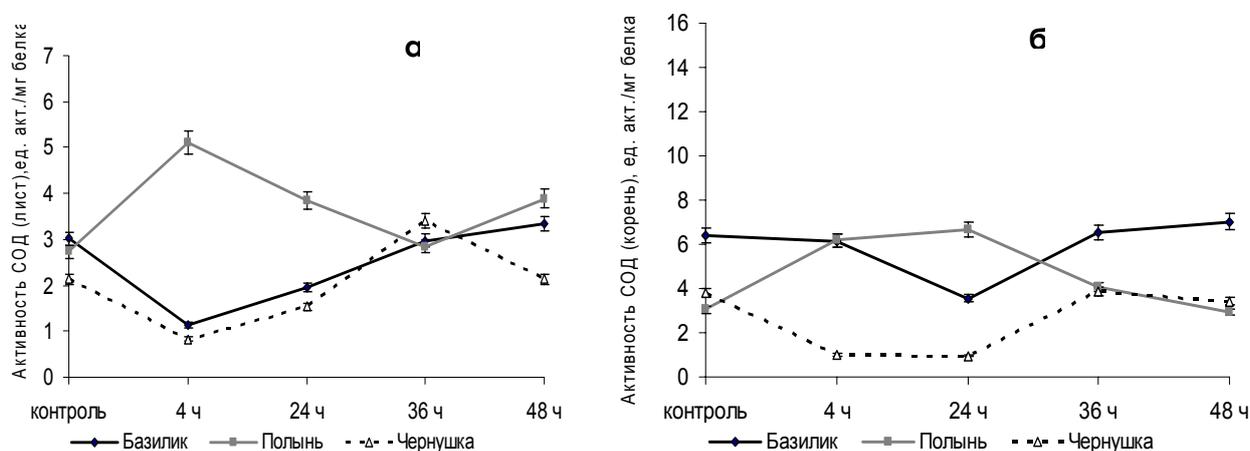


Рис. 14 Активность СОД в растениях при последовательном действии 100 мМ хлорида натрия, а затем 10 мин UV-B облучения (а – листья, б – корни).

Таким образом, можно заключить, что обработка UV-B в течение 10 мин способствовала накоплению низкомолекулярных соединений фенольной природы у всех исследованных видов растений, в то время как засоление дифференцированно повышало аккумуляцию пролина. При этом стресс-протекторный эффект кратковременного UV-B облучения как таковой не зависел от последовательности солевого воздействия на растение, хотя его абсолютное выражение этого защитного эффекта определялось видоспецифичностью и последовательностью действия повреждающих факторов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос о механизмах адаптации растений к последовательному или совместному действию двух или нескольких неблагоприятных факторов внешней среды в настоящее

время наименее исследован. Явление повышения устойчивости к данному фактору в результате адаптации к фактору иной природы получило название кросс-адаптации. Для выяснения механизмов кросс-адаптации важная роль может принадлежать антиоксидантным системам, сформированным в процессе длительной эволюции и характеризующимся определенной неспецифичностью к природе повреждающего воздействия, чему и посвящена была данная работа. В настоящее время практически отсутствуют публикации о выяснении вклада различных групп низкомолекулярных соединений в функционирование клеточной антиоксидантной системы. Еще меньше работ, в которых исследуется функционирование антиоксидантных ферментов и аккумуляция низкомолекулярных антиоксидантов в условиях стресса. Сложность изучения данной проблемы заключается в том, что усиление биосинтеза одного из низкомолекулярных соединений влечет за собой изменения в метаболизме в целом и перераспределение пула субстратов и энергетических затрат. Так, стресс-зависимый биосинтез пролина, требует большего количества глутамата. В итоге расход глутамата в этой метаболической реакции снижает его пул, необходимый для других метаболических путей.

В данной работе мы ставили задачу проследить изменение вклада нескольких низкомолекулярных антиоксидантов и ряда антиоксидантных ферментов в защитный ответ растений на действие UV-B и засоления, а также их последовательного действия. Принимая во внимание тот факт, что объектами исследований являлись лекарственные растения, в которых важную роль играют вторичные метаболиты фенольной природы, мы изучали динамику содержания этих веществ, а также пролина, как универсального стресс-протекторного метаболита. Проведенные исследования показали, что все три вида растений обладали толерантностью к действию умеренной дозы UV-B облучения. При этом устойчивость этих растений коррелировала с суммарным содержанием фенольных соединений. Среди фенольных соединений наибольший вклад в защитный ответ вносили антоцианы, содержание которых в условиях UV-B облучения у чернушки и базилика выросло в 3-5 раз через 24 ч после облучения. Каротиноиды, флавоноиды и растворимые фенолы вносили менее заметный вклад в увеличение суммарного содержания низкомолекулярных соединений при UV-B облучении. Высокий конститутивный уровень пролина отмечен только для чернушки. При действии UV-B облучения заметных изменений в содержании этого метаболита не наблюдалось ни у одного из исследованных растений. Активности антиоксидантных ферментов – СОД и гваякол-зависимой пероксидазы - были более или менее постоянными в листьях и имели более низкие значения, чем в корнях. В корнях только у полыни и базилика наблюдалось стресс-зависимое повышение активностей обоих ферментов. Для чернушки характерно снижение их активностей. Такая динамика может свидетельствовать о более эффективном участии низкомолекулярных соединений в

защитном ответе, чем ферментов-антиоксидантов. Сравнение накопления антоцианов у трех видов растений при действии UV-B и засоления показано, что при засолении процесс аккумуляции антоцианов сохраняется только у чернушки. Количество каротиноидов, флавоноидов и растворимых фенолов при засолении увеличивалось в отличие от действия облучения. Можно предполагать, что из-за ингибирования засолением биосинтеза антоцианов базилик оказался наиболее чувствительным к NaCl. Однако в условиях засоления в листьях всех исследованных видов растений через двое суток происходило увеличение содержания пролина, что говорит в пользу его ведущей роли в определении уровня солеустойчивости вида.

В условиях кросс-адаптации растений к последовательному действию UV-B и NaCl или, наоборот, NaCl и UV-B оказалось, что уровни аккумуляции низкомолекулярных антиоксидантов и активностей антиоксидантных ферментов определялись не только природой действующего фактора и видовой спецификой растения, но и последовательностью воздействия стрессоров. Обработка растений UV-B, а затем NaCl, сопровождалась более интенсивным накоплением низкомолекулярных веществ, чем при действии этих факторов в обратной последовательности. В последнем случае засоление оказывало интенсивное ингибирующее воздействие на UV-B индуцированную аккумуляцию низкомолекулярных антиоксидантов. Однако в обоих случаях кратковременное UV-B облучение стимулировало аккумуляцию низкомолекулярных антиоксидантов в растениях, прежде всего антоцианов, практически не влияя или даже ингибируя активности антиоксидантных ферментов. Это говорит не только о том, что повышение в ответ на действие UV-B содержания антиоксидантных веществ снижает интенсивность окислительного стресса, но и свидетельствует в пользу ведущей роли низкомолекулярных антиоксидантов в процессе кросс-адаптации лекарственных растений к последовательному действию стрессоров различной физической природы.

## **Выводы**

1. Сравнительная оценка уровня резистентности 3-х видов лекарственных растений флоры Египта позволила установить, что наиболее устойчивыми к UV-B облучению и NaCl являются растения чернушки; тогда как наименьшей устойчивостью к солевому стрессу характеризуются растения базилика, а к повреждающему действию UV-B – растения полыни. При этом показано, что устойчивость растений к NaCl и UV-B облучению коррелировала с уровнем аккумуляции пролина и фенольных соединений.

2. Исследование функционирования клеточной антиоксидантной системы у чернушки свидетельствует о том, что в основе высокой устойчивости этого растения к

раздельному действию UV-B облучения и солевого стресса лежит, прежде всего, их способность к конститутивному синтезу пролина и UV-B зависимой аккумуляции фенольных соединений, прежде всего антоцианов, а не функционирование антиоксидантных ферментов (СОД и пероксидазы).

3. Анализ стрессорной реакции менее устойчивых растений базилика и полыни к раздельному действию UV-B и NaCl показывает, что временная кривая аккумуляции суммарного содержания низкомолекулярных антиоксидантов (антоцианы, флавоноиды, растворимые фенолы) при UV-B облучении носит выраженный одновершинный характер, тогда как при солевом стрессе наблюдается плавный рост содержания антиоксидантов в течение всего эксперимента. Наибольший вклад среди фенольных соединений в защитный эффект вносили антоцианы, содержание которых через 24 час после UV-B облучения возрастало в 3 - 5 раз.

4. Проведение экспериментов по кросс-адаптации растений к абиотическим факторам различной природы свидетельствует о том, что кратковременное UV-B облучение (10 мин 12,3 Дж/кв.м) повышает устойчивость растений к последующему воздействию солевого стресса (100 мМ NaCl). В основе солезастойчивого эффекта UV-B радиации лежит ее способность индуцировать в растениях аккумуляцию низкомолекулярных антиоксидантов фенольной природы, которые снижают интенсивность окислительного стресса, что сопровождается повышением устойчивости к последующему действию NaCl.

5. Изучение ответа растений на последовательное действие 100 мМ NaCl и UV-B облучения (10 мин 12,3 Дж/кв.м) показало, что кратковременное воздействие UV-B и в данном случае снижает ингибирующее действие солевого стресса на способность растений аккумулировать низкомолекулярные антиоксиданты, практически не влияя или даже ингибируя активности антиоксидантных ферментов. Установлено, что в процессе кросс-адаптации растений к UV-B облучению и NaCl уровень протекторного эффекта ультрафиолета определяется не только интенсивностью и продолжительностью действующего стрессора, но также видовой специфичностью растения и последовательностью действия стрессоров различной природы.

#### **По материалам диссертации опубликованы следующие работы:**

1. **В.И.М.Тоайма., Радюкина Н.Л., Кузнецов Вл.В.** (2009) Функционирование антиоксидантной системы у Дикорастущих лекарственных растений при действии УФ-В облучения // Материалы Международной конференции «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего севера» (Апатиты, 07 – 11 июня 2009г.), Апатиты. 2009. – С. 336 – 338.

2. **В.И.М.Тоайма, Радюкина Н.Л. Дмитриева .Г.А. Кузнецов Вл.В .(2009)** Оценка антиоксидантного потенциала лекарственных растений при действии UV-B облучения. Вестник РУДН, 4, 12-20.
3. Аль-Холани Х.А.М., **В.И.М.Тоайма.**, Долгих Ю.И. (2010) Получение растений кукурузы с повышенной устойчивостью к засухе путем клеточной селекции на среде с маннитом. Биотехнология, 1, 60-67.
4. **В.И.М.Тоайма, Радюкина Н.Л. Дмитриева .Г.А. Кузнецов Вл.В .(2010)** Участие антиоксидантной защитной системы Базилика в кросс-адаптации при комплексном действии UV-B и засоления. Вестник РУДН, 3, в печать