

УДК 581.1

## ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛОВ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Джафарлы А. К., Джафаров Э. С.<sup>1</sup>

*Исследование синтеза хлорофиллов на основе изучения активности ферментов антиоксидантной защиты растений. — А.К.Джафарлы, Э.С.Джафаров.<sup>1</sup> — В работе изучено влияние ионизирующего излучения на синтез хлорофиллов и на активности ферментов антиоксидантной защиты растений, произрастающих на территории с повышенным уровнем радиационного фона. Показано, что в некоторых случаях между содержаниями фотосинтетических пигментов опытных и контрольных растений имеются определенные различия и эти различия иногда весьма существенны. При этом обнаруженная стимуляция биосинтеза фотосинтетических пигментов проходит на фоне снижения активности, как пероксидазы, так и каталазы.*

**Ключевые слова:** Природные радионуклиды, хлорофиллы, каталаза, пероксидаза.

**Адрес<sup>1</sup>:** АЗ 1143, Азербайджан, Баку, ул. Ф.Агаева-9, Институт радиационных проблем НАНА;  
**Факс:** (994-12)-439-83-18, e-mail: e\_dzhafarov@rambler.ru

*Research of synthesis of chlorophylls on the basis of studying of activity of antioxidant protection enzymes of plants. — A. K. Jafarly, E. S. Dzhafarov.<sup>1</sup> — In work influence of an ionizing radiation on synthesis of chlorophylls and on activity of antioxidant protection enzymes of the plants growing in territory with the raised level of a radiating background is studied. It is shown, that in some cases between maintenances of photosynthetic pigments of skilled and control plants there are certain distinctions and these distinctions are sometimes rather essential. Thus the found out stimulation of biosynthesis of photosynthetic pigments passes on a background decrease in activity both peroxidase, and catalase.*

**Address<sup>1</sup>:** Institute of Radiation's Problems, Azerbaijan Academy of Sciences, Baku, AZ 1143 Azerbaijan;  
e-mail: e\_dzhafarov@rambler.ru

### Вступление

Известно, что биологическое действие ионизирующей радиации в малых дозах весьма многообразно. Предполагают, что под действием радиации в растениях формируется адаптивный ответ и растения, показывая высокую радиоустойчивость, своеобразно сопротивляются на такое действие [1].

По мнению некоторых авторов, адаптивный ответ обусловлен функционированием индуцибельных систем репарации ДНК, восстанавливающих повреждение клетки [2], или вступлением в митотический цикл в норме неделящихся клеток, что приводит к быстрой замене поврежденных клеток не поврежденными [1].

Вместе с тем существуют данные, свидетельствующие о том, что в определенных условиях у растений под действием ионизирующего излучения ускоряется рост и развития [3]. Предполагают, что этот феномен, скорее всего, связан со стимулированием разных физиологических и биохимических процессов, включая фотосинтез, транспирацию, биосинтез белка и т.д. [3].

Показано также, что одной из таких приспособительных реакций является изменение активности и синтез *de novo* ряда ферментов, таких как каталазы, пероксидазы, протеиназы и т.д. [4].

Однако вопросы, связанные с выяснением механизма радиационной стимуляции и устойчивости к воздействию радиации, все еще остаются не изученными и являются актуальными как для фундаментальных, так и для прикладных исследований.

Целью наших исследований было изучение реакции некоторых характерных травянистых растений, дикорастущих на почве с повышенным уровнем природных радионуклидов (~1000 мкР/час), на хроническое воздействие малых доз радиации. О реакции растений на действие ионизирующего излучения судили как по изменению содержания фотосинтетических пигментов в листьях, так и по изменению активности ферментов антиоксидантной системы защиты растений.

### Материалы и методика

Объектами исследования были верблюжья колючка обыкновенная – *Alhagi pseudahalagi* (Bieb) и парнолистник – *Zygophyllum L.*

Выбор растений связан с тем, что эти растения являются наиболее распространенными на выбранном нами участке, где почва загрязнена разными природными радионуклидами. Отметим, что сложившаяся на данном участке радиационная обстановка обусловлена деятельностью Бакинского завода по производству йода.

Были выбраны три опытных и один контрольный участок. Мощность экспозиционной дозы на опытных участках составляла (750±80) мкР/час, а на контрольном – (15±3) мкР/час. Все участки находились на территории завода.

Учитывая, что на биологические эффекты, которые могут формироваться при хроническим низкоинтенсивным облучении растений, произрастающих на территории с повышенным уровнем радиационного фона, а также на процессы радиоадаптации может повлиять также процессы нерадиационной природы, в том числе неизбежная пространственная и временная изменчивость экологических условий, контрольный участок нами также был выбран на территории завода. По этой причине контрольный участок по почвенно-климатическим показателям не отличался от опытных участков и имел радиационный фон, характерный для данной местности.

Пробы листьев как для фиксации и извлечения пигментов, так и для определения ферментной активности брали в трех полевых сезонах, т.е. в периоды всходов, развития и созревания растений. Эти фазы условно были названы начальным, средним и конечным этапом развития растений.

Хлорофиллы *a* и *b* определяли спектрофотометрически с применением общепринятых методов [5]. Их содержание рассчитывали по спектрам поглощения, зарегистрированным на спектрофотометре «Specord UV VIS» (Германия), применяя при этом уравнения двухволнового метода [5].

Активность пероксидазы также определяли спектрофотометрически по изменению поглощения при 470 нм, используя цветную реакцию с гваяколом [6], а активность каталазы измеряли по разрушению перекиси водорода, как описано в [7]. Расчеты производили на 1 г массы сухой ткани листа.

Опыты проводили в двукратной биологической и трехкратной аналитической повторности. В таблице и на рисунках представлены среднеарифметические значения измеряемых величин.

### Результаты и обсуждение

Известно, что в исследованиях хронического влияния ионизирующего излучения на живые организмы основное внимание уделяется растениям, дикорастущим на загрязненном разными радионуклидами участке. Причиной этого является то, что растения являются первичными звеньями трофических цепей и поэтому они выполняют основную роль в поглощении радионуклидов.

Учитывая это обстоятельство, мы в своей первой серии опытов, путем изучения изменения количества фотосинтетических пигментов в листьях, попытались выявить некоторые особенности влияния ионизирующей радиации в малых дозах на фотосинтез у растений, произрастающих в зоне повышенного радиационного фона.

Содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях исследуемых растений с их контрольными образцами на разных этапах вегетационного периода представлены в таблице.

Из данных, представленных в таблице, видно, что в некоторых случаях между содержаниями фотосинтетических пигментов опытных и контрольных растений имеются определенные различия и эти различия иногда весьма существенны. Например, для парнолистника в опытном варианте содержание хлорофиллов *a+b* по сравнению с контролем оказалось примерно в 2 раза больше. Такое высокое содержание хлорофиллов в листьях опытных вариантов этого растения сохранялось на всех этапах развития. Причем указанные изменения касались как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b*.

**Таблица.** Содержание хлорофиллов в листьях исследуемых растений с их контрольными образцами на разных этапах вегетационного периода

Этапы	Пигменты	Растения			
		Парнолистник		Верблюжья колючка	
		Опытный	Контрольный	Опытный	Контрольный
Начальный	Хл. <i>a</i>	0.95±0.12	0.44±0.02	1.12±0.10	1.37±0.12
	Хл. <i>b</i>	0.19±0.01	0.16±0.02	0.40±0.04	0.52±0.03
	Хл.( <i>a+b</i> )	1.14±0.05	0.60±0.01	1.51±0.07	1.89±0.05
Средний	Хл. <i>a</i>	0.78±0.08	0.53±0.04	3.21±0.37	2.21±0.13
	Хл. <i>b</i>	0.22±0.03	0.17±0.02	0.34±0.17	0.47±0.02
	Хл.( <i>a+b</i> )	1.00±0.03	0.69±0.04	3.54±0.47	2.68±0.13
Конечный	Хл. <i>a</i>	1.12±0.01	0.65±0.01	1.14±0.06	1.89±0.05
	Хл. <i>b</i>	0.35±0.01	0.22±0.01	0.48±0.00	0.75±0.06
	Хл.( <i>a+b</i> )	1.47±0.02	0.86±0.01	1.62±0.05	2.64±0.02

В отличие от парнолистника для верблюжьей колючки и в начале и в конце вегетационного периода наблюдалось снижение синтеза хлорофиллов. По сравнению с контролем сумма пигментов уменьшалась примерно на (20–50)%. Однако на среднем этапе радиация у этого растения способствовала повышению содержания фотосинтетических пигментов

на ~30%. Отметим, что верблюжья колючка, подвергнутой облучению на этом этапе, отличалась от необлученной также большей биомассой.

Снижение концентрации хлорофиллов под действием малых доз радиации у верблюжьей колючки, как в начале, так и в конце вегетационного периода может быть вызвано или ингибированием

биосинтеза хлорофиллов, или усилением процесса их деградации. Если учесть мнение авторов работы [8], согласно которому при развитии проростков, когда происходит активное хлорофиллообразование, ингибирование синтеза хлорофилла является первичным звеном токсического действия радиации, то можно предположить, что и в случае верблюжьей колючки на начальном этапе ее развития имеет место ингибирование синтеза хлорофиллов. Однако на конечном этапе развития этого растения, когда для большинства травянистых растений, в том числе и для верблюжьей колючки, вегетационный период подходит к концу и накопление биомассы почти останавливается, по всей вероятности, деградация хлорофиллов превосходит их биосинтез.

Среди данных, полученных нами, больше всего привлекает на себя внимание то обстоятельство, что изменение содержания пигментов под действием радиации зависит от вида растений. Так, в контрольных вариантах верблюжьей колючки и парнолистника различие содержания хлорофиллов  $a+b$  составило  $\sim 3$  раза. Разница в концентрациях хлорофилла в листьях опытных вариантов этих растений составила 30–33%, тогда как у парнолистника наблюдали увеличение концентрации хлорофилла в опытных вариантах по сравнению с контролем чуть менее в 2 раза. Объяснить это можно тем, что процессы радиационной стимуляции (если она имеет место) биосинтеза пигментов у верблюжьей колючки проявляется слабее, чем у парнолистника.

Особый интерес вызывает также сезонное изменение содержания фотосинтетических пигментов. Интересно, что если влияние радиации для одного растения на одном этапе развития приводит к активации фотосинтетического аппарата, вызывая ускорение синтеза хлорофиллов, то на другом, разрушая ультраструктуру хлоропластов, неблагоприятно действует на фотосинтез. Другими словами, ускорение синтеза хлорофиллов для разных растений может проявляться на разных этапах их развития.

В принципе факт повышения содержания хлорофиллов в листьях исследованных растений под действием радиации можно принять как стимулирование пигментного биосинтеза. Однако для того, чтобы прийти к определенному выводу относительно влияния малых доз радиации на структуру фотосинтетического аппарата, мы сочли целесообразным изучать также активности ферментов системы антиоксидантной защиты растений. С этой целью в тканях двух видов растений, произрастающих на выбранных участках завода по производству йода, нами была определена активность пероксидазы и каталазы, ферментов, вносящих наибольший вклад в защиту растений от свободных радикалов и перекисей. Отметим, что свободные радикалы и перекиси образуются при действии разных стрессовых факторов, в том числе, и при действии ионизирующего излучения радионуклидов.

Получение нами данные по активности ферментов представлены на рисунках 1–4 в виде диаграмм.

Как видно из этих диаграмм, обнаруженная стимуляция биосинтеза зеленых пигментов проходит на фоне снижения активности обоих ферментов. При этом активность пероксидазы снижалась как у верблюжьей колючки, так и у парнолистника. Максимальное снижение обнаружено у парнолистника (80%), минимальное – у верблюжьей колючки (60%).

Увеличение содержания хлорофилла и снижение активности пероксидазы в листьях растений, содержащих радионуклиды, сопровождались снижением также активности каталазы (90%, 80% соответственно для парнолистника и верблюжьей колючки).

На первый взгляд увеличение содержания хлорофилла можно объяснить стимулирующим действием облучения, однако снижение активности ферментов антиоксидантной защиты позволяет предположить наличие другого, более сложного пигмент-ферментного взаимодействия.

Как известно, исследуемые ферменты играют существенную роль при формировании эндогенного фона резистентности растений в условиях повышенного радиационного фона. Точнее в стрессовых условиях, образующиеся супероксидные анионные – радикалы превращаются в перекись водорода, который затем инактивируется каталазой. При этом пероксидаза инактивирует органические перекиси, которые образуются в результате радиолитического распада, так и ненасыщенных жирных кислот липидов мембран [9].

Исходя из таких соображений, можно предположить, что если в стрессовом состоянии у растений произойдет активация процессов генерации свободных радикалов и перекисей, то это, несомненно, приведет к увеличению активности пероксидазы, в качестве одного из механизмов адаптации растений к стрессовому фактору.

Установлено, что на самом деле в условиях экстремальных экологических раздражителей (резкие колебания температуры и влажности) повышается активность пероксидазы, поскольку основным вторичным стрессовым химическим фактором является перекись водорода [10]. В этих условиях, как правило, активность другого ключевого фермента антиоксидантной защиты растений – супероксиддисмутазы (СОД) снижается, так как избыток супероксидрадикалов окисляет непредельные жирные кислоты липидов мембран, а образующиеся органические перекиси инактивируются пероксидазой. Поэтому потребность в активной СОД при наличии активированной пероксидазы в этих случаях снижается.

Однако при действии на растения стрессовых факторов промышленного происхождения (например, оксиды азота, серы, микрочастицы угольной пыли, обладающие каталитической активностью, тяжелые металлы) преимущественно увеличивается активность СОД. Это объясняется тем, что

в этих случаях в первую очередь происходит генерация супероксидрадикалов, а не перекиси водорода.

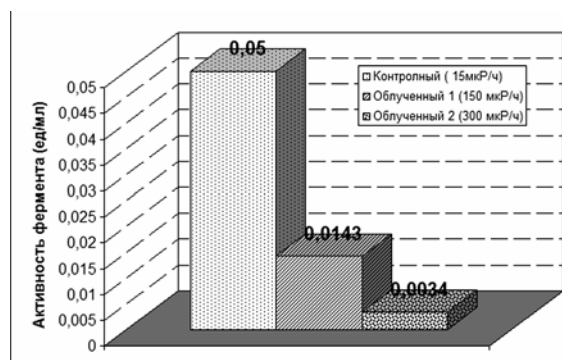


Рис. 1. Изменение активности пероксидазы у верблюжьей колючки

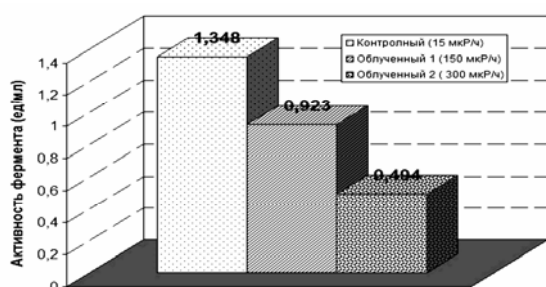


Рис. 2. Изменение активности пероксидазы у парнолистника

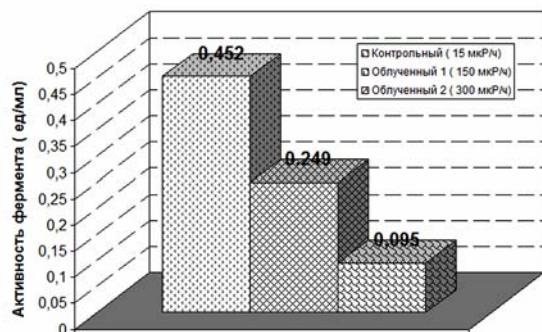


Рис. 3. Изменение активности каталазы у верблюжьей колючки.

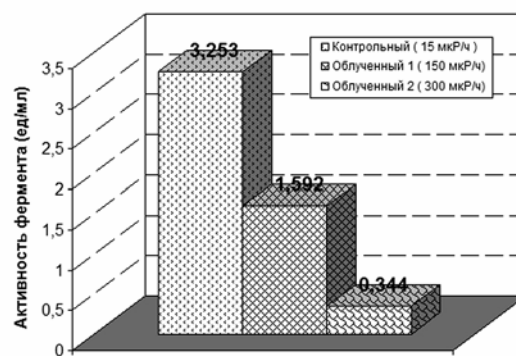


Рис. 4. Изменение активности каталазы у парнолистника

При этом потребность в пероксидазе для инактивации органических перекисей в мембране снижается и ее активность падает. Логично предположить, что радиоустойчивость при относительно небольших дозах радиации должна определяться общей активностью систем инактивации свободных радикалов и перекисей. Однако на основе полученных данных по активности пероксидазы и каталазы можно прийти к выводу о том, что для формирования радиоустойчивости растений большее значение имеет СОД, а не исследуемые нами антиоксидантные ферменты.

#### Выводы

Таким образом, можно сделать заключение о том, что ионизирующее излучение инкорпорированных радионуклидов в листьях исследуемых растений, в первую очередь, активирует генерации супероксидрадикалов, а не перекиси водорода. Поэтому потребность каталазы и пероксидазы снижается, и, в конечном счете, их активность падает.

На основании имеющихся представлений можно предположить, что радионуклиды, воздействуя на клеточные мембраны, способствуют развитию окислительных процессов, приводящих к изменению состояния и свойств мембран, тем самым, вызывая активацию фотосинтетических реакций [11].

Представленные в работе данные позволяют получить представления о биохимических последствиях длительного низкоинтенсивного внешнего облучения на растения в естественной среде их произрастания.

1. Серебряный А. М., Зоз Н. Н. // Радиационная биология. Радиационная экология. 2001, Т. 41, №5, с. 589 – 598.
2. Куликов Н. В., Альциц Л. К., Позолотин А. А. // Радиобиология. 1991, Т. 31, Вып. 4, с. 630 – 632.
3. Кузин А. М. // Радиационная биология. Радиационная экология. 1996, Т. 36, Вып.2, с.284 – 290.
4. Taylor J. R. An Introduction to Error Analysis. California: Univ. Sci. Books Mill Valley, 1982, 211 p.
5. Шлык А. А. // Биохимия. 1968, Т. 33, Вып.2, с. 275 – 285.
6. Polle A., Otter T., Seifert F. // Plant Physiol. 1994, V.106, p.53 – 60.
7. Aebi H. // Methods Enzymol. 1984, V.105, p. 121 – 126.
8. Stobart A. K., Griffith W. T., Ammen-Bukhari I., Sherwood R. P. // Physiol.plant. 1985, V.63, N.3, p.293 – 298.
9. Кретович В. Л. Биохимия растений. М.: Высш. школа, 1986, 503 с.
10. Журавская А. Н., Стогний В.В., Кершенгольц Б. М. // Радиационная биология. Радиационная экология. 1998, Т. 38, вып.5, с. 706 – 711.
11. Тишкевич Т. К., Петрович И. С., Заболотный А. И. и др. // Докл. АН Беларуси. 1993, Т.37, №1, с. 54 – 57.

Отримано: 8 вересня 2009 р.

Прийнято до друку: 4 лютого 2010 р.