

УДК 581.524.577.342

ДИНАМІКА РОЗПАДУ АНТОЦΙΑНІВ У СТАРІЮЧИХ ПЕЛЮСТКАХ *IPOMOEA PURPUREA*, ЩО ПІДДАЛИСЯ УФ ОПРОМІНЕННЮ

Берестяна А. М., Гродзинський Д. М.

Динаміка розпаду антоціанів у старіючих пелюстках Ipomoea purpurea, що піддалися УФ опроміненню. — А. М. Берестяна, Д. М. Гродзинський. — Досліджена динаміка зменшення вмісту антоціанів у процесі старіння пелюсток Ipomoea purpurea, що характеризує швидкість деградаційних процесів в клітині. Проаналізовано вплив різних доз УФ-В опромінення на швидкість вікової деградації антоціанів. В ході експерименту було показано, що в межах дослідженого діапазону, тільки одна доза – 12,6 кДж/м² сприяла уповільненню темпів розпаду антоціанів.

Ключові слова: антоціани, УФ-В опромінення, монокарпічні рослини, динаміка старіння.

Адреса: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна; e-mail: berestyanyaa@mail.ru

Age-specific dynamics of anthocyanin changes in petals of Ipomoea purpurea treated by UV radiation. — A. Berestyana, D. Grodzinsky. — The dynamics of the anthocyanin content reduction in the course of aging of the Ipomoea purpurea petals, which characterizes the rate of the degradation processes in a cell, has been studied. The analysis included the impact of various UV radiation doses on the rate of anthocyanin age-related decomposition. The experiment proved that but one dose – 12.6 J/m² – contributed to the deceleration of the anthocyanin decomposition rate, within the range under study.

Key words: anthocyanins, UV radiation, monocarpic plants, dynamics of aging.

Address: Institute of cell biology and genetic engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho str., Kiev, 03143, Ukraine; e-mail: berestyanyaa@mail.ru

Вступ

Проблема руйнування озонового шару і як наслідок, глобальне підвищення рівня біологічно небезпечного УФ опромінення, є на сьогоднішній день однією з актуальних екологічних проблем. За останні 20 років, кількість озону зменшилася на 4%. Цей процес триває. Відомо, що зниження вмісту озону на 1%, призводить до збільшення на 2% рівня ультрафіолету, який досягає поверхні землі [5].

За оцінками деяких експертів, в атмосфері Землі озону стало менше на 8 – 10%, а швидкість його зникнення зараз досягла 0,5% на рік [7]. Можна припустити, що з роками, рівень УФ буде збільшуватись. В результаті, рослини і тварини піддадуться не тільки більш інтенсивному опроміненню УФ-В – променями, але і впливу більш жорстких (короткохвильових) променів. Їх пошкоджуюча дія може послаблювати сформовані в ході еволюції механізми захисту рослин від УФ-В – радіації і призводити до порушень фізіологічних та біохімічних процесів. При повній відсутності озонового екрану в атмосфері, загибель всіх рослин нашої планети настала би вже за дві – три доби безперервного опромінення [5]. В зв'язку з цим зростає роль досліджень по вивченню реакції рослин на підвищення рівня УФ-В радіації.

В одній з таких робіт, зокрема показано, що УФ-В, впливаючи на експресію генів, викликає індукцію цілого ряду захисних механізмів: утворення УФ-В поглинаючих пігментів, синтез поліамінів, що захищають нуклеїнові кислоти, збіль-

шення активності антиокислювальних ферментів та індукцію патогенез-регульованих білків. Шляхи трансдукції сигналів, за допомогою яких УФ-В регулює експресію генів в усіх цих процесах, на даний момент недостатньо досліджені [6].

Як відомо, один з головних механізмів захисту рослин від УФ випромінювання – це накопичення флавоноїдних сполук, котрі поглинають випромінювання саме в цій області. Найбільший вплив на синтез флавоноїдів, зокрема антоціанів, має УФ випромінювання в області 280–320 нм (УФ-В). Самі антоціани поглинають його в області 265–280 нм [4]. Наявність цих сполук в тканинах епідермісу та навколо хлоропластів в мезофілі листків знижує вірогідність виникнення радіаційно індуктованих пошкоджень. Флавоноїди та феноли в клітині сконцентровані, головним чином у вакуолях, однак можуть бути ковалентно зв'язані з мембранами [8].

Однак відомо, що вміст антоціанів падає в процесі старіння рослин. Це обумовлено тим, що старіння рослин супроводжується підсиленням розпаду речовин, уповільненням синтезу, а також підвищенням активності гідролітичних ферментів [1]. Дослідження вмісту антоціанів має прикладне наукове значення, бо за швидкістю розпаду антоціанів можна судити про темпи деградаційних процесів, що супроводжують старіння рослин. Контроль за впливом на ці процеси УФ-В опромінення, є важливим з точки зору встановлення характеру впливу. Вміст антоціанів може співвідноситись зі ступенем адаптації до УФ опромінення.

Метою роботи було дослідження змін вмісту антоціанів в процесі старіння пелюсток монокарпичної рослини *Irotea purpurea* та впливу на їх вміст різних доз УФ-В опромінення.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була обрана монокарпична рослина іпомея пурпурова (*Irotea purpurea*). Цей об'єкт є зручним для використання, з тієї точки зору, що процес розкриття квітки та її старіння відбувається протягом 6–8 годин [9].

Зібрані в момент розкриття квіти іпомеї поміщали у воду та опромінювали джерелом УФ-В опромінення (лампю ДБ-30) у трьох дозах: 4,23 кДж/м², 8,46 кДж/м², 12,69 кДж/м² протягом півтори години. Після чого визначали вміст антоціанів у квітках. Для визначення вмісту антоціанів, зрізані та попередньо опромінені квіти іпомеї зважували та гомогенізували в розчині пропанол : соляна кислота : вода = 18 : 1 : 81 (співвідношення сира маса і розчин = 1 : 5).

Екстракцію проводили через кожну годину, протягом 6 годин при 25°C, з метою побудови кривої залежності деградації пігменту в часі. Отримані екстракти звільняли від рослинних залишків шляхом центрифугування. Вміст антоціанів, виражений в % на сирому масу, визначали спектрофотометричним методом, за формулою:

$$A = (D_{535} - D_{650})V/P,$$

де: D – поглинання при різних довжинах хвиль; V – об'єм розчину; P – вага сирової маси [2].

Спектрофотометричний контроль дозволяє встановлювати темпи гідролітичних процесів, котрі проявляються в вигляді знебарвлення пелюсток. Пігмент антоціан надає пелюсткам забарвлення від синьо-фіолетового до блакитного. В процесі старіння, забарвлення пелюсток світлішає, що свідчить про розпад пігменту антоціану. Так, на момент зів'язання квітки, пелюстки набувають рожевого відтінку.

Результати та обговорення

Отримані результати показують, що крива деградації антоціанів має період стаціонарного стану для всіх доз та контролю. Це свідчить про те, що деякий час вміст антоціанів зберігається незмінним (рис.).

Період стаціонарного стану співпадає з часом цвітіння, тобто з "молодістю" квітки та відповідає першим трьом годинам після опромінення. Пізніше, після трьох годин з моменту опромінення, відбувається достовірне зменшення вмісту антоціанів в пелюстках та проявляється залежність від дози опромінення.

Різна ступінь кута нахилу свідчить про різні темпи деградації та про залежність її від дози УФ-В опромінення, що відповідає даним [2] про те, що опромінення здійснює вплив на протікання онтогенезу, зокрема на процеси старіння рослин. Однак, ці зміни проявляються по-різному, в залежності від доз, способів опромінення та виду рослин.

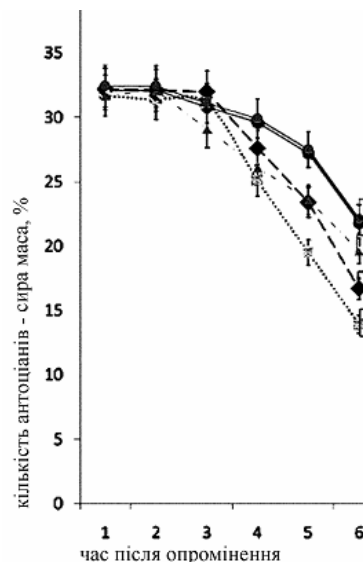


Рис. Криві деградації антоціанів у часі: 1 – неопромінений контроль; 2 – опромінення 4,23 кДж/м²; 3 – опромінення 8,46 кДж/м²; 4 – опромінення 12,69 кДж/м²

Спостерігається як прискорення старіння, так і його уповільнення. Механізми, що приймають участь в запуску процесу радіоіндукованого старіння монокарпичних рослин, сьогодні не вивчені детально [3]. Так, для найменшої дози опромінення, темпи розпаду антоціанів через 4 години виявились вищими, ніж для інших доз та склали 5,6% на годину (табл.).

Таблиця. Залежність швидкості (%/сирова маса) зниження кількості антоціанів, від дози опромінення

Варіанти	Час після опромінення				
	2 год.	3 год.	4 год.	5 год.	6 год.
контроль	0,1	0,1	4,4	4,2	6,7
4,23 кДж/м ²	0,3	0,3	6,0	5,6	5,6
8,46 кДж/м ²	0,4	3,0	3,0	2,5	4,0
12,69 кДж/м ²	0	1,3	1,2	2,4	5,4

Через 6 годин після опромінення, вміст антоціанів а даному варіанті досяг мінімального, в порівнянні з іншими варіантами, значення – 13,9%/сирової маси. Для середньої дози, темпи розпаду пігментів через 4 години були меншими та склали 2,5% на годину. Їх вміст через 6 годин після опромінення був вищий (19,6%), ніж в контролі (16,7%) та при найменшій дозі. Для найбільшої дози, вміст антоціанів через 6 годин після опромінення був вищий ніж в контролі при двох інших дозах – 22,1%.

Швидкість протікання деградаційних процесів залежала від рівня дози опромінення. В пробах, котрі були опромінені самою високою дозою, деградаційні процеси протікали повільніше (табл.). Швидкість зниження кількості антоціанів після 4 годин опромінення складала 1,2, після 5 – 2,4 і після 6 – 5,4 %/годину. Крім того, через 6 годин після опромінення, вміст антоціанів в зразках, опроміненіх самою високою дозою, був більший, ніж в контролі та інших дозах на той самий момент.

Збереження такого їх рівня може свідчити про включення захисного механізму, який складається в збільшенні кількості флавоноїдних пігментів в клітині. Таким чином, УФ-В опромінення вплинуло на темпи старіння іпомеї пурпурової. Однак, цей вплив був неоднозначним, оскільки відсутня пряма залежність підсилення темпів розпаду антоціанів від збільшення дози. Тим не менш, в пробах, опромінених високою дозою – 12,6 кДж/м², деградаційні процеси протікали повільніше, ніж в контролі. Це дозволяє нам зробити висновок, що доза 12,6 кДж/м², сприяє уповільненню процесів деградації антоціанів.

Старіння іпомеї пурпурової є процесом запрограмованим, але зовнішні фактори також можуть впливати на нього, тому, в даному випадку, можна припустити, що деградаційні процеси дещо уповільнились саме під впливом однієї з доз опромінення.

Порівнюючи отримані результати з літературними даними, бачимо, що уповільнення старіння пелюсток іпомеї можливо не тільки шляхом впливу фактора УФ-В стресу, а також внаслідок дії хімічних речовин, таких як актиноміцину-Д, який інгібує гени SAG (senescence-associated genes), що відповідають за старіння пелюсток іпомеї пурпурової. Після введення актиноміцину-Д, спостерігалось пригнічення видимого старіння пелюстків, котрі зберігались незмінними протягом 9 годин, замість звичайних 4 – 5 годин. На 9-ій годині, все ж наступила деградація клітинних стінок пелюстків та спостерігалось зів'янення квітки [9]. Наведений приклад говорить про те, що не тільки УФ-В опро-

мінення, а також і інші фактори здійснюють вплив на темпи деградаційних процесів, що необхідно врахувати для подальшої роботи на даному об'єкті.

Вірогідний механізм, котрий пояснює зниження швидкості деградаційних процесів, запропоновано в роботі [2]. Суть його в тому, що різна швидкість деградаційних процесів залежить від експресії генів, відповідальних за появу гідролази – фермента, який розщеплює антоціани. Відповідно, чим нижче активність гідролітичних ферментів, тим повільніша швидкість розпаду антоціанів. Висока експресія генів гідролази обумовлює високу активність ферментів, що підсилює процеси розпаду антоціанів. УФ-В опромінення тормозить експресію генів гідролази та включає захисний механізм, проявом чого є утворення антоціанів [9].

Висновки

Таким чином, динаміка зменшення антоціанів у часі, яка характеризує швидкість деградаційних процесів у клітині пелюсток іпомеї пурпурової, може служити критерієм для визначення темпів старіння. Це представляє інтерес з точки зору дослідження вікової адаптації монокарпічної рослини до підвищення рівня УФ-В радіації. Аналогічні процеси можуть спостерігатися у інших видів рослин, тому отримані дані можуть бути екстрапольовані на інші об'єкти.

Результати наших досліджень свідчать про придатність даного об'єкту та методу для дослідження механізмів старіння.

1. Гродзинский Д. М. Старение у растений // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов: Сб. научн. тр. – К.: Наук. думка, 1986. – 208 с.
2. Гродзинский Д. М., Гуца Н. И., Перковская Г. Ю., Дмитриев А. П. Влияние хронического облучения на адаптивный потенциал растений // Радиобиология растений – 2002. – т. 42, №2. С. 155–158.
3. Гродзинський Д. М., Шиліна Ю. В., Міхєєв О. М. Механізми регуляції монокарпічного старіння рослин // Физиология и биохимия культурных растений. – 2003. – т. 35, № 3. С. 187–199.
4. Дубров А. П. Генетические и физиологические эффекты действия ультрафиолетовой радиации на высшие растения. – М.: Наука, 1968. – 249 с.
5. Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. – М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.
6. Ракитин В. Ю., Карягин В. В., Ракитина Т. Я., Прудникова О. Н., Власов П. В. Особенности образования АБК у мутантов *Arabidopsis thaliana* по этиленовому сигнальному пути при УФ-В стрессе // Физиология растений – 2008. – т. 55, №6. – С. 942–944.
7. Costas A. Varostos. Global total ozone dynamics. Environmental Science and Pollution Research, V. 3, N. 3, October 2008. – P. 153–157.
8. Hakroort H. W., Ernst W. H. et al. 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. – Vol. 147. – P. 75–80.
9. Yamada Tetsuya, Ichimura Kazuo, Kanekatsu Motoki, Doorn Wouter. Gene expression in opening and senescing petals of morning glory (*Ipomoea nil*) flowers. Plant Cell Reports, V. 26, N. 6, June 2007. – P. 823–835.

Отримано: 5 грудня 2009 р.

Прийнято до друку: 24 червня 2010 р.