ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆԻ ԳԻՏԱԿԱՆ ՏԵՂԵԿԱԳԻՐ
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ЕРЕВАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Քիմիա և կենսաբանություն 3, 2009 Химия и биология

Биология

УДК 58.03+581.174+543.426

А. Дж. МИНАСЯН, Дж. М. ДЖАВРШЯН

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА «ГИПЕРХРОМНЫЙ ЭФФЕКТ» В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ, ВЫЗВАННЫЙ ГАЗООБРАЗНЫМ АММИАКОМ

В данной работе было изучено влияние УФ-излучения и газообразного аммиака на фотосинтетический аппарат (ФСА) высших растений. Было показано, что под действием УФ-излучения поглотительная способность пигментного аппарата растений понижается, в то время как при комбинированном воздействии излучения и газообразного аммиака наблюдается значительное увеличение оптической плотности листьев, а также угнетение работы электрон-транспортной цепи ФСА. При этом имело место уменьшение количества пигмент-белковых комплексов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов).

Введение. На биологические объекты наибольшее влияние оказывает УФ-излучение от 230 до 380 *нм*, которое подразделяется на три области: коротковолновую – 200–280 *нм* (УФ–А), средневолновую – 280–320 *нм* (УФ–В) и длинноволновую – 320–380 *нм* (УФ–С). Так как коротковолновый УФ из-за эффективного поглощения озоном атмосферы поверхности земли не достигает, то биологически активным является УФ-свет с длиной волны больше 290 *нм* [1, 2].

Уменьшение озонового слоя атмосферы над некоторыми широтами представляет большую опасность для организмов. Наиболее разрушительный эффект, в том числе с летальным исходом, оказывают фотоны УФ–В,С-излучения, действующие на биологические объекты на всех уровнях их организации от молекулярного до экосистемного [2–4]. В работах [1, 5–7] показано ингибирующее действие УФ на фотосинтез.

Разрушение мембран хлоропластов в результате воздействия УФ–В, коррелирующееся с уменьшением активности фотосистемы 2 (ФС2), наблюдалось у растений разных видов [8], что было продемонстрировано в экспериментах с изолированными хлоропластами, тилакоидами и мембранными фрагментами ФС2 [6]. Помимо обладающих высокой чувствительностью ФС2 и ассоциированных с ней частей цепи электронного транспорта ингибируется, хотя и в меньшей степени, ФС1 [4]. В противоположность сказанному некоторые авторы подчеркивают стимулирующее действие УФ-излучения на активность ФС2 [9].

Имеются данные о том, что ультрафиолетовый свет повреждает белковый комплекс фотосинтетического аппарата непосредственно или через хлорофилл, который выступает в роли сенсибилизатора. Вероятно, из-за этого нарушается связь между медью и белком, вследствие чего пластоцианин теряет свою активность [4]. Некоторые авторы считают, что УФ–С ингибирует фотовосстановление пластохинона Q_A [5]. Большинство из вышеупомянутых результатов получено для листьев или препаратов ФС2 при облучении УФ–В,С, который, как известно, поглощается хинонами, нуклеотидами и *Mn*-кластером [5, 9]. Помимо некоторого регуляторного влияния УФ-лучи оказывают ингибирующее действие на перенос электронов в хлоропластах, особенно в ФС2 [10], что связано с разрушением либо реакционного центра этой фотосистемы, либо водоразлагающего комплекса.

В литературе имеется также ряд работ, указывающих на то, что УФ-излучение является мощным фактором, приводящим к изменению ультраструктуры хлоропластов. Показано, что под действием длинноволнового (365 *нм*) УФ-излучения формируются крупные хлоропласты с хорошо выраженной мембранной системой, а коротковолновое (265 *нм*) УФ-излучение вызывает разрушение мембран [11].

В некоторых исследованиях [12] было установлено, что максимальное подавление фотосинтеза происходит при УФ-излучении с длиной волны 250–270 *нм*, что не совпадает с максимумами поглощения хлорофиллов *a* (330 и 375 *нм*) и *b* (310 и 330 *нм*). Каротиноиды защищают хлорофиллы от фотоокислительной деструкции, в связи с чем изменения их концентрации более выражены [5, 13]. На основании этого было предположено, что ответственным за подавление фотосинтеза под действием УФ-излучения является вещество нуклеиновой природы, находящееся в хлоропластах. Далее было установлено, что дополнительное облучение повышает интенсивность фотосинтеза, а под действием длительного коротковолнового УФ-облучения происходит его угнетение.

В настоящее время стало актуальным исследование совместного действия ультрафиолетового излучения и азотсодержащих веществ на растения. Это связано с тем, что при выращивании объектов на них также воздействуют содержащиеся в окружающей среде атмосферные полютанты (химические газообразные соединения).

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ультрафиолетового излучения и газообразного аммиака, а также их совместного действия на уже сформированный фотосинтетический аппарат высших растений.

Экспериментальная часть. Объектом наших исследований являлся фотосинтетический аппарат (ФСА) фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris L.*). Растения выращивались в оранжерейных условиях при температуре 24±2 (^0C), общей влагоемкости почвы 60% в условиях естественного освещения (800–1000 *лк*). Исследования проводились на живых интактных объектах.

В данной работе в ходе исследования были применены комплексные методы абсорбционной электронной спектроскопии. Для выяснения количественного и качественного состава, а также функционального состояния ФСА высших растений использовался серийный саморегистрирующий двухлучевой спектрофотометр СФ–10 (Россия), снабженный сферой Ульбрихта.

Для исследования работы электрон-транспортной цепи ФСА использовался универсальный флуориметр-фосфороскоп [14].

При изучении кратковременного действия УФ-излучения на ФСА объектов *in vivo* использовался прибор ОРК–1, снабженный ртутно-кварцевой лампой ПРК–2 со сплошным спектром излучения (220–700 *нм*). Расстояние от лампы до объекта составляло 50 *см*, доза излучения – $3{,}5\cdot10^{7}$ *Дж·м*$^{-2}$, определялась уфиметром УФМ–71 (Россия).

После регистрации спектров поглощения контрольных листьев *Phaseolus vulgaris L.* исследовалось действие аммиака на первичные процессы фотосинтеза. Для этого высечки листьев выдерживались в эксикаторе (15 *мин*), атмосфера которого была обогащена аммиаком (7×10^{-3} *мг/л*), при температуре окружающей среды $21^{0}C$. Из высечек получались вытяжки пигментов. В качестве растворителя использовался 96%-й спирт. Количество пигментов в растворе определялось двухволновым методом. Количество хлорофилла (*Хл*) определялось по формуле Винтерманса и Де Мотса, количество каротиноидов (*Кар*) – по формуле Виттестина, а количество пигментов в растительном материале – по формуле [15]

$$A=\frac{CV}{P\cdot1000},$$

где C − концентрация пигментов в *мг/л*; V − объем вытяжки пигментов в *мл*; P − навеска растительного материала в *г*; A − содержание пигментов в *мг/г* сырого веса.

Результаты и обсуждение. Методом спектроскопии было исследовано действие вышеуказанных факторов на состояние пигмент-белкового комплекса фасоли обыкновенной. Все пигменты тилакоидных мембран связаны с белками-носителями, поэтому определялось содержание *Хл a*, *Хл b*, их соотношение, а также содержание каротиноидов.

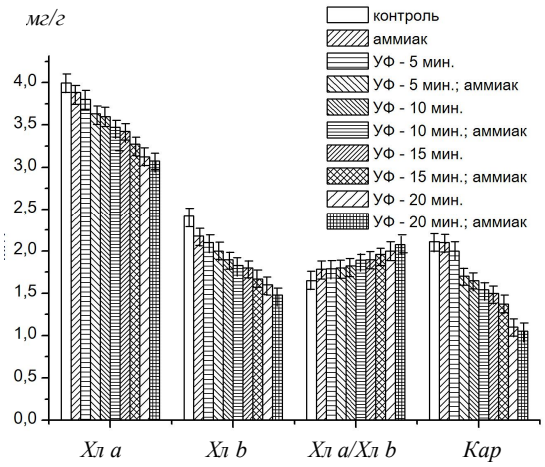

Рис. 1. Зависимость количества пигментов в фасоли обыкновенной от последовательного действия УФ-излучения и аммиака.

Согласно проведенным исследованиям, изменения в пигментном аппарате ФСА (рис. 1) под влиянием УФ-излучения и газообразного аммиака происходило главным образом за счет повреждения *Хл b*, разрушение же *Хл a* проявлялось в меньшей степени. Так, например, у объектов, подвергнутых только воздействию аммиака, количество *Хл a* уменьшалось на 3%, а *Хл b* – на 9%. Поэтому соотношение *Хл a/Хл b* увеличивалось на 8%. Количество каротиноидов уменьшалось на 9% по сравнению с контролем.

У листьев растений, подвергнутых только действию УФ-излучения, пигмент-белковые комплексы разрушались параллельно увеличению времени воздействия. Так, количество *Хл a* по сравнению с контролем уменьшалось на 5; 9,5; 14 и 22%, количество же *Хл b* – на 13; 21,5; 25,5; 34% при влиянии УФ-излучения в течение 5, 10, 15 и 20 *мин* соответственно.

Поскольку каротиноиды считаются пигментами, защищающими хлорофилловые молекулы от фотоокислительной деструкции, то их количество по сравнению с контролем уменьшалось более значительно: на 7, 22, 30 и 47%. О преобладающем разрушении *Хл b* свидетельствует соотношение *Хл a/Хл b*, которое увеличивалось на 8,5; 10,5; 13 и 21%.

При воздействии УФ-излучения и газообразного аммиака повреждение пигмент-белковых комплексов более выражено: количество *Хл a* уменьшалось на 9, 13, 18 и 23%, *Хл b* – на 17, 24, 31 и 39%, каротиноидов – на 18, 27, 35, 50%, соотношение *Хл a/Хл b* увеличивалось на 9, 15, 19 и 26% при воздействие УФ-излучения в течение 5, 10, 15 и 20 *мин* до действия газообразного аммиака соответственно (см. рис. 1). Это свидетельствует о том, что совместное воздействие УФ-излучения и аммиака деструктивно сказывается в основном на *Хл b*.

Исходя из вышесказанного можно предположить, что количество светособирающего комплекса относительно уменьшается, поскольку в его состав в основном входит *Хл b*. Это, в свою очередь, уменьшает передачу энергии фотосистемам.

Среди каротиноидных белковых комплексов заметно разрушается β-каротин. По-видимому, его деградация связана с образованием радикалов, индуцируемых УФ-излучением. Нельзя также исключить, что повреждения пигментов излучением вызваны миграцией энергии электронного возбуждения от ароматических аминокислотных остатков к пигментам комплекса. Можно сказать, что в данном случае происходит фотосенсибилизированное разрушение пигментов, индуцируемое поглощением квантов УФ-излучения ароматическими аминокислотными остатаками белков комплекса [4, 10, 12].

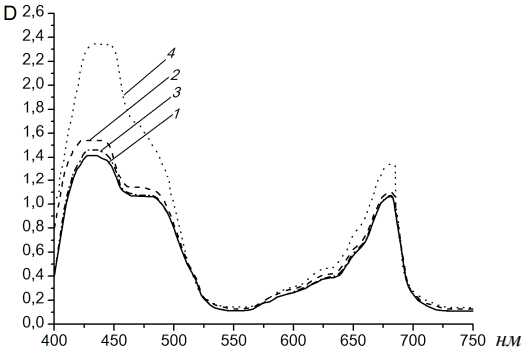

Рис. 2. Спектры поглощения листьев *Phaseolus vulgaris*: 1 – контроль; 2 – листья, подвергнутые воздействию газообразного аммиака; 3 – листья, подвергнутые воздействию УФ-излучения (20 *мин*); 4 – листья, подвергнутые совместному воздействию УФ-излучения (20 *мин*) и аммиака.

Изучено также влияние УФ-излучения на «гиперхромный эффект», вызванный газообразным аммиаком в листьях *Phaseolus vulgaris* [14].

На рис. 2 представлены спектры поглощения, полученные при воздействии ультрафиолетового излучения и газообразного аммиака на ФСА фасо-

ли, а также при их совместном воздействии. Как видно, при действии аммиака (кр. 2) светопоглощающая способность листьев увеличивается в сине-фиолетовой области по сравнению с контролем (кр. 1) на 15%, что является классическим проявлением «гиперхромного эффекта».

В целях выяснения влияния УФ-излучения на «гиперхромный эффект» высших растений изучались их спектры поглощения при воздействии УФ-излучения в течение различного времени как в отдельности, так и при последовательном действии с аммиаком. По нашим данным, действие УФ-излучения вызывает увеличение «гиперхромного эффекта» в области спектра 400–500 *нм*. При 5-минутном воздействии интенсивность поглощения возрастает на 3%, а при совместном воздействии УФ (5 *мин*) и аммиака наблюдается более ярко выраженное увеличение оптической плотности на 26%.

Аналогичные изменения получаются при 10- и 15-минутном воздействии УФ-излучения. Так, при отдельном воздействии УФ интенсивность поглощения возрастает соответственно на 11 и 13,5%, а при совместном воздействии УФ и газообразного аммиака – на 51 и 56%.

Аналогично, при влиянии 20-минутного УФ эти показатели равны 8% и 63% соответственно (рис. 2, кр. 3 и 4).

Обобщая полученные результаты, можно удтверждать, что УФ-излучение проявляет стимулирующее воздействие на «гиперхромный эффект». В особенности сильно эта тенденция проявляется с увеличением времени воздействия данного физического фактора. Такое значительное увеличение оптической плотности в коротковолновой области спектра при совместном действии УФ-излучения и газообразного аммиака можно объяснить нарушением функций клеточных мембран, возникающим при деструктивном воздействии УФ-излучения. При этом увеличивается вероятность возникновения ультраструктурных перестроек в пигментных структурах мембран тилакоидов.

В данной работе также было исследовано действие УФ-излучения и газообразного аммиака на кинетику замедленной флуоресценции (ЗФ) *Хл а* высших растений, которая, как известно, характеризует работу электрон-транспортной цепи ФСА (рис. 3).

Как известно, форма и параметры индукционной кривой используются в качестве показателей изменений состояния ФСА и, прежде всего, состояния ФС2 при действии различных факторов [16–18].

Как видно из рисунка, индукционная кривая ЗФ контрольных листьев (кр. 1) представлена долгоживущими компонентами. Для объектов, подвергнутых действию УФ-излучения и аммиака, характерно более слабое свечение (особенно при *P–S–M*-переходе), интенсивность которого падает с увеличением времени облучения. Объект, подверженный действию только аммиака (кр. 2), по сравнению с контролем характеризуется более низким уровнем послесвечения. При этом уменьшаются уровни *P, S* и *M* на 8, 12 и 15% соответственно. Стационарный уровень *T* изменяется незначительно (на 7%), что свидетельствует о замедлении тушения флуоресценции, которое, в свою очередь, говорит о нарушении функционирования ФС2. Это подтверждает высказанное ранее предположение о том, что при обработке листьев высших растений аммиаком ультраструктурные перестройки происходят не только в пигментных структурах мембран тилакоидов, но и в компонентах электрон-

ного транспорта, в результате чего нарушается транспорт электронов между фотосистемами [19].

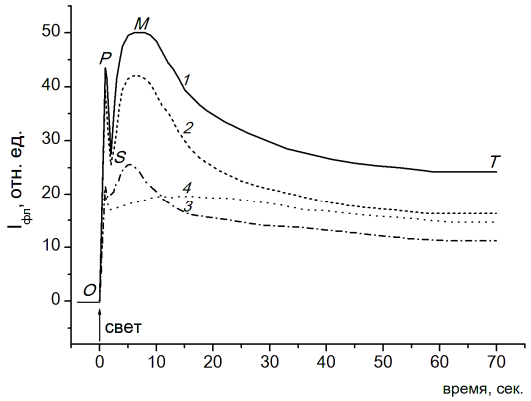

Рис. 3. Кинетические кривые ЗФ хлорофилла фасоли обыкновенной при последовательном воздействии УФ-излучения и аммиака: 1 – контроль; 2 – листья, подвергнутые воздействию аммиака; 3 – листья, подвергнутые воздействию УФ-излучения (20 *мин*); 4 – листья, подвергнутые комбинированному воздействию УФ-излучения (20 *мин*) и газообразного аммиака.

То же самое наблюдалось у объектов, подвергнутых действию УФ-излучения, с той лишь разницей, что интенсивность флуоресцентных показателей падала параллельно увеличению времени воздействия облучения. Так, показатели *P, S, M* и *T* уменьшались на 9, 15, 16 и 5% у объектов, подвергнутых влиянию 5-минутного УФ-излучения соответственно. У объектов, подвергнутых 10- и 15-минутному УФ-излучению, эти же показатели уменьшались на 12, 17, 22, 8% и 15, 20, 35, 9% соответственно и на 18, 24, 45, 12% у объектов, подвергнутых 20-минутному воздействию УФ-излучения (рис. 3, кр. 3).

Аналогичные результаты получали для объектов, подвергнутых совместному воздействию УФ-излучения и аммиака. При этом падение флуоресцентных показателей было наиболее заметным, поскольку имело место суммирование физического (УФ) и химического (газообразный аммиак) факторов. Так, показатели *P, S*, *M* и *T* уменьшались на 12, 18, 25 и 9% у объектов, подвергнутых влиянию УФ-излучения (5 *мин*) и аммиака. У объектов, подвергнутых влиянию 10-, 15- и 20-минутного УФ-излучения совместно с аммиаком эти же показатели уменьшались на 15, 23, 35, 13%, 23, 30, 39, 16% и 25, 34, 45, 21% (рис. 3, кр. 4) соответственно.

Таким образом, совместное воздействие аммиака и УФ-излучения вызывает у высших растений закономерное снижение интенсивности фотосинтеза, зависящее от времени воздействия физического фактора. Причем основной эффект совместного действия УФ-излучения и газообразного аммиака заключается, вероятнее всего, в увеличении безызлучательной диссипации поглощенной световой энергии, а также в снижении скорости электронного транспорта между ФС2 и ФС1.

Заключение. На основании наших исследований можно сделать вывод, что при воздействии аммиака пигменты тилакоидных мембран ФСА подвергаются изменению в незначительной степени. В свою очередь, ультрафиоле-

товое облучение интактных листьев растений приводит к нарушению клеточных и тилакоидных мембран хлоропластов, что проявляется деструкцией хлорофилл-белкового комплекса, вызывая увеличение «гиперхромного эффекта» и подавление работы электрон-транспортной цепи ФСА.

Кафедра биофизики

Поступила 12.12.2007,
после доработки 16.06.2009

ЛИТЕРАТУРА

1. **Веселовский В.А., Веселова Т.В.** Люминисценция растений. М.: Наука, 1990, 200 с.
2. **Яковлева И.Н., Дринк М., Титлянов Э.А.** Физ. растений, 1998, т. 45, № 1, с. 54–64.
3. **Запрометов М.Н.** Фенольные соединения и их роль в жизни растения. М.: Наука, 1996, с. 45.
4. **Никитишена О.В., Христин М.С., Смолова Т.Н., Климов В.В.** Биохимия, 1997, т. 62, вып. 10, с. 1280–1287.
5. **Стрижижовский А.Д.** Радиацион. биология. Радиоэкология, 1999, т. 39, № 6, с. 683–692.
6. **Krause H.G., Schmude C., Garden H., Koroleva O.Y., Winter K.** Plant physiol., 1999, v. 121, p. 1349–1358.
7. **Nogues S., Allen D.J., Morison J.I., Baker N.R.** Plant Physiol., 1998, v. 117, p. 173–181.
8. **Renger G., Graber P., Doht G.** Biological Effects of UV Radiation. Munchen: Gesellschaft fur Strahlen und Umweltforschung, 1982, p. 110–116.
9. **Загоскина Н.В., Алявина А.К., Гладышко Т.О., Лапшин П.В., Егорова Е.А., Бухов Н.Г.** Физиология растений, 2005, т. 52, № 6, с. 830–838.
10. **Yamashita T., Butler W.L.** Plant Phisiol., 1968, v. 43, p. 2037–2040.
11. **Селга М.П., Яшвец Д.А., Рудь М.С.** Действие УФ-радиации на фотосинтетический аппарат растений и ее роль в светокультуре. В сб.: УФ-излучение и его применение в биологии. Пущино-на-Оке: Изд-во МГУ, 1973.
12. **Белл Л.И.** Энергетика фотосинтезирующей растительной клетки. М.: Наука, 1980.
13. **Ivanov A.G., Miskiewicz E., Clarke A.K., Greenberg B.M., Huner N.P.** Photochemistry and Photobiology, 2000, v. 72, № 6, p. 772–779.
14. **Джавршян Дж.М.** Первичные процессы фотосинтеза растений при загрязнении атмосферы и перспективы биофизического мониторинга: Автореф. дис. на соискание уч. степ. доктора биол. наук. Минск, 1991.
15. **Гавриленко В.Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л.М.** Большой практикум по физиологии растений. М.: Высш. школа, 1975, 392 с.
16. **Кузнецова С.А., Кукушкин А.К., Белов А.А.** Биофизика, 2001, т. 46, вып. 1, с. 141–145.
17. **Lazar D.** BBA, 1999, v. 1412, p. 1–28.
18. **Forse L., Critchley C.V., Rensen J.J.S.** Photosynthesis Research, 2003, v. 78, № 1, p. 17–33.
19. **Джавршян Дж.М., Тихонов А.Н.** Биолог. ж. Армении, 1982, т. XXXV, № 5, с. 335–339.

Հ. Ջ. ՄԻՆԱՍՅԱՆ, Ջ. Մ. ՃԱՎՐՇՅԱՆ

ՈՒՄ-ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԱԶԱՅԻՆ ԱՄՈՆԻԱԿՈՎ ՀՐԱՀՐՎԱԾ «ՀԻՊԵՐՔՐՈՄԱՅԻՆ ԷՖԵԿՏԻ» ՎՐԱ ԲՈՒՅՍԵՐԻ ՏԵՐԵՎՆԵՐՈՒՄ

Ամփոփում

Տվյալ աշխատանքում ուսումնասիրվել է ՈՒՄ-ճառագայթման և գազային ամոնիակի ազդեցությունը բարձրակարգ բույսերի ֆոտոսինթետիկ համակարգի վրա: Ցույց է տրվել, որ ՈՒՄ-ճառագայթման ազդեցությամբ ճնշվում է

բույսերի պիգմենտային ապարատի կլանման ընդունակությունը, մինչդեռ ճառագայթման և գազային ամոնիակի համատեղ ազդեցությունը մեծացնում է տերևների օպտիկական խտությունը: Տեղի է ունենում նաև պիգմենտ-սպիտակուցային համալիրների (Քլ *a*, Քլ *b* և կարոտինոիդներ) քայքայում և էլեկտրոն-տրանսպորտային շղթայի աշխատանքի ճնշում:

H. J. MINASYAN, J. M. JAVRSHYAN

INFLUENCE OF UV-RADIATION ON «HYPERCHROMIC EFFECT» INDUCED BY GASEOUS AMMONIA AT PLANTS' LEAVES

Summary

The influence of UV-radiation and ammonia on plants' PSA has been investigated. It has been shown that UV-radiation decreases the absorptive ability of pigment apparatus of plants. The combined influence of UV-radiation and ammonia increases the absorptive ability of leaves and inhibits the electron transfer chain of photosynthetic activity of plants. At the same time decrease of quantity of complex pigments (chlorophylls *a*, *b* and carotenoids) is observed.