

УДК 577.1

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЯН НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРОРАСТАЮЩИХ ЗЕРЕН ПШЕНИЦЫ

П. В. РОГОЖИН, Т. Т. КУРНЛЮК

(Якутская государственная сельскохозяйственная академия)

Показано, что в течение 24 ч набухания в различных частях семени отмечается возрастание уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержание антиоксидантов (АО) в зародыше в 3,3 и 2,8 раза, в эндосперме — соответственно в 2,2 и 3,3 раза. Облучение семян УФ светом повышает данные показатели, особенно в первые 30 мин. Ультрафиолетовое облучение семян в течение 10,15 и 20 мин вызывает увеличение к 6,12 и 18 ч набухания как уровня ПОЛ, так и количества антиоксидантов в прораставших семенах. Повышение ПОЛ в прорастающих семенах всегда, независимо от времени облучения, находится под контролем антиоксидантной системы, влияние которой проявляется на 16—20-й ч прорастания семян пшеницы повышением уровня антиоксидантов в 3—5 раз.

Семена культурных растений в отсутствие воды и при низкой температуре находятся в состоянии вынужденного покоя. Однако с возрастанием оводненности в семенах активируются основные метаболические процессы и повышается дыхание до максимального уровня, характеризующие их рост и развитие [14]. Период про-

растания семян делится на 3 этапа [15]: 1) активация метаболизма (этап физического набухания семян); 2) подготовка к началу роста растяжением (наклеивание семян за счет перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша); 3) собственно рост органов проростка. Известно, что для нормального прорастания

Принятые сокращения: ПОЛ — перекисное окисление липидов. МДА — малоновый дпальдегид, АОА — антиоксидантная активность, АО — антиоксиданты.

Печатается в рамках сотрудничества и обмена опытом.

в воздушно-сухих семенах должны присутствовать все компоненты белоксинтезирующей системы: рибосомы, тРНК, факторы инициации и элонгации, аминокислоты и аминоксил-тРНК-синтазы, все ферменты метаболизма, белки теплового шока и их мРНК [6, 17, 18, 20]. Во влажных семенах наблюдается активное потребление кислорода, который может вызывать окислительное повреждение тканей [15]. В развитии окислительного стресса играют роль активные формы кислорода (АФК): O^{\cdot} , O_2^{\cdot} , H_2O_2 , NO^{\cdot} , $NOCl$ и др. [19]. Накопление АФК в клетках приводит к нарушению протекания процессов транскрипции и репликации, изменению состава липидов мембран. Супероксидные радикалы модифицируют белки, нарушают структуру ДНК, разрушают гормоны и другие функционально активные вещества [8, 10]. Поэтому изучение проявления компенсаторных механизмов в семенах на действие АФК является общебиологической задачей [8].

В живых организмах существует физиологически нормальный уровень свободнорадикальных процессов и перекисного окисления липидов, необходимый для регулирования липидного состава и проницаемости мембран и ряда биосинтетических процессов [4, 11]. Контроль за содержанием АФК в семенах осуществляют антиоксиданты, являющиеся ингибиторами свободнорадикального окисления.

Набухание и прорастание семян всегда сопровождается активированием оксидазных процессов [5]. УФ-облучение семян может ини-

цировать возрастание ПОЛ, регулируемое в живых организмах компонентами антиоксидантной системы. Однако антиокислительная активность, особенно в первые часы прорастания зерен пшеницы, не изучена. При этом известно, что прорастание семян сопровождается высоким потреблением кислорода, активные формы которого участвуют в процессах пролиферации клеток [1], регенерации тканей [3], развитии иммунитета растения [12].

Цель данной работы — исследовать влияние малых доз ультрафиолетового облучения семян на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительную активность во время набухания и прорастания семян пшеницы; изучить роль антиоксидантной системы в регулировании ПОЛ в первые сутки прорастания семян.

Методика

В работе использовали о-фенантролин фирмы «Serva» (Германия), ТБК — о.с.ч. (Реахим), трипон Х-100 — препарат фирмы «Ferak Berlin», этанол очищали перегонкой. Объектом исследования служили семена пшеницы (*Triticum aestivum L.*) сорта Приленская 19. Контрольные и опытные (после УФ-облучения) семена вначале замачивали в дистиллированной воде 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 22° С на свету, смачивая их дистиллированной водой (10 мл на чашку Петри). Число семян в одной чашке — 100, число повторностей в каждом варианте — 4.

Для индукции перекисного окисления липидов семена с влажностью 5—6% и чашках Петри помещали под ртутно-кварцевую лампу БНП02-30-001 УЗ,5 (Россия) с интенсивностью облучения 30 Вт/м³, расположенную от семян на расстоянии 25 см.

Для анализа продуктов тиобарбитуровой кислоты и антиоксидантов 1 г сырой массы семян или проростков семян гомогенизировали в фарфоровой ступке с 3 мл 50° о раствора этанола, гомогенат центрифугировали 10 мин при 7000 г. Содержание малонового диальдегида исследовали по реакции с тиобарбитуровой кислотой при 532 нм, $\epsilon = 155 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [4] с нашими модификациями. К 0,5 мл супернатанта последовательно добавляли 0,5 мл 1% раствора тритона X-100, 0,2 мл 0,6 М HCl и 0,8 мл 0,06 М ТБК. Смесь нагревали на кипящей водяной бане 10 мин. Охлаждали при 15° С 30 мин. Для стабилизации окраски добавляли 0,2 мл 5 мМ трилона Б и 5—10 мл 96% этанола. Контролем служила пробирка, в которую добавляли те же растворы, кроме ТБК. Содержание МДА в проростках выражали в нмоль/г сухой массы.

Анализ антиоксидантов проводили по методике [13]. К 0,2 мл супернатанта последовательно добавляли 0,2 мл 0,5% о-фенантролина в 96% этаноле и 0,2 мл 0,2% FeCl₃ в 96% этаноле, затем объем доводили до 3 мл 96% этанола и выдерживали 10 мин в темноте. Количество антиоксидантов определяли по калибровочному графику, построенному для кверцетина, и рассчитывали в мкг/г сухой массы.

Спектрофотометрические исследования проводили на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы «Varian» (США). Для статистической обработки результатов использовали методику [9], применяя, ППП Снедекор V2.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показана динамика накопления малонового диальдегида и антиоксидантов в зародыше и эндосперме при набухании семян пшеницы в дистиллированной воде в течение 24 ч. Видно, что уровень ПОЛ и АО возрос в зародыше в 3,3 и 2,8 раза, в эндосперме — соответственно в 2,2 и 3,3 раза.

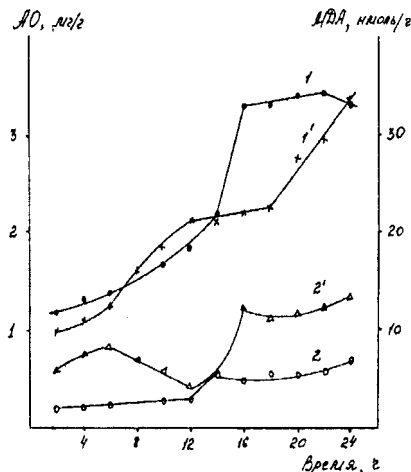


Рис. 1. Динамика накопления антиоксидантов (1, 2) и малонового диальдегида (1', 2') в зародыше (1, 1') и эндосперме (2, 2') семян пшеницы сорта Приленская 19 от времени набухания. Условия: 22° С, среда набухания — дистиллированная вода.

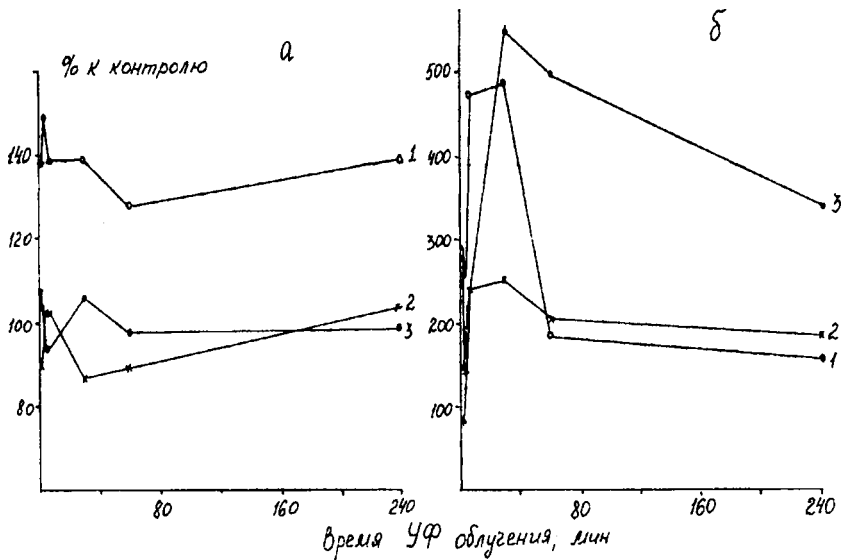


Рис. 2. Влияние УФ-облучения на содержание антиоксидантов (а) и малонового дигидроксиацетальдегида (б) в эндосперме (1), щитке (2) и зародыше (3) семян пшеницы сорта Приленская 19. Условия: 22° С, время замачивания 24 ч в дистиллированной воде.

Ультрафиолетовое излучение активирует перекисное окисление липидов [16]. При облучении семян пшеницы УФ светом в них повышаются уровень ПОЛ и содержание антиоксидантов (рис. 2). Особенно это проявляется в течение первых 30 мин. Резкое увеличение ПОЛ отмечено в зародыше семян в 5,5 раза, эндосперме — в 4,9 раза, в щитке — в 2,5 раза. При этом антиокислительная активность повысилась в эндосперме в 1,5 раза, а в зародыше и щитке — на 5—8%. Продолжительное действие УФ-излучения, по-видимому, за счет активизации компенсаторных механизмов, проявляющихся в повышении содержания антиоксидантов, способствует понижению уровня ПОЛ.

Таким образом, во время замачивания, после предварительного УФ-облучения семян пшеницы, наибольшая реактивность антиоксидантной системы наблюдается после 24 ч в эндосперме, что, возможно, связано с ускорением в эндосперме гидролитических процессов, способствующих высвобождению резервированных функционально активных веществ, среди которых могут быть и соединения, обладающие антиоксидантными свойствами. В этот период в зародыше и щитке не происходит дополнительного повышения активности антиоксидантной системы, что, по-видимому, вызвано использованием компонентов АО в энергетических процессах для роста и разви-

тмя зародыша семян пшеницы. Окисление антиоксидантов осуществляется пероксидазой, активность которой резко возрастает при прорастании семян пшеницы [7].

О динамике содержания антиоксидантов и ПОЛ в зародыше семян пшеницы во время 48 ч набухания в дистиллированной воде можно судить по рис. 3. Видно, что во время набухания содержание АО и уровень ПОЛ колеблются, возрастая к 18 и 30 ч, а затем отмечаются различия в динамике, вызванные продолжающимися условиями анабиоза, которые приводят к понижению интенсивности дыхания. При этом уровень ПОЛ в семенах понижается, а содержание антиоксидантов увеличивается, что, по-видимому, является проявлением биохимических механизмов углубления их покоя.

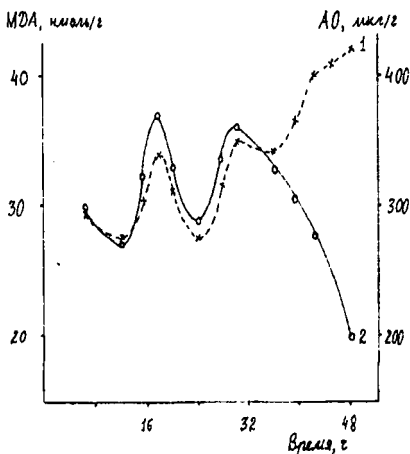


Рис. 3. Динамика содержания антиоксидантов (1) и малонового диальдегида (2) в зародыше семян пшеницы сорта Прилепская 19 от времени замачивания.

Аналогичная динамика уровня ПОЛ и содержания антиоксидантов выявлена в щитке семян пшеницы при их набухании. Щиток выполняет важную роль в процессах набухания и прорастания семян пшеницы. Основная его функция заключается в осуществлении связи между эндоспермом и всеми структурами зародыша, поскольку в щитке дифференцируется проводящая система. За счет специализированного эпителиального слоя щитка, в котором имеется большое количество ферментов, происходят структурные преобразования веществ, поступающих из эндосперма в зародыш, а в дальнейшем и в проросток [2]. Показано, что уровень ПОЛ и активность антиоксидантной системы щитка находятся в прямой зависимости (рис. 4) ($r=0,84$). Максимум проявления их действия

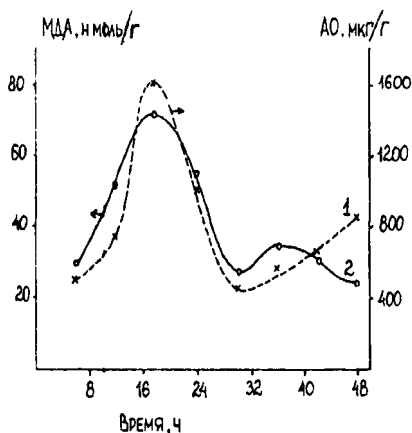


Рис. 4. Содержание антиоксидантов (1) и малонового диальдегида (2) в щитке семян пшеницы сорта Прилепская 19 от времени замачивания (на 1 г сухой ткани).

приходится на 18 ч набухания семян с постепенным снижением к окончанию вторых суток. При этом в щитке возрастание аутиокислительной активности всегда отмечается вслед за увеличением уровня ПОЛ. По-видимому, во время набухания в семенах срабатывает внутренний контроль за уровнем ПОЛ и при его понижении, что наблюдалось на 2-е сутки замачивания семян в условиях искусственного анабиоза, отмечалось даже некоторое возрастание АОА в щитке.

УФ-облучение семян пшеницы активирует ПОЛ и систему АОА щитка (рис. 5). Видно, что в зависимости от времени УФ-облучения поведение антиоксидантной системы может меняться. Непродолжительное, в течение 5 мин,

УФ-облучение позволяет активировать компенсаторные механизмы настолько, что антиокислительная активность щитка может подавлять ПОЛ в течение полутора суток. Однако в дальнейшем АОА щитка резко понижается, что способствует возрастанию ПОЛ. Продолжительное УФ-облучение семян позволяет синхронизировать активность аутиоксидантной системы с уровнем ПОЛ в щитке. При этом на возрастание ПОЛ в щитке вырабатывается достаточное количество антиоксидантов, чтобы поддерживать перекисное окисление липидов на уровне контроля. Вследствие этого графики содержания МДА и АО в течение 2 суток принимают вид затухающих колебаний с максимумами к 30 ч набухания.

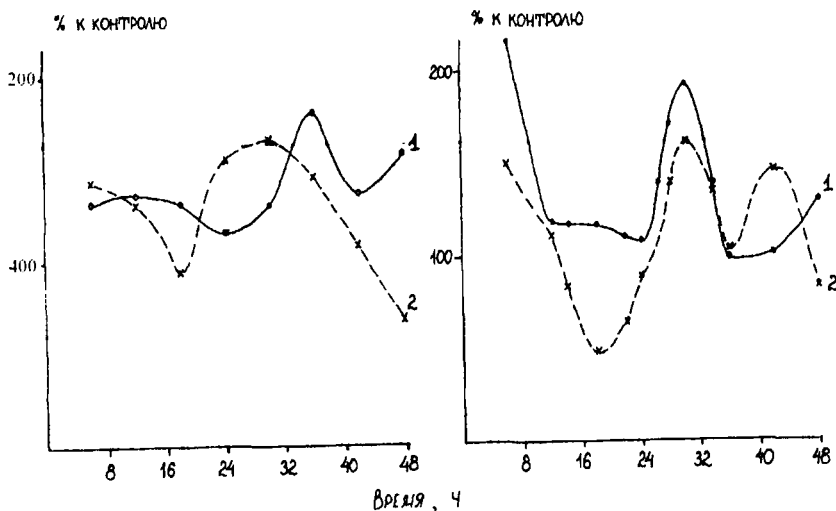


Рис. 5. Влияние УФ-облучения семян пшеницы Приленская 19 на содержание малонового диальдегида (1) и антиоксидантов (2) в щитке во время первых двух суток замачивания семян. Время УФ-облучения семян пшеницы: 5 мин (слева). 60 мин (справа). За 100% приняты значения МДА и АО семян, не подвергавшихся УФ-облучению.

Известно, что высокая температура понижает скорость прорастания семян. В непроросших семенах пшеницы уровень ПОЛ и АО ниже, чем в проросших. При сравнении значений содержания МДА и АО, приведенных в таблице, видно, что у непроросших семян и семян, выдержанных при 5° С, эти показатели мало различаются. Таким образом, низкий уровень ПОЛ служит критерием проявления малой активности АФК, при этом по величине ПОЛ можно определять жизнеспособность семян пшеницы.

После 24 ч набухания при 20° С семена пшеницы начинают активно прорастать, что проявляется в активизации процессов пролиферации, завершающихся через 16—24 ч формированием проростка пшеницы. Нами изучено содержание малонового диальдегида и антиоксидантов в прорастающих семенах пшеницы после 24 ч замачивания в дистиллированной воде (рис. 6).

Содержание малонового диальдегида и антиоксидантов в непроросших семенах пшеницы сорта Приленская 19 в зависимости от времени и температуры проращивания

Время прорастания зерен, сутки	Температура, °С			
	5		20	
	МДА	АО	МДА	АО
1	24±1	105±7	42±2	90±5
2	27±1	102±6	24±1	78±4
3	29±1	76±4	29±2	36±1
4	23±2	100±5	30±1	93±5
5	32±2	62±4	27±1	20±1
6	29±1	62±3	35±1	95±6
7	26±1	55±4	29±1	96±5

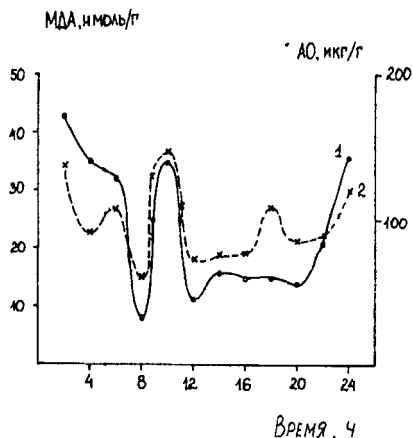


Рис. 6. Динамика МДА (7) и АО (2) в семенах пшеницы сорта Приленская 19 в течение первых суток проращивания. Условия: 22° С, время замачивания семян пшеницы 24 ч. Среда замачивания и проращивания дистиллированная вода.

Видно, что в процессе проращивания антиоксидантная система семян полностью контролирует уровень ПОЛ. Возрастание ПОЛ отмечается к 10 и 24 ч прорастания семян и связано оно с увеличением АОА ($r=0,79$). УФ-облучение вызывает в прорастающих семенах пшеницы колебания уровней ПОЛ и АОА, интенсивность которых зависит от времени его воздействия (рис. 7). Динамика ПОЛ в проростках уже после минутного УФ-облучения семян пшеницы принимает выраженный колебательный характер с возрастанием к 4, 12 и 22 ч ($r=0,5$). При этом АОА в первые часы прорастания семян понижалась, а затем к 18 ч повысилась. После 5 мин УФ-облучения в прорастающих семенах активность антиоксидантной системы

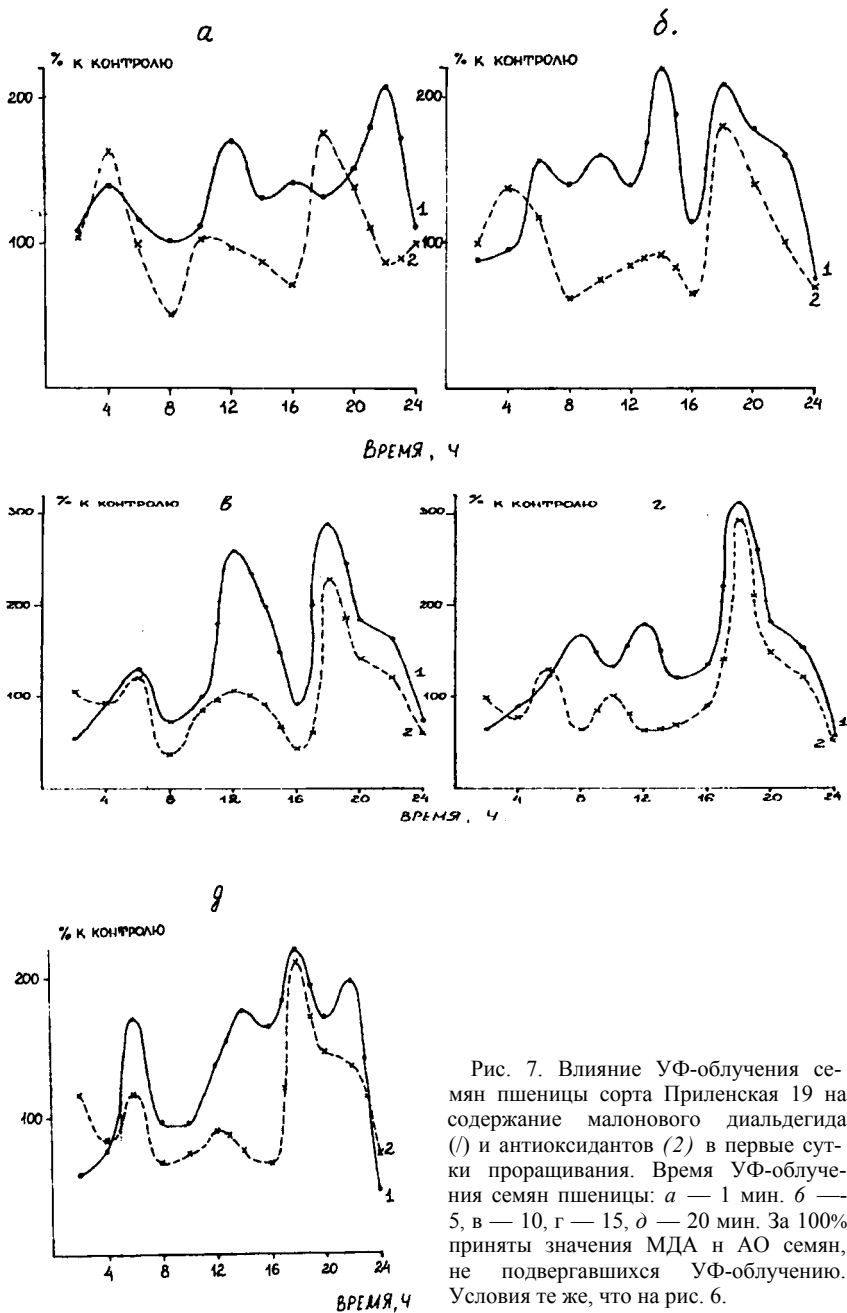


Рис. 7. Влияние УФ-облучения семян пшеницы сорта Приленская 19 на содержание малонового диальдегида (1) и антиоксидантов (2) в первые сутки проращивания. Время УФ-облучения семян пшеницы: а — 1 мин. б — 5, в — 10, г — 15, д — 20 мин. За 100% приняты значения МДА и АО семян, не подвергавшихся УФ-облучению. Условия те же, что на рис. 6.

вначале прорастания уменьшаются, но к 18 ч возрастает в 1,5—1,8 раза ($r=0,5$). Ультрафиолетовое облучение семян в течение 10, 15 и 20 мин вызывает одновременное увеличение к 6, 12 и 18 ч уровня и ПОЛ и антиоксидантов ($r=0,5—0,92$). Повышение ПОЛ в прорастающих семенах независимо от времени УФ-облучения всегда находится под контролем антиоксидантной системы, влияние которой проявляется на 16-20-й ч прорастания семян пшеницы повышением уровня антиоксидантов в 3-5 раз. Однако при продолжительном УФ-облучении в семенах вырабатываются компенсаторные механизмы, которые противодействуют образованию свободных радикалов в прорастающих семенах пшеницы, использующих кроме антиоксидантов еще, возможно, и другие механизмы подавления ПОЛ, поскольку после 15—20 мин УФ-облучения в прорастающих семенах содержание малонового диальдегида понижается даже несмотря на то, что АОА в них может быть ниже контрольного уровня.

Таким образом, на основании полученных данных можно высказать предположение, что контроль за уровнем ПОЛ во время набухания и прорастания семян пшеницы осуществляется с помощью низкомолекулярных антиоксидантов, содержание которых связано с уровнем ПОЛ в зернах. После УФ-облучения в семенах возрастает уровень ПОЛ. Понижение свободнорадикальных процессов в семенах возможно за счет синтеза большого количества антиоксидантов, концентрация которых при этом возрастает в несколько раз, особенно в зароды-

ше семян пшеницы. Выявленные закономерности, по-видимому, являются проявлением адаптационных компенсаторных механизмов, использование которых позволяет регулировать состояние покоя семян. Уменьшение содержания антиоксидантов обеспечивает быстрый выход семян из состояния покоя, тогда как накопление антиоксидантов способствует углублению пшобнотического состояния семян пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аскарова Э. А., Капиталов А. Б., Кольпювер В. И.-С., Татищев О. С. Генерация супероксидных радикалов и текучесть мембранных липидов *Aciiroleplasma laidlawii* при старении культуры клеток. — Биофизика, 1987, т. 32, № 1, с. 95. — 2. Батыгина Т. Б. Хлебное зерно: Атлас. Л.: Наука, 1987. — 3. Вартанян Л. С., Садовникова И. П., Гуревич С. М., Соколова И. С. Образование супероксидных радикалов в мембранах субклеточных органелл регенерирующей печени. — Биохимия, 1992, т. 57, № 5, с. 671—678. — 4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. — 5. Гумилевская И. А., Арабова Л. П., Чумикина Л. В., Шатилов В. Р. Действие повышенных температур на семена гороха в период прорастания. — Физиол. растений, 1997, т. 44, № 5, с. 690—698. — 6. Гумилевская И. А., Чумикина Л. В., Шатилова В. Р. Синтез белка и РНК в прорастающих семенах. — Биохимия, 1995, т. 60, № 1, с. 35—45. — 7. Иванова З. А., Вафина Г. Х. Физиологическая роль

пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений. — Физиол. и биохимия культ. растений, 1997, т. 29, № 2, с. 129—132. — 8. *Козан А. Х., Грачев С. В., Елисева С. В., Болевич С.* Углекислый газ — универсальный ингибитор генерации активных форм кислорода клетками. — Изв. АН, сер. биол., 1997, № 2, с. 204—217. — 9. *Лакш Г. Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. — 10. *Козан А. Х., Кудрин А. Н., Кактурский Л. В., Лосев Н. П.* Свободнорадикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда. — Патофизиология и экспериментальная терапия, 1992, № 2, с. 5—15. — 11. *Ланкин В. З., Осип Ю. Г., Тихазе А. К.* Гидроперокси- и гидроксипроизводные свободных ненасыщенных жирных кислот и фосфолипидов как модификаторы структуры липосомальных мембран. — Докл. РАН, 1996, т. 351, № 2, с. 269—271. — 12. *Лукацкий А. С., Шаркаев Э. Ш., Зауралов О. А.* Изменения перекисного окисления липидов в листьях теплолюбивых растений при различной длительности холодового стресса. — Фи-

зиол. растений, 1995, т. 42, № 4, с. 607—611. — 13. Методы биохимического исследования растений/Под ред. А. И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987. — 14. *Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н.* Справочник по прорастанию семян покоящихся растений. Л.: Наука, 1985. — 15. *Обручева Н. В., Антипова О. В.* Физиология инициации прорастания семян. — Физиол. растений, 1997, т. 44, № 2, с. 287—302. — 16. *Роциунки Д. И., Мурина М. А.* Фотобиологические процессы в биомембранах при действии ультрафиолетового излучения на клетки, ткани и органы животных. — Биофизика, 1993, т. 38, № 6, с. 1053—1068. — 17. *Bewley J. D., Black M.* Seeds: Physiology of Development and Germination. N. Y.: Plenum Press, 1994. — 18. *Howarth C.* Plant Cell Environm, 1990, vol. 13, N 1, p. 57—64. — 19. *Ursini F., Barsacchi R., Pelosi G., Benassi A. J.* Bioluminesc. and Chemiluminesc, 1989, vol. 4, N 1, p. 241—254. — 20. *Vazquez-Ramos J. M., Lopez S., Vazquez E., Murillo E. J.* Plant Physiol, 1988, vol. 135, N 4, p. 416—421.

Статья поступила 5 января 1999 г.

SUMMARY

It is shown that during 24 hours of swelling the level of peroxidation in lipids and antioxidants in creases in different parts of wheat seed: in germ — 3,3 and 2,8 times in endosperm — 2,2 and 3,3 times respectively. Ultraviolet irradiation of wheat seed increases the level of lipid peroxidation and the content of antioxidants. It is especially displayed during the first 30 minutes. Ultraviolet irradiation of wheat seed during 10, 15 and 20 minutes by 6, 12 and 18 hours causes simultaneous increase both of lipid peroxidation level and of antioxidant content in wheat sprouts. The increase of lipid peroxidation in wheat sprouts is always, independently on the duration of ultraviolet irradiation, under control of antioxidant system, its influence being displayed by 3—5 times higher level of antioxidants after 16—20 hours of wheat seed sprouting.