

РАДИОПРОТЕКТОРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ РУТИНА И
РУТИНАТА ЖЕЛЕЗА НА СЕМЕНА ПШЕНИЦЫС.А.МАМЕДЛИ¹, Р.И.ХАЛИЛОВ²¹ *Институт радиационных проблем НАН Азербайджана*² *Бакинский Государственный Университет*

Проведено исследование радиопротекторной активности рутина и рутината железа при остром гамма-облучении семян пшеницы сорта «Qirmizi bugda». Предварительная обработка семян этими препаратами приводила к стабилизации содержания пигментов хлорофиллов и каротиноидов и к снижению количества хромосомных аберраций в апикальной меристеме проростков пшеницы, полученных из облученных семян.

Введение. Возрастание уровня загрязнения окружающей среды поллютантами антропогенного происхождения с широким спектром действия, в частности, радионуклидного загрязнения, актуальной задачей является поиск эффективных препаратов природного происхождения, способных оказывать защитное действие на клетки и их геном.

В качестве перспективного источника веществ с радиопротекторными свойствами рассматривают растительный материал, что связано, прежде всего, с его относительной доступностью как сырья, нетоксичностью или низкой токсичностью получаемых из него продуктов, их стабильностью, положительным системным характером воздействия на организмы [1, 2].

Целью данного исследования было изучение радиопротекторных свойств рутина, полученного из софоры, и его комплексов с железом путем анализа биохимических параметров, а также с использованием метода цитогенетической оценки количества хромосомных аберраций (ХА) в анафазных клетках проростков пшеницы, полученных из облученных семян, предварительно обработанных данными препаратами.

Материалы и методы исследования. Облучение семян растений проводили на установке «Рхунд» (⁶⁰Со) при мощности дозы излучения 0,5-1 Гр/мин).

В опытных вариантах семена пшеницы перед облучением предварительно обрабатывали в течение 15 ч раствором рутина или рутината железа, внося по 6 мл этих растворов на вариант, в контроле использовали дистиллированную воду.

Для получения рутина 20 г цветков софоры (*Sophora japonica L.*) заливали 150 мл этилового спирта и кипятили в течение 2 ч в аппарате Сокслет. Полученный экстракт фильтровали и выпаривали на водяной бане. Для удаления масел и других веществ экстракт 2 раза обрабатывали 10 мл этилового эфира.

Контрольные и облученные семена проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при 24-28 °С.

При появлении первичных корешков длиной 1,0-1,5 см их фиксировали в смеси Карнуа (этиловый спирт: ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1), через 24 часа переносили в 80 % этиловый спирт. Окрашивание производили ацетоарсеином [3]. Получали временные и постоянные препараты. На цитологических препаратах подсчитывали количество aberrантных анафаз и определяли количество ХА на клетку. При применении анафазного метода подсчитывали образующиеся мосты, хромосомные фрагменты, отстающие хромосомы и другие нарушения. В каждом варианте анализировали 100 анафаз и ранних телофаз, не разделяя хромосомные aberrации по отдельным категориям, как рекомендуется в [4, 5]. Частоту aberrантных анафаз выражали в процентах от просмотренных соответствующих фаз митоза (по 200 на каждый вариант).

Количественное определение содержания хлорофиллов а и b в листьях растений проводили спектрофотометрическим методом с использованием 80 % ацетона [6]. Для статистической обработки полученных данных рассчитывали t_d и p по общепринятой методике [7].

Результаты и их обсуждение

Влияние обработки рутином на содержание пигментов хлорофиллов и каротиноидов у растений пшеницы сорта «Qirmizi bugda». К числу физиолого-биохимических параметров, широко применяемых в биотестировании, относятся интенсивность фотосинтеза или соотношение фотосинтеза и деструкции, содержание хлорофилла и других пигментов [6]. Мы определяли содержание хлорофиллов а и b, а также каротиноидов у растений, полученных из облученных семян, с предварительной обработкой и без обработки препаратом рутина.

У растений пшеницы, предшествовавшая облучению обработка семян рутином, не вызывала повышения содержания хлорофилла а, но уменьшала радиационно-индуцированное снижение его содержания, при повышении содержания хлорофилла b (табл. 1). Суммарное содержание хлорофиллов при облучении было выше у вариантов с предварительной обработкой рутином. Предварительная обработка семян рутином снижала величину отношения хлорофилла а и b во всех вариантах опыта.

Таблица 1

Влияние обработки рутином на содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений пшеницы, $p < 0.01$

Доза, Гр	Варианты	Хл а	Хл b	Хл а+b	Хл а/b	Карот.	Хл а+b /карот.
0 гр	Контроль	2.61	0.76	3.37	3.43	1.44	2.34
1	Контроль	2.34	0.73	3.07	3.21	1.25	2.46
	Рутин	2.50	1.30	3.8	1.92	0.79	4.81
2.5	Контроль	2.11	0.67	2.78	3.15	1.10	2.53
	Рутин	2.19	1.20	3.39	1.82	0.87	3.89
5	Контроль	2.02	0.64	2.66	3.15	0.93	2.86
	Рутин	2.05	1.09	3.14	1.88	0.74	4.24
10	Контроль	1.77	0.58	2.35	3.05	0.82	2.86
	Рутин	1.97	0.99	2.96	1.99	0.67	4.42
15	Контроль	1.75	0.54	2.29	3.24	0.79	2.89
	Рутин	1.88	0.98	2.86	1.99	0.63	4.54

Эта же тенденция сохранялась даже в случае применения высоких доз облучения 200, 250 и 300 Гр (табл. 2). Суммарное содержание хлорофиллов даже при дозе облучения 250 Гр составляло 81 % от величины необлученного контроля (в варианте с облучением без обработки – примерно 76 %).

Таблица 2

Влияние обработки рутином на содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений пшеницы при облучении семян в высоких дозах, $p < 0.01$

Доза, Гр	Варианты	Хлорофилл a	Хлорофилл b	Хлорофилл a+ b	Хлорофилл a/ b	Каротиноиды	Хлорофилл a+ b /каротиноиды
0	Контроль	4.28	1.33	5.61	3.22	0.99	5.66
200	Контроль	3.61	1.10	4.71	3.28	0.76	6.19
	Рутин	3.70	1.29	4.99	2.86	0.84	5.94
250	Контроль	3.23	1.04	4.27	3.10	0.72	5.93
	Рутин	3.42	1.11	4.53	3.08	0.79	5.73
300	Контроль	3.15	0.97	4.12	3.25	0.68	6.05
	Рутин	3.27	0.98	4.25	3.34	0.73	5.82

В отношении содержания каротиноидов, обработка рутином вызывала более выраженное их снижение, чем у вариантов с одним облучением. При этом значительно повышалось отношение концентраций суммарного хлорофилла и каротиноидов (табл. 1). При облучении в высоких дозах обработка рутином, наоборот, обуславливала ослабление этого процесса (табл. 2). Например, при дозе облучения семян 200 Гр в случае обработки рутином содержание каротиноидов составляло 85 % от контроля, тогда как у варианта с одним облучением – около 76 %. Приводимые в литературе данные о влиянии облучения на содержание растительных пигментов в целом согласуются с нашими данными. В частности, облучение семян засухоустойчивого сорта пшеницы „Гырмызы Бугда” в дозах 30 и 60 Гр при мощности дозы 0,5-1,0 Гр/мин не вызывало существенных изменений в содержании хлорофиллов и каротиноидов [5]. У проростков пшеницы облучение в дозе 60 Гр приводило к снижению содержания каротиноидов и хлорофиллов. При этом γ -облучение в этой дозе влияло на содержание каротиноидов меньше, чем на содержание хлорофиллов [5]. Облучение в дозе 60 Гр вызывало также увеличение выхода хромосомных aberrаций у проростков .

Синтез защитных пигментов является хорошо изученным ответом растений на воздействие ионизирующего и УФ-излучения. Каротиноиды являются важнейшими антиоксидантами липидной природы, которые защищают клетку от воздействия синглетного кислорода. Антиоксидантные свойства каротиноидов зависят от их структуры, степени сродства к клеточным фосфолипидам и липопротеидам, от локализации молекул каротиноидов в мембране и их окружения, а также от парциального давления кислорода . Каротиноиды являются предшественниками витамина А, также обладающего мощным антиоксидантным действием. Каротиноиды защищают хлорофиллы от окислительной деструкции, в связи с чем изменения их концентрации более выражены [5].

Снижение содержания хлорофиллов вследствие облучения может происходить как из-за их биохимической деструкции, так и в результате повышения количества растительных клеток, несущих хлорофильные мутации. Пигментные мутации принадлежат к классу легко обнаруживаемых и хорошо изученных му-

таций у высших растений. В частности, хлорофильные мутации являются важным показателем воздействия различных мутагенов на растения, классическим критерием при оценке эффективности мутагенного действия ионизирующего излучения.

Таблица 3

Влияние обработки рутинатом железа на содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений пшеницы, $p < 0.01$

Доза, Гр	Варианты	Хлорофилл а	Хлорофилл b	Хлорофилл a+ b	Хлорофилл a/ b	Каротиноиды	Хлорофилл a+ b /каротиноиды
0	Контроль	2.61	0.76	3.37	3.43	1.44	2.34
	Рутинат железа	2.42	1.37	3.79	1.77	0.83	4.57
2.5	Контроль	2.11	0.67	2.78	3.15	1.10	2.53
	Рутинат железа	2.16	1.15	3.31	1.88	0.80	4.14
5	Контроль	2.02	0.64	2.66	3.15	0.93	2.86
	Рутинат железа	2.14	1.09	3.23	1.96	0.78	4.14
10	Контроль	1.77	0.58	2.35	3.05	0.82	2.86
	Рутинат железа	1.98	0.99	2.97	2.0	0.59	5.03
15	Контроль	1.75	0.54	2.29	3.24	0.79	2.89
	Рутинат железа	1.91	0.96	2.87	1.99	0.60	4.78

Таблица 4

Влияние обработки рутинатом железа на содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений пшеницы при облучении семян в высоких дозах, $p < 0.01$

Доза, Гр	Варианты	Хлорофилл а	Хлорофилл b	Хлорофилл a+b	Хлорофилл a/b	Каротиноиды	Хлорофилл a+b/каротиноиды
0	Контроль	4.28	1.33	5.61	3.22	0.99	5.66
	Рутинат железа	3.89	1.40	5.29	2.78	0.91	5.81
250	Контроль	3.23	1.04	4.27	3.10	0.72	5.93
	Рутинат железа	3.51	1.27	4.78	2.76	0.85	5.62
300	Контроль	3.15	0.97	4.12	3.25	0.68	6.05
	Рутинат железа	3.31	1.05	4.36	3.15	0.79	5.52

При выращивании растений ржи *Secale cereale* и ячменя *Hordeum sativum* в зоне Чернобыльской АЭС в первые месяцы после аварии было обнаружено увеличение частоты встречаемости различных типов хлорофилльных мутаций. При этом преобладали нежизнеспособные мутации типа *albina*. В последующие годы семена, собранные в зоне, высевали вновь. В 30-километровой зоне отчуждения Чернобыльской АЭС у ржи и ячменя регистрировали многократное повышение спонтанного уровня выхода хлорофилльных мутаций. Было отмечено, что в каждом последующем поколении мутации не элиминировались, поскольку высеянные семена подвергались последующему воздействию ионизирующего излучения. В популяциях василька шероховатого *Centaurea scabiosa*, произрастающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа, спустя 38 лет после аварии наблюдали повышенный уровень хлорофилльных мутаций типа *albina* и *xantha*, форм с повышенным уровнем содержания антоциановых

пигментов, а также хромосомных aberrаций [6].

Таким образом, предварительная обработка семян рутином и рутинатом железа оказывала модифицирующее влияние на содержание фотосинтетических пигментов у растений, полученных из облученных семян.

Влияние рутина и рутината железа на выход хромосомных aberrаций у пшеницы. Предшествующая облучению обработка как рутином, так и рутинатом железа вызывала существенное снижение выхода ХА на клетку. При дозе облучения 10 Гр количество ХА по сравнению с необработанным вариантом было меньшим приблизительно в 1,6 раза, а при дозе 15 Гр количество ХА уменьшалось в 1,4 раза (табл. 5).

Таблица 5

Влияние обработки рутином, рутинатом железа, тиокарбамидом и пирокатехином на выход хромосомных aberrаций у растений пшеницы

Варианты	Доза, Гр		
	0	30	60
Контроль	1.02	8.95	13.83
P _(0 гр)		p<0.01	p<0.01
Рутин		4.20	7.08
P		p<0.01	p<0.01
рутин+Fe		3.79	6.45
P		p<0.01	p<0.01
тиокарбамид+Fe		4.63	7.02
P		p<0.01	p<0.01
пирокатехин+Fe		5.40	11.18
P		p<0.01	p<0.01

P – достоверность различия по отношению к контролю

В литературе приводятся данные исследований радиозащитных свойств таких соединений как пирокатехин, тиокарбамид и Fe-тиокарбамид. В соответствии с этими данными, обработка семян пшеницы перед облучением пирокатехином, тиокарбамидом и Fe-тиокарбамидом почти не влияла на биосинтез фотосинтетических пигментов, тогда как Fe-пирокатехинат оказывал заметное радиопротекторное действие – содержание хлорофиллов у проростков в этом варианте было почти на уровне контроля, содержание каротиноидов при облучении в дозе 60 Гр – выше контроля [9]. Кроме того, обработка Fe-пирокатехинатом значительно снижала выход хромосомных aberrаций [4].

Мы провели сравнительное изучение радиопротекторных свойств Fe-тиокарбамидом, Fe-пирокатехинат, рутина и рутината железа по критерию выхода ХА в клетках корневой меристемы проростков пшеницы. В результате было установлено, что рутин и рутинат железа показали большую эффективность, чем такие известные антимуагены, как Fe-тиокарбамидом и Fe-пирокатехинат (табл. 5). Таким образом, показано, что обработка рутином и рутинатом железа оказывает стабилизирующее воздействие на содержание фотосинтетических пигментов у растений даже при высоких дозах облучения. Рутин и рутинат железа обладают радиопротекторным и антимуагенным действием, снижая выход ХА в соматических клетках растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудков И.Н. Стратегия биологической противорадиационной защиты: радиопротекторы, радиоблокаторы, радиодекорпоранты // Проблемы безопасности атомных электростанций в Чернобыля. – 2005. – Вып. 3. Ч. 1. – С. 133-139.
2. Мусіяка В.К. Антимутагенні властивості препаратів природного походження // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – 33, № 3. – С. 216 – 225.
3. Методичні вказівки до спецпрактикуму „Експериментальний мутагенез” для студентів біологічного факультету / Упорядн. Проніна О.В., Рушковський С.Р., Александрова О.І., Лазаренко Л.М., Козерецька І.А. – К.: Фітосоціоцентр, 2002. – 24 с.
4. Rank J., Nielsen M.H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures // Hereditas. – 1993. – № 118. – P. 49-53.
5. Rank J., Jensen A.G., Skov B., Pedersen L.H., Jensen K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test // Mutat. Res. – 1993. – № 300. – P. 29-36.
6. Сапожников Д.П., Маслова Т.Г., Попова О.Ф., Попова И.А., Корнеева О.Я. Метод фиксации и хранения листьев для количественного определения пигментов пластид // Ботан. журн. – 1979. – Т.63, № 11. – С. 1586-1592.

BUĞDA TOXUMLARINA RUTİN VƏ DƏMİR RUTİNATIN RADİOPROTEKTOR TƏSİRİ

S.A.MƏMMƏDLİ, R.İ.XƏLİLOV

XÜLASƏ

«Qırmızı bugda» toxumlarında qamma-şüalarının təsiri altında rutin və dəmir-rutinatin radioprotektor aktivliyi tədqiq olunmuşdur. Toxumların bu preparatlarla əvvəlcədən işlənilməsi yarpaqlarda pigmentlərin və karotinoidlərin miqdarının tənzimlənməsinə və köklərin meristem hüceyrələrində xromosom aberasiyalarının miqdarının azalmasına səbəb olmuşdur.

RADIOPROTECTOR INFLUENCE OF PREPARATIONS RUTINE AND RUTINE IRON ON SEEDS OF WHEAT

S.A.MAMEDLI, R.I.CHALILOV

SUMMARY

The radioprotective activity of routine and ferrous routinate at the sharp gamma-irradiation of wheat seeds of cultivar «Qırmızı bugda» was investigated. Preliminary processings of seeds by these preparations resulted in stabilization of chlorophylls and carotenoid contents and significant decrease of chromosomal aberrations in root apex meristem of wheat seedlings received from irradiated seeds.

Key words: what, *Sophora japonica L.*, seeds, gamma-irradiation, routines, ferrous routinate, pigments, chromosomal aberrations