

MAGDALENA RYBUS-ZAJĄC

Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

CZY ZWIĘKSZONE PROMIENIOWANIE UV-B MODYFIKUJE POZIOM BARWNIKÓW CHLOROPLASTOWYCH ORAZ ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W SIEWKACH OGÓRKA

Streszczenie. W pracy badano wpływ zwiększonego promieniowania UV-B (16 kJ/m^2 w ciągu doby) na poziom chlorofilu *a* i *b*, karotenoidów oraz związków fenolowych w siewkach ogórka. W roślinach poddanych działaniu UV-B zawartość barwników chloroplastowych była większa niż w kontroli. Stwierdzono też stymulację gromadzenia związków fenolowych, w tym flawonoidów.

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus* L., UV-B, barwniki chloroplastowe, związki fenolowe

Wstęp

Rośliny rosnące w warunkach naturalnych są narażone na działanie niekorzystnych czynników środowiska, zarówno natury abiotycznej, jak i biotycznej. Jednym z czynników abiotycznych jest stres radiacyjny. Nadmierna ilość energii docierająca do roślin może w nich powodować różnorodne niekorzystne zmiany. Na poziomie molekularnym dotyczą one destrukcji DNA, białek i nawet niektórych organelli komórkowych (DUBE i BORNMAN 1992, YAKIMCHUK i HODDINOTT 1994, ZARĘBSKA 2000, HOLLÓSY 2002, ZANCAN i IN. 2006). Badania dowodzą, że zwiększone promieniowanie może powodować w roślinach liczne zaburzenia związane z przebiegiem fotosyntezy. Dotyczą one m.in. zmian poziomu barwników chloroplastowych: ich redukcji lub zwiększenia zawartości oraz uszkodzeń tylakoidów chloroplastów. Zmiany jednak są zależne też od samej rośliny: jej pochodzenia, zmienności genetycznej, wieku, możliwości adaptacyjnych, warunków środowiska (ROBAKOWSKI 1998, KAKANI i IN. 2003, ŻUK-GOŁA-SZEWSKA i IN. 2003). W wyniku absorpcji nadmiernej ilości promieniowania może też nastąpić nadprodukcja aktywnych form tlenu (tlen singletowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, anionodnik ponadtlenkowy).

Wobec zwiększonego napromienienia UV-B rośliny wykształciły szereg mechanizmów obronnych. Wiele związków spełnia funkcje filtru zmniejszającego ilość promieniowania dochodzącego do komórek mezofilu. Do kluczowych związków tego typu należą związki fenolowe, w tym flawonoidy.

Ogórek jest rośliną bardzo wrażliwą na oddziaływanie czynników stresowych. Jest też jednym z bardziej rozpowszechnionych gatunków warzywnych. Uprawiany w gruncie jest narażony na działanie m.in. zwiększonego promieniowania UV, stąd celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy oddziaływanie UV-B o zwiększonym natężeniu wpływa na poziom barwników chloroplastowych oraz związków fenolowych w siewkach ogórka.

Material i metody

Materiał doświadczalny stanowiły siewki ogórka odmiany 'Dar' rosnące w perlicie w kontrolowanych warunkach wzrostu: temperatura – 22/18°C (dzień/noc), promieniowanie fotosyntetycznie czynne PAR – 14 h na dobę (PPFD 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Natężenie PAR mierzono za pomocą fitofotometru FF-01 (Sonopan). Stres zaaplikowano poprzez dodatkowe traktowanie trzytygodniowych siewek promieniami UV-B za pomocą lamp Philips TL 20W/0.1 RS (maks. 315 nm) o natężeniu 16 kJ/m^2 w ciągu doby (555 mW/m^2) przez 8 h na dobę, sukcesywnie przez dziewięć dni. Natężenie napromienienia UV-B mierzono za pomocą radiometru VLX 3W. Do analiz pobierano drugi dobrze wykształcony liść.

Oznaczenie poziomu barwników chloroplastowych wykonano według HISCOX i ISRAELSTAM (1979) po wyekstrahowaniu za pomocą sulfotlenku dwumetylu (DMSO) bez maceracji tkanki. Naważki (100 mg) traktowano 5 cm^3 DMSO i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 65°C przez 60 min. W otrzymanym ekstrakcie oznaczono spektrofotometrycznie zawartość barwników przy odpowiedniej długości fali. Dla chlorofilu *a* pomiar absorbancji ekstraktu wykonano przy fali o długości 663 nm, dla chlorofilu *b* – przy fali o długości 645 nm, dla karotenoidów – przy fali o długości 470 nm. Zawartość barwników wyliczono według wzorów ARNONA (1949) i podano w miligramach na 1 g świeżej masy.

Oznaczenie związków fenolowych. Ekstrakcję związków fenolowych przeprowadzano w następujący sposób: naważki liści (200 mg) pocięto i zalano 4 ml 80-procentowego metanolu, pozostawiając na 1 h w temperaturze 5°C. Następnie tkankę rozcierano z dodatkiem kolejnych 2 cm^3 80-procentowego metanolu. Homogenat wirowano 20 min przy 16 000 g. Otrzymany supernatant odparowywano do frakcji wodnej i dwukrotnie ekstrahowano octanem etylu. Połączone frakcje octanu etylu odparowano do sucha. Powstały osad rozpuszczono w 1 cm^3 80-procentowego metanolu. W otrzymanej w ten sposób frakcji kolorymetrycznie oznaczano sumaryczną zawartość związków fenolowych oraz poziom flawonoidów.

Sumaryczną zawartość fenoli oznaczano metodą przedstawioną w pracy SWAINA i HILLISA (1959), stosując jako standard kwas *p*-kumarowy. Mieszanina reakcyjna zawierała: 0,2 ml wyciągu, 3,7 ml H_2O , 0,1 ml 1 N odczynnika Folina-Denisa i 1 ml 10-procentowego Na_2CO_3 dodanego po 3 min. Absorbancję mierzono przy długości fali 660 nm. Wyniki podano w mikrogramach kwasu *p*-kumarowego na 1 g świeżej masy liści.

Zawartość flawonoidów oznaczano poprzez pomiar absorbancji ekstraktów metalowych (CALDWELL i IN. 1994). Absorbancję mierzono przy długości fali 305 nm. Jednostką była wartość absorbancji na 1 g świeżej masy liścia.

Statystyka. Dla uzyskanych wyników obliczano średnie arytmetyczne z trzech powtórzeń, dla których obliczano także odchylenia standardowe. Wykonano także analizę wariancji ANOVA, wykazując za pomocą testu Tukeya istotne statystycznie różnice między kontrolą a stresem. Test pozwala wykryć różnicę na dwóch poziomach istotności: $\alpha < 0,05$ – różnice istotne, $\alpha < 0,01$ – różnice wysoce istotne.

Wyniki

Zawartość chlorofilu *a* w roślinach kontrolnych zmieniała się w kolejnych dniach od wartości 1,89 do 1,67 jednostki, a w UV-B – od 1,95 do 1,73 jednostki. Po traktowaniu UV-B zawartość chlorofilu *a* w porównaniu z kontrolą wzrosła w kolejnych dniach o odpowiednio: 3, 38, 33 i 3%. Koncentracja chlorofilu *b*, podobnie jak chlorofilu *a*, w liściach roślin po napromienieniu UV-B była większa niż w kontroli i zmieniała się od wartości 0,55 jednostki w drugim dniu do 0,54 w dziewiątym.

Zawartość tego barwnika rosła od piątego dnia napromienienia o odpowiednio 40, 36 i 3%. Zmiany w ilości chlorofilu *a* i *b* wpłynęły na sumaryczną zawartość chlorofilu; stwierdzono wzrost całkowitej ilości chlorofilu od piątego dnia napromieniania o odpowiednio 39, 34 i 5% (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość barwników chloroplastowych
Table 1. Content of chloroplast pigments

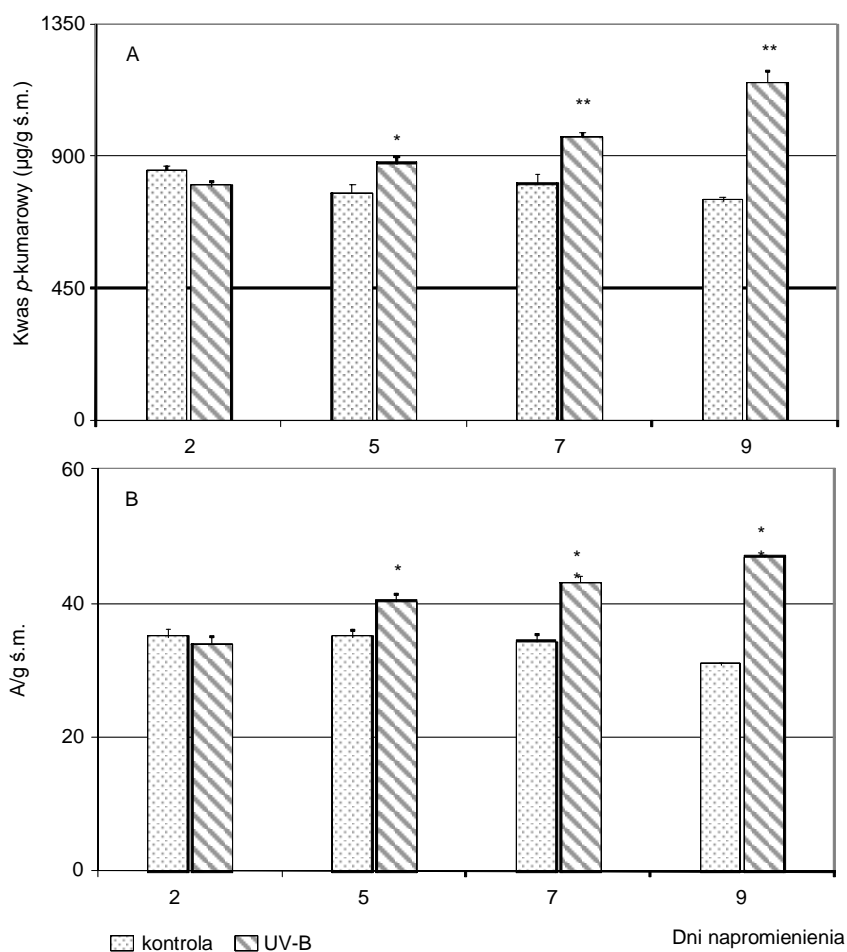
Liczba dni napromienienia	Kontrola				UV-B			
	zawartość chlorofilu (mg/g ś.m.)			zawartość karotenoidów (mg/g ś.m.)	zawartość chlorofilu (mg/g ś.m.)			zawartość karotenoidów (mg/g ś.m.)
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>	
2	1,89 (±0,08)	0,60 (±0,05)	2,49 (±0,13)	2,54 (±0,13)	1,95* (±0,15)	0,55* (±0,03)	2,49 (±0,17)	2,92* (±0,08)
5	1,60 (±0,17)	0,42 (±0,03)	2,03 (±0,20)	3,02 (±0,08)	2,22** (±0,1)	0,59** (±0,04)	2,82** (±0,08)	3,82** (±0,13)
7	1,56 (±0,04)	0,44 (±0,01)	1,99 (±0,03)	3,44 (±0,03)	2,07** (±0,16)	0,60** (±0,03)	2,67** (±0,05)	4,02** (±0,09)
9	1,67 (±0,06)	0,52 (±0,02)	2,17 (±0,05)	3,34 (±0,15)	1,73* (±0,03)	0,54 (±0,06)	2,28* (±0,03)	4,32** (±0,10)

* $\alpha < 0,05$.

** $\alpha < 0,01$.

Zawartość karotenoidów w kontroli zmieniała się od wartości 2,54 do 3,34 jednostki, a w UV-B – od 2,92 do 4,32 jednostki. Ilość karotenoidów w liściach traktowanych UV-B w porównaniu z kontrolą rosła więc sukcesywnie w czasie trwania doświadczenia o 14, 26, 17 i 29% (tab. 1).

Sumaryczna zawartość związków fenolowych w kontroli wynosiła: 1055, 795,7, 806,7, 751,7 jednostki, a w UV-B – 801,7, 836,7, 966,7, 1150 jednostek. Wzrost ilości związków w UV-B obserwowano od piątego dnia napromieniania; wyniósł on 13, 20 i 53% (rys. 1 A). Ilość flawonoidów w kontroli wynosiła: 35,1, 35,1, 34,3, 31 jednostek, a w UV-B – 34, 40,4, 43,1, 47 jednostek. Tak więc obserwowano – podobnie jak w przypadku całkowitej zawartości fenoli – sukcesywny wzrost zawartości flawonów w UV-B od piątego dnia napromieniania o odpowiednio 15, 26 i 51% (rys. 1 B).



Rys. 1. Zawartość: A – sumaryczna związków fenolowych, B – flawonoidów
Fig. 1. Content: A – total phenolic, B – flavonoids

Dyskusja

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono, że w liściach ogórka poddanych działaniu zwiększonego promieniowania UV-B dochodzi do wzrostu zawartości chlorofilu i barwników karotenoidowych. Wzrost ilości chlorofilu mógł prawdopodobnie wynikać ze wzmożonej syntezy chlorofilu związanej z silnym rozwojem wegetatywnym roślin, jak i ze wzrostu ilości karotenoidów, które bezpośrednio chronią chlorofil przed fotoinhibicją. Zwiększenie produkcji barwników pochłaniających promieniowanie świetlne u odmian uprawnych roślin wiąże się z ich zwiększoną tolerancją na stres spowodowany promieniowaniem UV (ROBAKOWSKI 1998). W literaturze wykazano ponadto, iż wrażliwość roślin na zwiększone napromienienie UV zależy od ilorazu natężenia UV-B/PAR oraz że duże natężenie promieniowania fotosyntetycznie czynnego minimalizuje ewentualne uszkodzenia wywołane promieniowaniem UV-B (DECKMYN i IN. 1994, LAAKSO i HUTTUNEN 1998). Może wtedy dojść m.in. do fotoreaktywacji, enzymatycznego procesu naprawczego DNA (BJÖRN i IN. 2002, ŻUK-GOŁASZEWSKA i IN. 2003).

DECKMYN i IMPENS (1998) również stwierdzili wzrost ilości chlorofilu w miarę wzrostu radiacji w doświadczeniu z kostrzewą. Przeciwną tendencję zaobserwowali NEDUNCHEZHIAN i KULANDAIVELU (1997) na turzycy, GABERŠČIK i IN. (2002) na gryce oraz SMITH i IN. (2000), którzy analizy przeprowadzali na 19 gatunkach roślin zielnych. BARSIG i MALZ (2000) w doświadczeniu z kukurydzą nie stwierdzili istotnych różnic w poziomie karotenoidów pod wpływem UV-B; zwiększanie dawek promieniowania nie powodowało zmiany ilości barwników.

Wzmożona synteza i gromadzenie niektórych metabolitów wtórnych, m.in. związków fenolowych, w tym flawonów, jest jednym z mechanizmów ochronnych roślin wobec zwiększonej radiacji (HANCZAKOWSKI 2004, VAN DE STAAIJ i IN. 2002). Lokalizacja związków fenolowych w różnych strukturach tkankowych lub komórkowych, m.in. w warstwie epikutylarnej, włoskach pokrywających blaszkę liściową a także w komórkach mezofilu, umożliwia pochłanianie części promieniowania docierającego do roślin. Metabolity te działają więc jak filtry, organelle komórkowe leżące w głębszych warstwach liści są w ten sposób chronione przed uszkodzeniami. Proste kwasy fenolowe oraz flawonoidy wykazują ponadto aktywność antyoksydacyjną.

W niniejszej pracy stwierdzono wzrost całkowitego poziomu fenoli i flawonoidów w siewkach ogórka. Uzyskane wyniki dotyczące flawonów są zgodne z tymi, które uzyskali LYNCH i IN. (2001) w badaniach liści kapusty, KOLB i IN. (2001) winorośli oraz VAN DE STAAIJ i IN. (2002) w badaniach turzycy. SANTOS i IN. (2004) stwierdzili akumulacje flawonoidów w ziemniaku po ekspozycji na UV-B. W literaturze odnajdujemy także dane o udziale związków fenolowych w absorpcji UV-B u roślin drzewiastych, np. zwiększoną zawartość związków fenolowych stwierdzono u klonu i eukaliptusa (SULLIVAN i IN. 2003).

W podsumowaniu można stwierdzić, że podwyższone promieniowanie UV-B nie wpłynęło destrukcyjnie na barwniki chloroplastowe ogórka. Nie stwierdzono spadku zawartości chlorofilu ani karotenoidów po traktowaniu UV-B, a wręcz doszło do ich niewielkiej kumulacji. Wystąpiła również wzmożona synteza związków fenolowych, w tym flawonoidów, pochłaniających nadmiar promieniowania UV. I choć ogórek jest dość wrażliwy na zwiększoną radiację, gdyż obserwowano hamowanie wzrostu roślin

(dane nie przedstawione), można przypuszczać, że w roślinach ogórka narażonych na działanie zwiększonego promieniowania UV-B dochodzi do uruchomienia systemu obronnego.

Wnioski

1. Zwiększone promieniowanie UV-B prowadzi do wzrostu zawartości barwników chloroplastowych w ogórku.

2. Wprowadzony w doświadczeniu stres powodował wzmożoną syntezę fenoli i flawonów.

3. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że zwiększone promieniowanie UV-B uruchamia w roślinach ogórka mechanizm obronny związany z absorpcją nadmiaru promieniowania ultrafioletowego.

Literatura

- ARNON D.J., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- BARSIG M., MALZ R., 2000. Fine structure, carbohydrates and photosynthetic pigments of sugar maize leaves under UV-B radiation. *Environ. Exp. Bot.* 43: 121-130.
- BJÖRN L.O., WIDELL S., WANG T., 2002. Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Adv. Space Res.* 6: 1557-1562.
- CALDWELL M.M., FLINT S.D., SEARLES P.S., 1994. Spectral balance and UV-B sensitivity of soybean: a field experiment. *Plant Cell Environ.* 17: 267-276.
- DECKMYN G., IMPENS I., 1998. Effects of solar UV-B irradiation on vegetative and generative growth of *Bromus catharticus*. *Environ. Exp. Bot.* 40: 179-185.
- DECKMYN G., MARTENS C., IMPENS I., 1994. The importance of the ratio UV-B/photosynthetic active radiation (PAR) during leaf development as determining factor of plant sensitivity to increased UV-B irradiance: effects on growth, gas exchange and pigmentation of bean plants (*Phaseolus vulgaris* cv. Label). *Plant Cell Environ.* 17: 295-301.
- DUBE L.S., BORNMAN F.J., 1992. Response of spruce seedlings to simultaneous exposure to ultraviolet-B radiation and cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 761-767.
- GABERŠČIK A., VONČINA M., TROŠT T., GERM M., BJÖRN L.O., 2002. Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient and enhanced UV-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 66: 30-36.
- HANCZAKOWSKI P., 2004. Działania biologiczne wybranych związków fenolowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 4: 121-127.
- HISCOX J.D., ISRAELSTAM G.F., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.
- HOLLÓSY F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
- KAKANI V.G., REDDY K.R., ZHAO D., SAILAJA K., 2003. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agric. For. Meteorol.* 120: 191-218.
- KOLB CH.A., KÄSER M.A., KOPECKÝ J., ZOTZ G., RIEDERER M., PFÜNDEL E.E., 2001. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiol.* 127: 863-875.
- LAAKSO K., HUTTUNEN S., 1998. Effects of the ultraviolet-B radiation (UV-B) on conifers: a review. *Environ. Pollut.* 99: 319-328.

Rybus-Zajac M., 2009. Czy zwiększone promieniowanie UV-B modyfikuje poziom barwników chloroplastowych oraz związków fenolowych w siewkach ogórka. Nauka Przyr. Technol. 3, 3, #72.

- LYNCH J.M., ZOBEL A.M., DIETRYCH-SZÓSTAK D., 2001. Ekologiczne następstwa zwiększonego promieniowania UV na przykładzie związków fenolowych w *Brassica oleracea*. W: Biochemiczne oddziaływania środowiskowe. Red. W. Oleszek, K. Głownia, B. Leszczyński. Akademia Medyczna, Lublin: 267-288.
- NEDUNCHEZHIAN N., KULANDAIVELU G., 1997. Changes induced by ultraviolet-B (280-320 nm) radiation to vegetative growth and photosynthetic characteristics in field grown *Vigna unguiculata* L. Plant Sci. 123: 85-92.
- ROBAKOWSKI P., 1998. Wpływ promieniowania ultrafioletowego UV-B o podwyższonym natężeniu na rośliny. Kosmos 47: 95-105.
- SANTOS I., FIDALGO F., ALMEIDA J.M., SALEMA R., 2004. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. Plant Sci. 167: 925-935.
- SMITH J., BURRITT D., BANNISTER P., 2000. Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B absorbing compounds as indicators of a plant sensitivity to UV-B radiation. Ann. Bot. 86: 1057-1063.
- STAAIJ J. VAN DE, BAKKER N.V.J. DE, OOSTHOEK A., BROEKMAN R., BEEM A. VAN, STROETENGA M., AERTS R., ROZEMA J., 2002. Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation. J. Photochem. Photobiol. B 66: 21-29.
- SULLIVAN J.H., GITZ D.C., PEEK M.S., MCELDRONE A.J., 2003. Response of three eastern species to supplemental UV-B radiation: leaf chemistry and gas exchange. Agric. For. Meteorol. 120: 219-228.
- SWAIN T., HILLIS W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 63-68.
- YAKIMCHUK R., HODDINOTT J., 1994. The influence of ultraviolet-B light and carbon dioxide enrichment on the growth and physiology of seedlings of three conifer species. Can. J. For. Res. 24: 1-8.
- ZANCAN S., CESCO S., GHISI R., 2006. Effect of UV-B radiation on iron content and distribution in maize plants. Environ. Exp. Bot. 55: 266-272.
- ZARĘBSKA Z., 2000. Promieniowanie słoneczne – dobroczynne działanie i zagrożenia. Kosmos 49: 27-29.
- ŻUK-GOŁASZEWSKA K., UPADHYAYA M.K., GOŁASZEWSKI J., 2003. The effect of UV-B radiation on plant growth and development. Plant Soil Environ. 43: 153-140.

DOES THE ENHANCED UV-B RADIATION MODIFY CHLOROPLAST PIGMENTS AND PHENOLIC COMPOUNDS LEVEL OF THE CUCUMBER COTYLEDONS

Summary. An influence of the increased UV-B radiation (16 kJ/m² during 24 h) on the level of chlorophyll *a* and *b*, carotenoids and phenolic compounds in cucumber cotyledons was examined. In plants subjected to UV-B radiation content of chloroplast pigments was higher than in the control. Also a stimulation of phenolic compounds was stated, including flavonoids.

Key words: *Cucumis sativus* L., UV-B, chloroplast pigments, phenolic compounds

Rybus-Zajac M., 2009. Czy zwiększone promieniowanie UV-B modyfikuje poziom barwników chloroplastowych oraz związków fenolowych w siewkach ogórka. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 3, #72.

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Magdalena Rybus-Zajac, Katedra Fizjologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań, Poland, e-mail: magrybus@jay.au.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

10.06.2009

Do cytowania – For citation:

*Rybus-Zajac M., 2009. Czy zwiększone promieniowanie UV-B modyfikuje poziom barwników chloroplastowych oraz związków fenolowych w siewkach ogórka. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 3, #72.*