

В. В. Жук¹, О. П. Кравець^{1,*}, Д. О. Соколова¹,
В. І. Сакада¹, Л. А. Глушенко², М. В. Кучук¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

² Дослідна станція лікарських рослин Інституту агроєкології і природокористування НААН України,
Лубни, Україна

*Відповідальний автор: kaplibra@gmail.com

СТИМУЛЯЦІЯ ВМІСТУ АНТИОКСИДАНТІВ У СУЦВІТТЯХ РОСЛИН ГЕНОТИПІВ *MATRISIA CHAMMOMILA* L. ПЕРЕДПОСІВНИМ УФ-С ТА РЕНТГЕНІВСЬКИМ ОПРОМІНЕННЯМ НАСІННЯ

Досліджено відмінності динаміки вмісту флавоноїдів і фенолів у суцвіттях рослин восьми генотипів ромашки аптечної при передпосівному УФ-С та рентгенівському опроміненні насіння. Виявлено групи генотипів, в яких стимулюючий вплив на вміст антиоксидантів дає переважно УФ-С опромінення, а також групи зі значним підвищенням вмісту антиоксидантів рентгенівським опроміненням. Показано високу значущу кореляцію ($R = 0,84$) між стимуляцією синтезу флавоноїдів рентгенівським опроміненням і рівнем цих антиоксидантів у контролі. Вища за середню ($R = 0,64$), але незначуща, кореляція спостерігається між рівнем вмісту флавоноїдів УФ-С стимуляцією і рівнем цих антиоксидантів у контролі. Кореляцію між вмістом фенолів у контролі та підвищенням цього показника після опромінення не виявлено.

Ключові слова: антиоксиданти, немішенні ефекти, фармакологія, УФ-С, рентгенівське опромінення.

1. Вступ

Ферментативні та неферментативні антиоксиданти є конститутивними складовими системи підтримки окислювально-відновного гомеостазу тваринних і рослинних організмів [1 - 3]. Антиоксидантна система також відіграє активну захисну роль за дії біотичних та абіотичних стресових факторів [2, 4 - 6].

Опромінення є одним з найпотужніших чинників виникнення оксидативного стресу та стимулює утворення радіопротекторів [2, 6 - 8], що мають антиоксидантну, антиканцерогенну, імуномодулювальну та протизапальну дію [6, 9 - 12].

Біотехнологічне використання опромінення для переорієнтації метаболічних процесів рослин у необхідному для практики напрямку ґрунтується на системності захисних реакцій організму. Формування немішених ефектів, включаючи індукцію захисних й адаптивних реакцій у неопроміненних органах одного організму і навіть у неопроміненних організмах, що знаходяться в одному середовищі з опроміненними [13 - 17], дає можливість отримання продуктів захисних реакцій рослин у неопроміненних структурах, які є лікарською сировиною.

Дослідження впливу опромінення на ростові реакції рослин ромашки [18] свідчать про відмінності в стимуляції врожаю аптечної сировини різних генотипів після УФ-С і рентгенівського

опромінення. Використані генотипи розрізняються не тільки врожайністю лікарської сировини контрольних варіантів, але змінами в динаміці цвітіння після різних видів опромінення.

Наступний етап дослідження присвячено вивченню ефективності стимуляції передпосівним УФ-С і рентгенівським опроміненням насіння вторинного метаболізму ромашки аптечної. В якості маркерів перебудови вторинного метаболізму використано вміст відомих неферментативних антиоксидантів – флавоноїдів і фенолів.

Попри різноманітність функцій цих сполук, які беруть участь у ряді блоків первинного метаболізму рослин, таких як фотосинтез, утворення лігніну і суберину клітинних стінок, біохімія рослин відносить їх до продуктів вторинного метаболізму [1], що грають роль захисних агентів у патогенезі рослин, а біологія тварин і рослин розглядає як низькомолекулярні антиоксиданти й найважливіші компоненти ендogenous фону радіочутливості [2].

Метою дослідження було вирішення ключових питань розробки біотехнології: визначення вихідного рівня згаданих антиоксидантів різних генотипів, інтенсивність відгуку їх на певний тип опромінення, оцінка кореляції цих двох показників, а також порівняльна оцінка динаміки напрацювання цільового метаболіту в контролі та після опромінення.

© В. В. Жук, О. П. Кравець, Д. О. Соколова,
В. І. Сакада, Л. А. Глушенко, М. В. Кучук, 2021

2. Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили на 8 генотипах ромашки аптечної: 1 - генеративне покоління мутанта Перлина лісостепу (Україна); 2 - сорт Кведлінбург (Німеччина); 3 - сорт Горал (Словенія); 4 - сорт Азулена (Росія); 5 - сорт Златий лан (Польща); 6 - сорт Перлина лісостепу (Україна). У дослідження було долучено й несортовий матеріал, що фактично є едафічними екотипами: 7 - від постачальника Golden Garden (Україна), надалі – екотип Golden Garden; 8 – від постачальника Seed Era (Україна), надалі – екотип Seed Era. Повторюваність досліду трикратна.

Сухе насіння опромінювали на рентгенівській установці РУМ-17 (Росія) дозою 10 Гр, потужність дози 1,42 сГр/с. УФ-С опромінення проводили дозами 1, 5 і 10 кДж/м² на установці ОБМ-150 М (Україна) з двома лампами Philips Special TUV 30 W (Нідерланди). Збір суцвіть проводили на стадії їхнього повного розкриття. Сушку сировини здійснювали в темному приміщенні при температурі 25 - 27 °С.

Вибір дози рентгенівського опромінення оснований на дослідженнях, проведених раніше на різних лікарських рослинах, результати яких закріплено патентом [19]. Дозова залежність виходу антиоксидантів після УФ-С опромінення наведена нижче.

Екстракцію флавоноїдів і фенолів проводили за загальноприйнятими методами [3]. Подрібнену суху рослинну масу квіток (50 мг) мацерували у 5 мл 70 % етанолу при 24 °С протягом 72 год, після чого фільтрували, доводили кількість фільтрату 70 % етанолом до початкового об'єму і центрифугували. До 0,5 мл екстракту додавали 0,5 мл 2 % розчину хлориду алюмінію в етанолі та 2 мл 70 % етанолу. Розчин порівняння містив 0,5 мл екстракту, 1 краплю оцтової кислоти та 2,5 мл 70 % етанолу. Визначення вмісту флаво-

ноїдів проводили по утворенню комплексу флавоноїд-алюміній, що має жовте забарвлення. Через 20 хв інкубації вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі СФ-46 по довжині хвилі 410 нм проти розчину порівняння, визначали концентрацію суми флавоноїдів за калібрувальним графіком рутину та виражали в міліграмах рутину на 1 кг сухої маси. Вміст суми фенолів визначали з того ж екстракту, що і флавоноїди. До 0,1 мл екстракту додавали 0,5 мл (1/10 розведеного) реактиву Фоліна - Чокальтеу та 1 мл дистильованої води, перемішували та витримували за кімнатної температури 1 хв. Через 1 хв додавали 1,5 мл 20 % розчину Na₂CO₃, перемішували та інкубували в темноті протягом 2 год за кімнатної температури. Визначали оптичну густину розчину синього кольору за довжини хвилі 760 нм на спектрофотометрі проти проби, що містить 0,1 мл 70 % етанолу замість екстракту, та виражали в міліграмах галової кислоти еквівалента (ГКЕ) (за калібрувальним графіком) на 1 г сухої маси.

Для статистичного аналізу результатів досліджень використовували методи варіаційної статистики, визначаючи середні арифметичні величини (\bar{X}) та їхні середньоквадратичні відхилення (S_x).

3. Результати та обговорення

Дослідження дозової залежності УФ-С передпосівного опромінення насіння по показнику вмісту вторинних метаболітів у суцвіттах рослин виявило значну залежність від дози опромінення не тільки вмісту антиоксидантів, але й динаміки зміни цього показника. Наприклад, для сорту Перлина лісостепу найбільший вміст флавоноїдів після опромінення в дозі 5 кДж/м² спостерігається на 62 добу, а фенолів – на 54 добу після посіву (рис. 1).

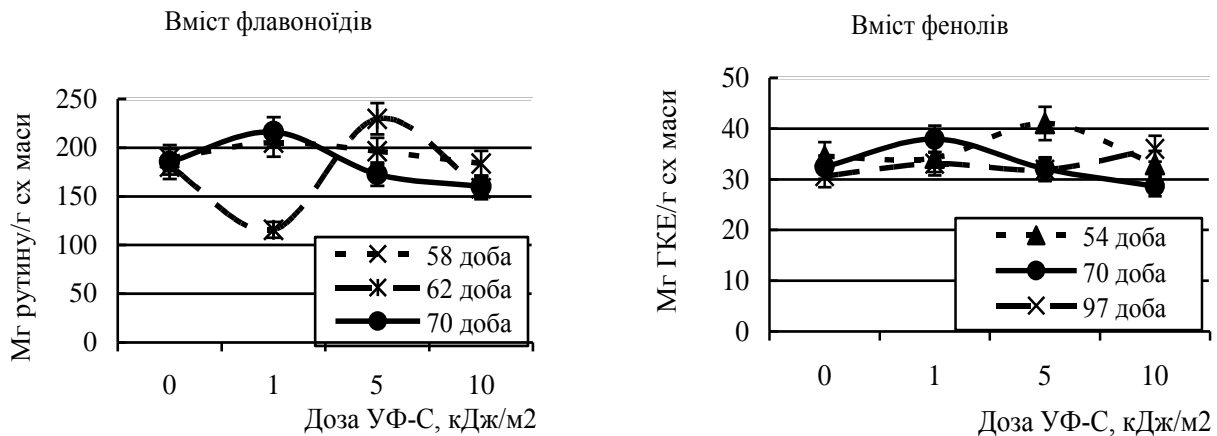


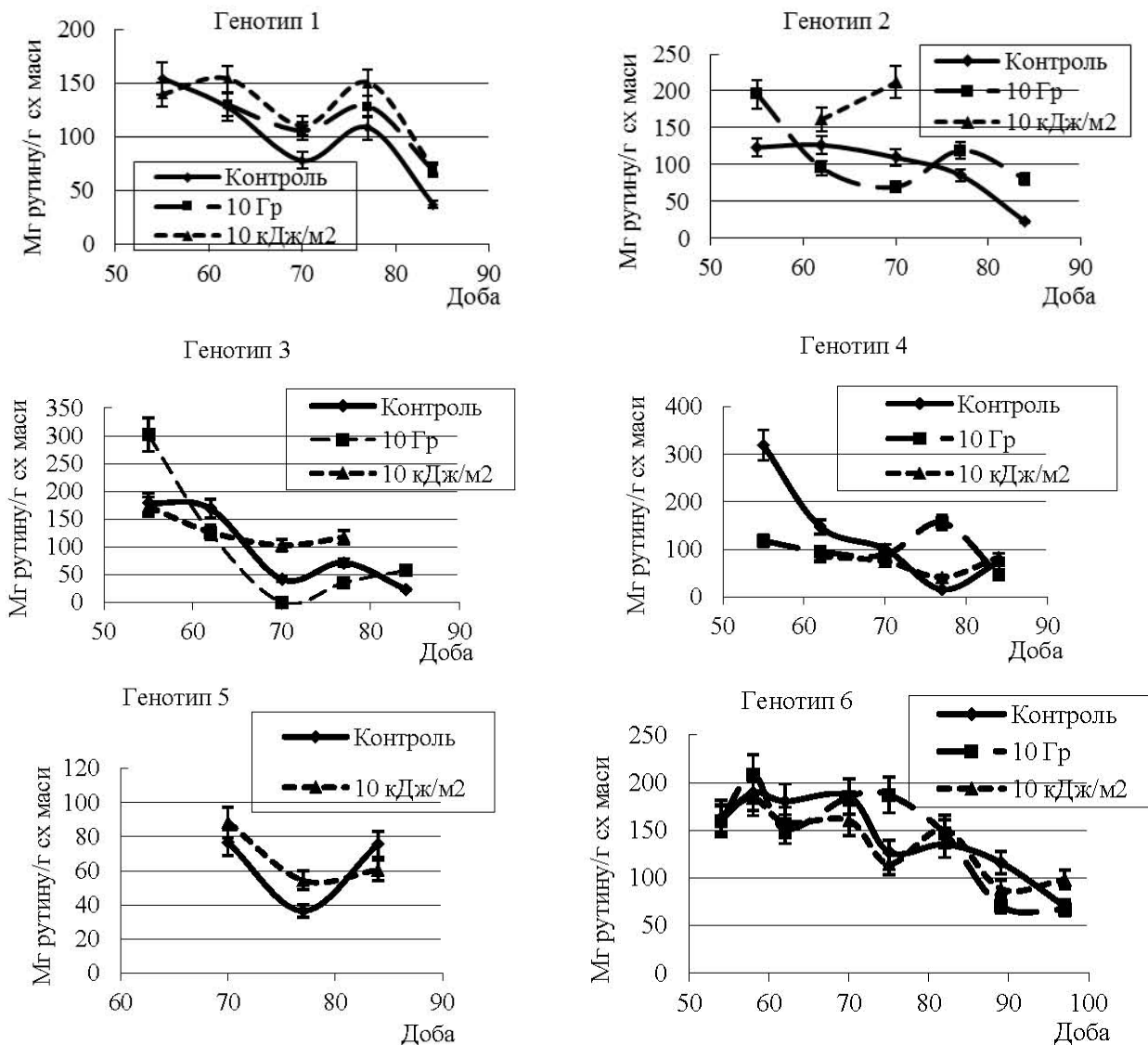
Рис. 1. Дозова залежність вмісту флавоноїдів та фенолів у суцвіттах ромашки лікарської сорту Перлина лісостепу, яка вирощена з насіння, опроміненого УФ-С. Довірчий інтервал $P = 0,95$.

У суцвіттях рослин, вирощених з насіння, опроміненого УФ-С дозою 1 кДж/м², максимум вмісту вторинних метаболітів відзначено на 70 добу від посіву і він був нижчим у порівнянні з тим, який відзначали після опромінення дозою 5 кДж/м². Максимальні значення вмісту флавоноїдів та фенолів після опромінення насіння дозою 10 кДж/м² відзначені на 58 та 97 добу від посіву. Загалом залежність максимуму нагромадження антиоксидантів від дози має немонотонний характер, що типове для царини малих доз.

Як свідчать проведені оцінки (рис. 2), спостерігаються значні відмінності вмісту флавоноїдів у сухій масі суцвіть контрольних варіантів різних генотипів ромашки аптечної. Найвищий початковий вміст цього антиоксиданту спостерігається в сортах Перлина лісостепу і Горал, найнижчий – у сорті Златий лан та еко типу Golden Garden. Переважно в контролі всіх генотипів, за виключенням сорту Златий лан, найвищий вміст флавоноїдів спостерігається на початку цвітіння,

при першому відборі лікарської сировини, що має найнижчі показники врожаю.

Спостерігаються значні відмінності в реакції рослин різних генотипів на рентгенівське та УФ-С опромінення. На відміну від контролю нагромадження флавоноїдів у рослинах, що походять з опроміненого насіння, протягом цвітіння має немонотонний характер. Визначено два максимуми вмісту флавоноїдів у суцвіттях рослин мутанта сорту Перлина лісостепу, які виростили з опроміненого УФ-С насіння на 62 та 77 добу після посіву. У сортів Кведлінбург і Горал максимальний вміст флавоноїдів у суцвіттях відзначено на 55 добу росту після рентгенівського опромінення насіння та на 70 добу після опромінення насіння УФ-С. У сорті Азулена найбільший вихід флавоноїдів із квіток після опромінення насіння рентгенівськими променями був на 77 добу від посіву. У рослинах ромашки сорту Златий лан максимум флавоноїдів у суцвіттях виявлено на 70 добу після посіву насіння, опроміненого УФ-С.



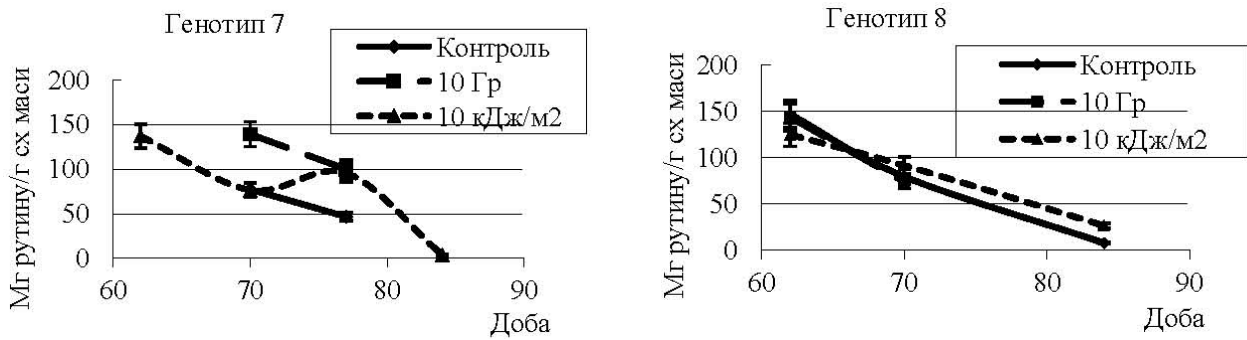


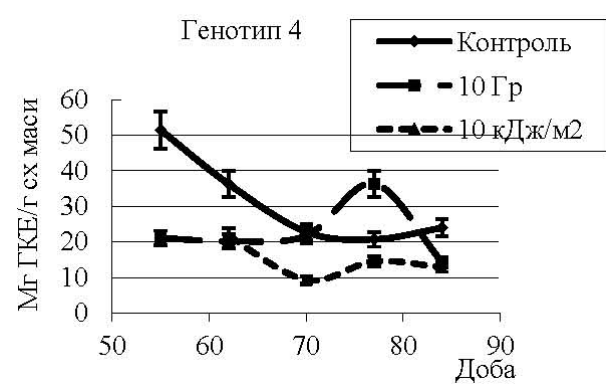
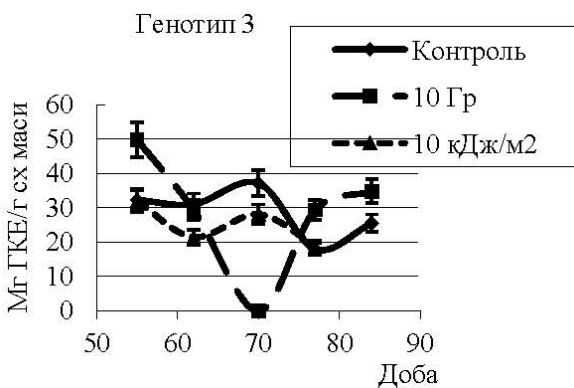
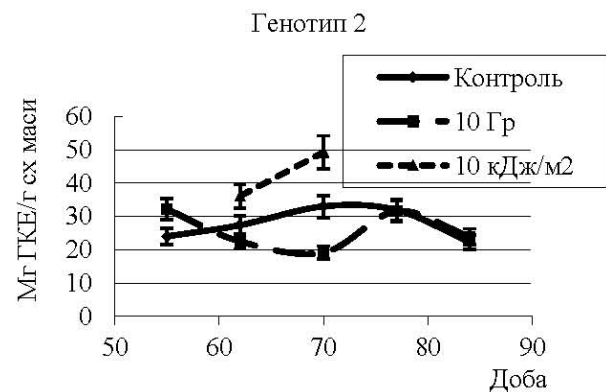
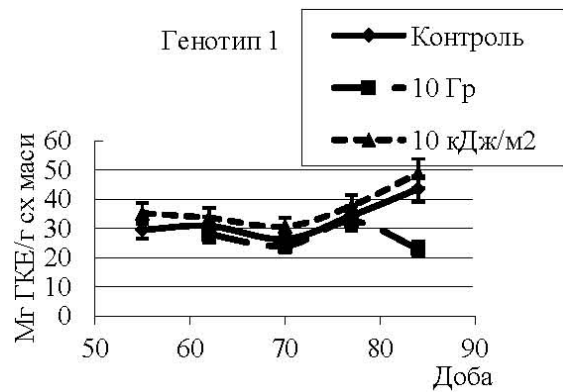
Рис. 2. Вміст флавоноїдів у суцвіттях ромашки лікарської різних генотипів:

1 – генеративне покоління мутанта сорту Перлина лісостепу, 2 – Кведлінбург, 3 – Горал, 4 – Азулена, 5 – Златий лан, 6 – Перлина лісостепу, 7 – Golden Garden, 8 – Seed Era. Довірчий інтервал P = 0,95.

У суцвіттях ромашки сорту Перлина лісостепу максимальний вміст флавоноїдів виявили на 58, 70 та 77 добу після дії рентгенівського опромінення на насіння. У суцвіттях рослин сорту Golden Garden максимум флавоноїдів відзначали на 70 добу після посіву насіння, яке опромінювали рентгенівськими променями, і на 62 добу після посіву насіння, що було опромінене УФ-С.

З практичної точки зору важливо, що ці підвищення питомого вмісту флавоноїдів в опроміненних варіантах збігаються з максимальним утворенням суцвіть рослинами перерахованих генотипів. Цей ефект не спостерігається в контролі.

Досліджені сорти ромашки лікарської відрізнялись між собою за вмістом фенолів у суцвіттях. Найвищий вміст фенолів було відзначено в суцвіттях рослин мутанта сорту Перлина лісостепу, а найнижчий – сорту Златий лан (рис. 3). Передпосівне опромінення насіння ромашки лікарської УФ-С виявило підвищення вмісту фенолів у суцвіттях рослин сорту Кведлінбург і мутанта Перлини лісостепу і зниження його в сортах Горал та Азулена. Опромінення насіння рентгенівськими променями призводило до підвищення вмісту фенолів у суцвіттях рослин сортів Горал, Перлина лісостепу, Golden garden.



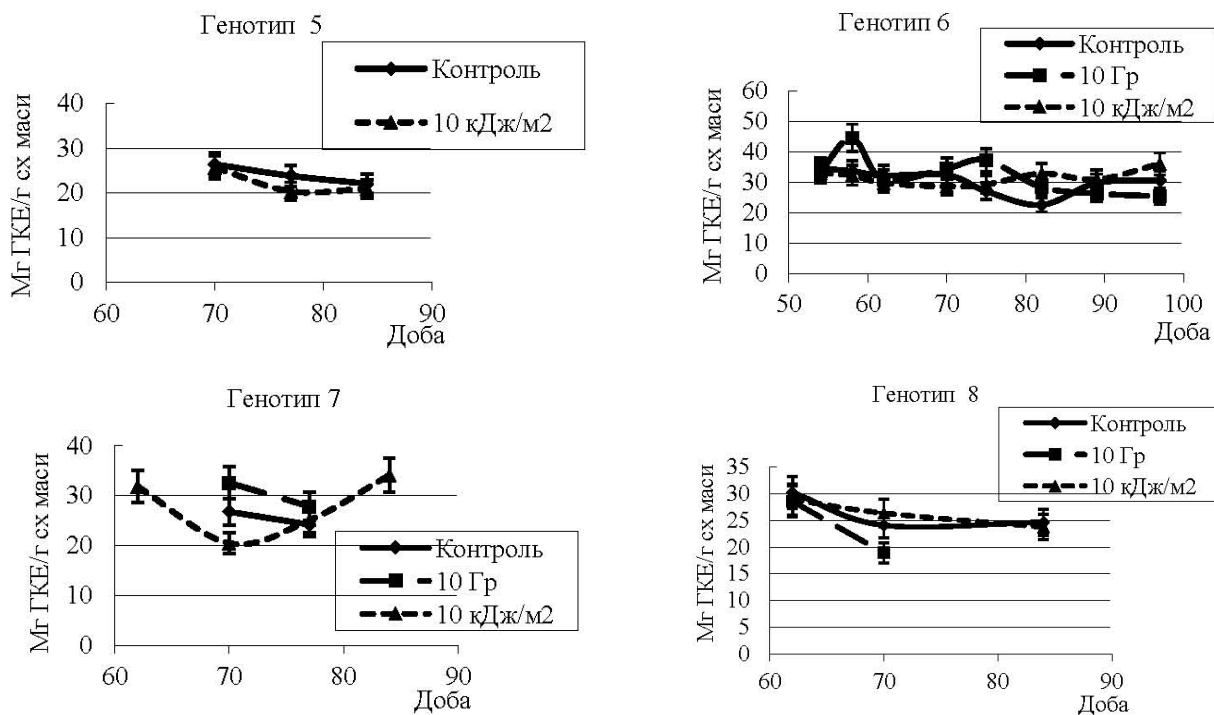


Рис. 3. Вміст фенолів у суцвіттях ромашки лікарської, яка вирощена з насіння, опроміненого рентгенівською радіацією дозою 10 Гр та УФ-С дозою 10 кДж/м² сортів: 1 – генеративне покоління мутанта сорту Перлина лісостепу, 2 – Кведлінбургер, 3 – Горал, 4 – Азулена, 5 – Златий лан, 6 – Перлина лісостепу, 7 – екотип Golden Garden, 8 – екотип Seed Era. Довірчий інтервал P = 0,95.

Загалом УФ-С та рентгенівське передпосівне опромінення не призводить до значної зміни вмісту фенолів у лікарській сировині. При УФ-С опроміненні відзначено підвищення вмісту фенолів тільки сорту Кведлінбург і мутанта Перлина лісостепу; сорти Горал і Азулена відреагували на передпосівне опромінення зниженням вмісту цього антиоксиданту в лікарській сировині. У сировині сорту Горал спостерігається підвищення вмісту фенолів після передпосівного рентгенівського опромінення. Одним із ключових питань оцінки та практичного використання ефектів передпосівного опромінення є вивчення зв'язку вмісту антиоксиданту в сировині контрольного варіанта і за впливу стресового чинника. Розрахунки коефіцієнтів кореляції між вмістом флавоноїдів у контрольних і УФ-С опромінених рослин має значення $R = 0,63$, але незначне при даній невеликій вибірці. Коефіцієнт кореляції між вмістом флавоноїдів у контрольних й опромінених рентгенівським випромінюванням варіантами $R = 0,84$ при рівні значущості 0,05.

Кореляція між вмістом фенолів у контрольних і УФ-С опромінених варіантів відсутня, $R = 0,22$. Середній рівень $R = 0,59$, але незначущий при даному рівні ступенів свободи кореляції спостерігається між вмістом фенолів у контрольних і опромінених рентгенівським випромінюванням варіантами.

Підсумовуючи одержані результати, зробимо висновок, що не всі генотипи відреагували в потрібному для практики напрямку на опромінення обох видів. Несортове насіння, тобто випадково обрані екотипи, не дають ефективного підвищення сумарного виходу маркерного метаболіту. Найбільш ефективним виявилось використання сортів Перлина лісостепу, Кведлінбург, Горал та мутанта сорту Перлина лісостепу. Розрахунок лінійної кореляції Пірсона є досить інформативним при відборі генотипів для біотехнологічного дослідження.

Проведене дослідження вказує на можливість підвищення виходу лікарських речовин унаслідок одночасного збільшення виходу лікарської сировини й питомого вмісту цільового метаболіту. Це створює основу використання системних ефектів іонізувального та нейонізувального опромінення у фармакології.

Дослідження проводилося в рамках фінансування НДР НАН України за темою 1230/3 «Вивчення впливу стресових факторів біотичного і абіотичного походження на накопичення вторинних метаболітів та рекомбінантних сполук в генетично змінених та нативних рослинних системах».

Автори висловлюють подяку за допомогу у проведенні дослідів н.с. відділу біофізики і радіобіології ІКБГ НАН України, к.б.н. С. В. Літвінову.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. В.Л. Крегович. *Биохимия растений* (Москва: Высш. шк., 1986) 497 с.
2. Ю.Б. Кудряшов. Основные принципы в радиобиологии. Радиационная биология. Радиоэкология 41(5) (2001) 531.
3. K.D. Croft. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854(1) (1998) 435.
4. B. Winkel-Shirley. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5 (2002) 218.
5. D. Treutter. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4(3) (2006) 147.
6. R. Mittler. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 405.
7. K.F. Khattak, T.J. Simpson. Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella stiva* seed. *Food Chemistry* 110(4) (2008) 967.
8. M. Alothman, R. Bhat, A.A. Karim. Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce. *Trends in Food Science & Technology* 20(5) (2009) 201.
9. K. Harrison, L.M. Were. Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts. *Food Chemistry* 102(3) (2007) 932.
10. J. Dai, R.J. Mumper. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15(10) (2010) 7313.
11. S.S. Moghaddam et al. Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella Asiatica*. *Molecules* 16(6) (2011) 4994.
12. S. Kaur, P. Mondal. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *J. Microbiol. Exp.* 1(1) (2014) 1.
13. M. Sengul et al. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm Sci.* 22(1) (2009) 102.
14. А.М. Кузин *Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии* (Москва: Наука, 1970) 221 с.
15. Д.Б. Литтл. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям. Радиационная биология. Радиоэкология 47(3) (2007) 262.
16. А.П. Кравец, Г.С. Венгжен, Д.М. Гродзинский. Дистанционное взаимодействие облученных и необлученных растений. Радиационная биология. Радиоэкология 49(4) (2009) 490.
17. K.S. Gould. C. Lister. Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. O.M. Andersen, K.R. Markham (Eds.) (Boca Raton, 2006) p. 397.
18. D.A. Sokolova et al. Productivity of medicinal raw materials by different genotypes of *Matricia chamomila L.* is affected with pre-sowing radiation exposure of seeds. *International Journal of Secondary Metabolite* 8(2) (2021) 127.
19. Ю.В. Шилина та ін. Спосіб підвищення вмісту флавоноїдів в сировині лікарських рослин шляхом радіаційної передпосівної обробки насіння. Патент UA № 129749. Опубліковано 12.11.2018, бюл. № 21/2018.

V. V. Zhuk¹, O. P. Kravets^{1,*}, D. O. Sokolova¹,
V. I. Sakada¹, L. A. Glushchenko², M. V. Kuchuk¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Research Station of Medicinal Plants, Institute of Agroecology and Nature Management, NAAS of Ukraine, Lubny, Ukraine

*Corresponding author: kaplibra@gmail.com

**PRE-SOWING SEEDS STIMULATION BY UV-C AND X-RAY IRRADIATION
ON THE CONTENT OF ANTIOXIDANTS IN INFLORESCENCE PLANTS GENOTYPES
*MATRICIA CHAMMOMILA L.***

The differences in the dynamics of the flavonoids and phenols content in plants of eight genotypes of *matricaria* in the control and at presowing UV-C and X-ray irradiation of seeds were studied. Groups of genotypes by the stimulating effect on the content of antioxidants were determined mainly by UV-C irradiation, as well as groups with a significant increase in the content of antioxidants during X-ray irradiation have been identified. A high significant correlation ($R = 0.84$) between stimulation of flavonoid synthesis by X-ray irradiation and the level of these antioxidants in the control group is shown. Above average ($R = 0.64$), but insignificant, the correlation is observed between the level of flavonoids in UV-C stimulation and the level of these antioxidants in the control group. No correlation was found between the content of phenols in the control group and the increase of this indicator after irradiation.

Keywords: antioxidants, non-targets effects, pharmacology, UV-C, X-ray irradiation.

REFERENCES

1. V.L. Kretovich. *Biochemistry of Plants* (Moskva: Vysshaya shkola, 1986) 497 p. (Rus)
2. Yu.B. Kudryashov. Basic principles in radiobiology. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* 41(5) (2001) 531. (Rus)
3. K.D. Croft. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854(1) (1998) 435.
4. B. Winkel-Shirley. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5 (2002) 218.
5. D. Treutter. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4(3) (2006) 147.
6. R. Mittler. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 405.
7. K.F. Khattak, T.J. Simpson. Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella stiva* seed. *Food Chemistry* 110(4) (2008) 967.
8. M. Alothman, R. Bhat, A.A. Karim. Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce. *Trends in Food Science & Technology* 20(5) (2009) 201.
9. K. Harrison, L.M. Were. Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts. *Food Chemistry* 102(3) (2007) 932.
10. J. Dai, R.J. Mumper. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15(10) (2010) 7313.
11. S.S. Moghaddam et al. Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella Asiatica*. *Molecules* 16(6) (2011) 4994.
12. S. Kaur, P. Mondal. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *J. Microbiol. Exp.* 1(1) (2014) 1.
13. M. Sengul et al. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm Sci.* 22(1) (2009) 102.
14. A.M. Kuzin. *Structural and Metabolic Hypothesis in Radiobiology* (Moskva: Nauka, 1970) 221 p. (Rus)
15. D.B. Littl. Non-targeting effects of ionizing radiation: conclusions in relation to low-dose exposures. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* 47(3) (2007) 262. (Rus)
16. A.P. Kravets, G.S. Wengzhen, D.M. Grodzinsky. Remote interaction of irradiated and non-irradiated plants. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* 49(4) (2009) 490. (Rus)
17. K.S. Gould, C. Lister. Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. O.M. Andersen, K.R. Markham (Eds.) (Boca Raton, 2005) p. 397.
18. D.A. Sokolova et al. Productivity of medicinal raw materials by different genotypes of *Matricia chamomila L.* is affected with pre-sowing radiation exposure of seeds. *International Journal of Secondary Metabolite* 8(2) (2021) 127.
19. J.V. Shilina et.al. The way to increase the flavonoid content in medicinal plants material with a radiation presowing treatment. Patent UA No. 129749. Published 11.12.2018, Bull. No. 21/2018. (Ukr)

Надійшла/Received 28.07.2020