

АЗУЛЕНА ЛИСТОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ КАК ЗАЩИТНЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ ФИЛЬТР

Рощина В.В., Призова Н.К., Хайбулаева Л.М.

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, Московская обл., 142290, РФ; e-mail: roshchinavic@mail.ru

Поступила в редакцию 11.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0480

Аннотация. Исследованы реакции на озон поверхностных клеток листьев с голубой или серебристой окраской у растительных видов: василисника малого *Thalictrum minus* L., лоха колючего *Elaeagnus pungens* Thunb., ивы белой *Salix alba* L., облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., красного клевера *Trifolium pratense* L., клевера ползучего *Trifolium repens* L., райграса пастбищного *Lolium perenne* Engels. У них не отмечено заметных спектральных изменений. Показано, что поверхностные слои кутикулы и клеточной стенки этих растений содержали азулены. В спектрах поглощения листьев отмечены характерные для этих синих пигментов максимумы соответственно 580-585 нм и 608-610 нм, а в спектрах флуоресценции – 410 или 430-450 нм. Предполагается, что именно эти пигменты могут быть первичными мишенями для озона у видов с синей или серебристой окраской листьев, и их антиоксидантные свойства определяют низкую чувствительность к озону. В этом случае синие пигменты служат защитным оптическим фильтром от ультрафиолетовой радиации и озона, образуемого с ее участием.

Ключевые слова: автофлуоресценция, адсорбция, азулены, спектральный анализ

ВВЕДЕНИЕ

Поверхность растений чувствительна к ультрафиолетовой радиации и озону, и эти внешние сигналы воспринимают в первую очередь компоненты клеточной стенки и плазмалеммы. У некоторых древесных растений поверхность имеет голубой цвет, который обусловлен присутствием синих пигментов азуленов [1,2]. Это, вероятно, определяет их устойчивость к повреждающим факторам, особенно в весенний период, когда велика интенсивность ультрафиолетовой радиации и растет количество тропосферного озона. Ранее эти пигменты находили только в продуктах дистилляции эфирных масел [3], а не на поверхности листьев или хвои. Исследование присутствия и роли синих пигментов на поверхности клеток находится только в самом начале, и до сих пор внимание уделялось преимущественно древесным видам растений субтропической зоны [1,2]. Целью нашего исследования является исследование поверхности клеток у древесных и травянистых видов Средней полосы России, обладающих синей или серебристой окраской. Предполагается, что и у них могут быть азулены.

МЕТОДЫ

Объекты. В качестве объектов исследований с синей или серебристой окраской выбраны листья древесных видов и травянистых видов Подмосковья в районе Пущино на Оке: василисника малого *Thalictrum minus* L., лоха колючего *Elaeagnus pungens* Thunb., ивы белой *Salix alba* L., облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., красного клевера *Trifolium pratense* L., клевера ползучего *Trifolium repens* L., райграса пастбищного *Lolium perenne* Engels. Использовали свежие листья растений без всякой обработки и подвергнутые воздействию озоном в хронической экспозиции в общей дозе (в мкл/л) 0,05 (по 5 часов в день в течение трех дней). Озон производился генератором КПМЗ (Россия).

Спектральные методы. Поглощение и собственную флуоресценцию клеток измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США) и спектрофлуориметра *Perkin Elmer 350 MPF-44B* (UK). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 96% этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более) в 0,5 см-кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью вышеупомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра.

Хроматография. Для выявления азуленов экстракты хроматографировали на бумаге Whatman № 1 без или после пропитки вазелиновым маслом или на тонкослойных пластинках силикагеля Silufol, как описано ранее для пыльцы [1]. Затем регистрировали их спектры поглощения и флуоресценции, чтобы сравнить с данными, полученными на интактных клетках. Среднюю ошибку опыта из трех-четырёх повторностей вычисляли для каждого варианта и контроля, соответственно. Концентрацию азуленов (А) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:

$$A = D_{580} / \epsilon \times l,$$

где D_{580} – оптическая плотность при 580 нм,

ϵ – коэффициент молярной экстинкции азулена $328 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$,

l – толщина слоя жидкости в кювете, см.

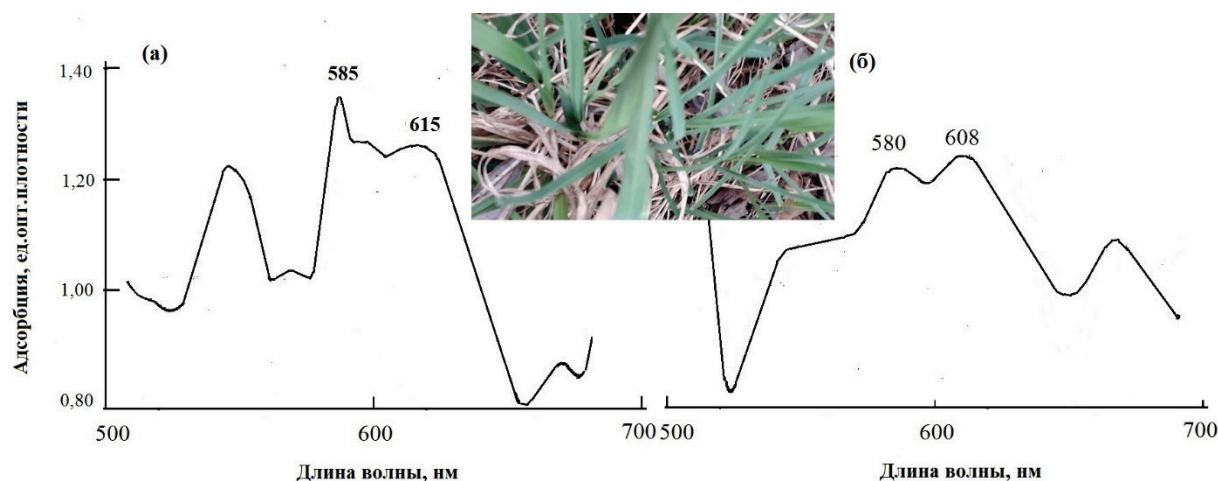


Рисунок 1. Спектры поглощения верхней поверхности листа райграса пастбищного *Lolium perenne* L. (а) спектр до экстракции в течение 10 мин 96 % этанолом; (б) дифференциальный спектр листа до экстракции минус спектр листа после экстракции. Фото листьев – видна голубая окраска

Эксперименты проводили в трех повторностях и вычисляли среднюю ошибку опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Листья с голубой или серебристой окраской выбранных объектов были подвергнуты обработке озоном в общей дозе 0,05 мкл/л. Чувствительность к озону оценивали по спектральным изменениям поверхности листьев. При всех экспозициях заметных изменений в спектрах поглощения и флуоресценции листьев не было выявлено. По аналогии с такими же результатами с древесными видами Сочинского дендрария [1] предполагали, что это связано с присутствием синих пигментов азуленов в кутикуле и клеточной стенке. Для проверки предположения проведены специальные опыты по спектральному анализу поверхности листьев включая прямые измерения листьев и 10- или 60-минутных экстрактов из них этанолом или ацетоном.

На рисунке 1 приведены спектры поглощения листьев райграса пастбищного *Lolium perenne*, травянистого растения с голубой окраской. В контрольном варианте (а) видны заметные максимумы 585 и 615 нм, характерные для азуленов [3]. Экстракция 100% ацетоном или 96 % этанолом целых неповрежденных листьев (1:10 вес/объем) в течение 5-10 минут, как показано ранее [1], дает возможность увидеть присутствие синих пигментов в экстракте. Десятиминутная экстракция с растворителем выявила слабую голубую окраску экстрактов у всех исследованных объектов. Как показано в дифференциальном спектре поглощения листа “контроль поверхности

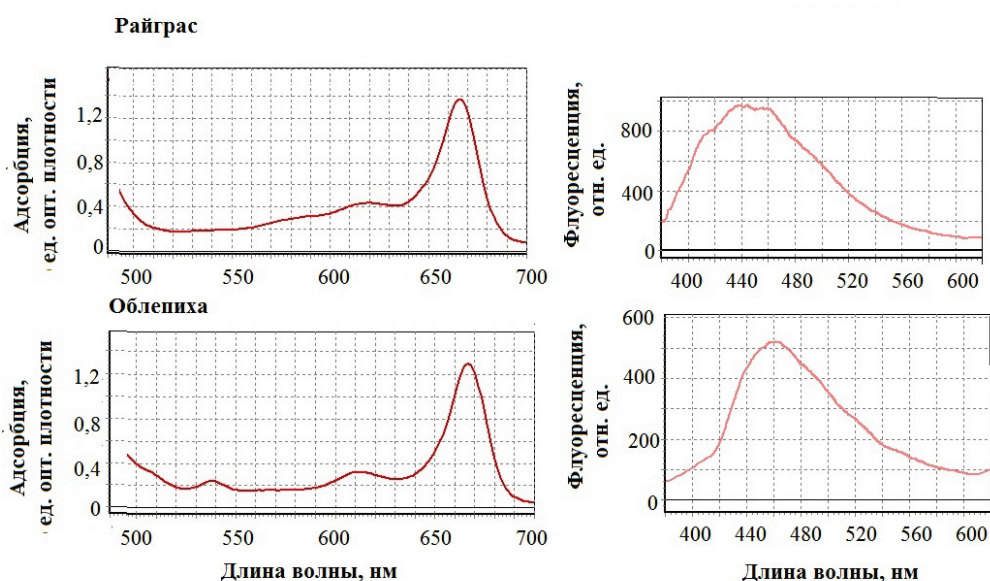


Рисунок 2. Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) экстрактов с листовой поверхности в течение 10 мин 96 % этанолом у райграса пастбищного *Lolium perenne* и облепихи крушевидной *Hippophae rhamnoides*

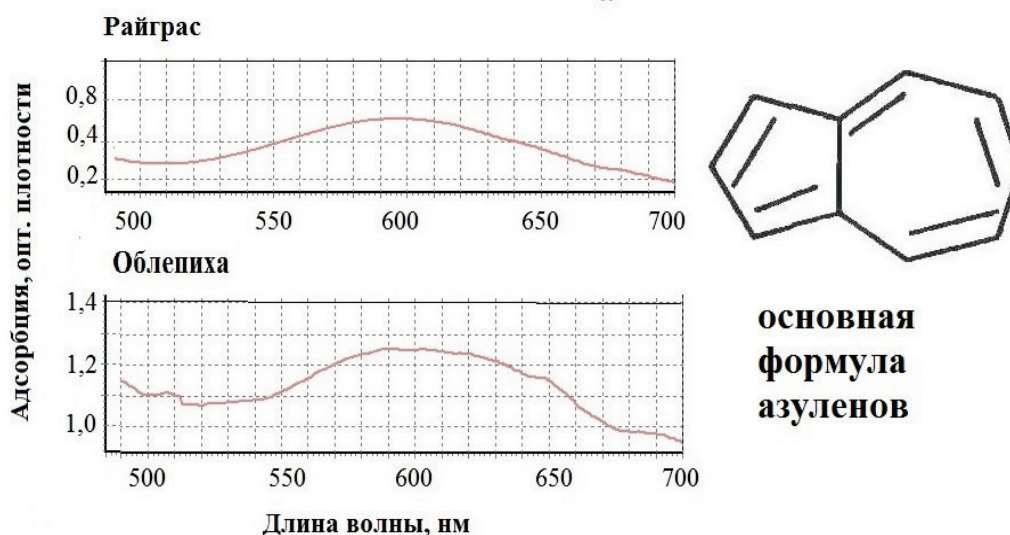


Рисунок 3. Спектр поглощения 10 минутных экстрактов этанолом из листьев райграса пастбищного и облепихи крушевидной после обработки 50 % серной кислотой

без экстракции минус поверхность после экстракции “(б) видны максимумы 580 и 608 нм. Время появления в экстракте хлорофилла, показывало в нашей предыдущей работе [1], насколько глубоко проникает растворитель с клеточной поверхности внутрь клетки. Оказалось, что практически у всех исследованных в данной работе видов слой с голубым пигментом очень тонок, поскольку в экстракте уже обнаруживается хлорофилл. На рисунке 2 показано, что в спектрах поглощения у таких экстрактов с поверхности листьев райграса и облепихи азулены видны в виде максимумов 580 и 615 нм у первого вида и максимума 610 нм у второго вида.

Ранее было установлено присутствие азуленов с максимумами поглощения 608 нм у эвкалипта пепельного, сосны мелкоцветковой и ели голубой [1], как у фенилазуленов [3]. В нашем случае могут быть другие азулены, природа которых пока не идентифицирована. Эти пигменты не являются антоцианами, поскольку не меняют окраску в кислоте и щелочи.

Мы определили примерное содержание азуленов в 10 минутных этанольных экстрактах исследуемых нами видов в расчете на единицу массы листьев (табл. 1). Оказалось, что жесткие, опушенные или имеющие железы листья древесных видов имели близкую концентрацию азуленов около 1 мг на г сухой массы, тогда как у травянистых растений с мягкой листовой пластикой их было значительно меньше. Однако жесткие пластинки листьев райграса отличались столь же высоким содержанием азуленов, как и древесные виды. Если сравнить количество азуленов в листовых поверхностях растений Средней России и субтропиков Сочинского дендрария [1], то они сопоставимы. У эвкалипта пепельного и сосны мелкоцветковой эти значения близки к полученным для лоха колючего, облепихи крушиновидной и белой ивы, а также райграса пастбищного и красного клевера. Более низкие концентрации в поверхностных слоях, как и у кедра атласского, отмечены у василисника малого и белого клевера.

Таким образом, растения с голубой или серебристой окраской листьев содержат азулены в поверхностном слое. Эти синие пигменты имеют свойства антиоксидантов, предохраняя клетки от реактивных форм кислорода, появляющихся под действием ультрафиолетовой радиации и озона или загрязнения окружающей среды. При этом роль азуленов может рассматриваться как сенсора реактивных форм кислорода [4]. Антиоксидантные свойства азуленов, благодаря их многочисленным двойным связям (основная формула на рис. 3), известны давно

Таблица 1. Содержание азуленов на поверхности листьев исследованных растений по данным 10-минутных экстрактов этанолом

Вид травянистого растения	Азулены, мг/г сухой массы	Вид древесного растения	Азулены, мг/г сухой массы
<i>Lolium perenne</i> L (Graminae) Райграс пастбищный	1,63±0,07	<i>Elaeagnus pungens</i> L. (Elaeagnaceae) Лох колючий	1,00±0,05
<i>Thalictrum minus</i> L. (Ranunculaceae) Василисник малый	0,17±0,01	<i>Hippophae rhamnoides</i> L. (Elaeagnaceae) Облепиха крушиновидная	1,04±0,06
<i>Trifolium pratense</i> L. (Fabaceae) Клевер луговой	0,96±0,03	<i>Salix alba</i> L. ива белая (Salicaceae)	0,92±0,04
<i>Trifolium repens</i> L. (Fabaceae) Клевер белый	0,41±0,03		

и применяются в медицине и оптической технике. Теперь такое же их приложение может быть и в природе растений в качестве защитного фильтра для их поверхности. Показательно, что наряду с поверхностью листьев, азулены содержатся и в одиночных клеточных структурах, таких как пыльца семенных растений и вегетативные споры споровых видов, где также могут выполнять протекторную функцию [2]. При выделении из растений наблюдается тесная связь азуленов с хлорофиллом. Так азулены могут находиться не только на поверхности клеток, но и внутри, в частности, в хлоропластах, где играют роль доноров электронов при повреждении электрон-транспортных путей [2]. Дальнейшие исследования в этой области могут быть весьма полезны для понимания механизмов защитных свойств азуленов.

Список литературы / References:

1. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А.Р., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону. *Биологические мембраны*, 2022, т. 39, № 1, с. 54-62. [Roshchina V.V., Kuchin A.V., Okunev A.R., Soltani G.A., Khaibulaeva L.M., Prizova N.K. The presence of azulenes on the surface of plant cells as a test for sensitivity to ozone. *Biological Membranes*, 2022, vol. 39, no. 1, pp. 54-62, doi: 10.1134/S1990747822010081. (In Russ.)]
2. Roshchina V.V. Possible Role of Azulene in Plant Life: Experiments with Models. *SMP Environ. Sci. Technol.*, 2022, vol. 1, no. 1, pp.1-10.
3. Heilbronner E. Azulenes. In: Non-benzenoid aromatic compounds. Ed. D.Ginsburg. New York, London: Intersci. Publ., pp. 171–276.
4. Murfin L.C., Lewis S.E. Azulene – a bright core for sensing and imaging. *Molecules*, 2021, vol. 26, pp. 353-362.

AZULENES OF LEAF SURFACE AS A PROTECTIVE OPTICAL FILTER

Roshchina V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M.

Institute of Cell Biophysics, FSC PNCBI RAS

Institutskaya str. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: roshchinavic@mail.ru

Received 11.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0480

Abstract. Reactions to ozone of surface cells of leaves with blue or silver color in plant species: meadow-rue *Thalictrum minus* L., oleaster *Elaeagnus* L., white willow *Salix alba* L., buckthorn *Hippophae rhamnoides* L., creeping clover *Trifolium repens* L., red clover *Trifolium pratense* L., ryegrass pasture *Lolium perenne* Engels were studied. They had no noticeable spectral changes. It has shown that the surface layers of the cuticle and the cell wall of these plants contained azulenes. In the leaf absorption spectra, the maxima characteristic of these blue pigments of 580-585 nm and 608-610 nm, respectively, were noted, and in the fluorescence spectra – 410 or 430 nm. It has assumed that these pigments may be the primary targets for ozone in species with blue or silvery leaf color, and their antioxidant properties determine low sensitivity to ozone. In this case, the blue pigments serve as a protective optical filter against ultraviolet radiation and ozone formed with its participation.

Key words: adsorbance, autofluorescence, azulenes, spectral analysis.