

ВКЛАД КРАТКОВРЕМЕННОГО ТЕРМОСТРЕССА В РЕГУЛЯЦИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ И АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРАСНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ

Е.С. Белоциценко, И.М. Яковлева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия, *belotsitsenko_es@mail.ru*

Аннотация. Исследованы изменения активности антиоксидантных ферментов и содержания низкомолекулярных антиоксидантов у морских красных водорослей *Ahnfeltiopsis flabelliformis* и *Chondrus pinnulatus* после 3 ч термостресса (26 °С), а также комбинированного высокотемпературного и светового стресса. Обсуждается роль кратковременного повышения температуры воды в регуляции окислительных и антиоксидантных процессов у верхнесублиторальных красных водорослей в летний период.

Ключевые слова: макроводоросли, фотоокислительный стресс, антиоксидантные ферменты, низкомолекулярные антиоксиданты

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-130-134

В умеренных широтах температура является одним из основных абиотических факторов, определяющих географическое распространение морских макроводорослей, их выживание и продуктивность [Bischof, Rautenberger, 2012]. Колебания температурного режима могут вызывать повышение уровня активных форм кислорода (АФК), образование которых, с одной стороны, является неотъемлемой частью фотосинтетических процессов, а, с другой стороны, может быть потенциально опасным для растительных клеток в случае нарушения баланса между продукцией АФК и их нейтрализацией компонентами антиоксидантной системы (АОС) защиты [Lesser, 2012]. К сожалению, сведения о влиянии температурного режима на продуцирование АФК и антиоксидантный ответ водорослей ограничены небольшим количеством работ, выполненных, главным образом, на макроводорослях Арктики и Атлантического побережья [Bischof, Rautenberger, 2012], а также макрофитах тропиков [Lesser, 2012]. Кроме того, изменения уровня продукции АФК и антиоксидантного ответа макроводорослей, вызванные кратковременным повышением температуры воды, могут играть значительную роль в формировании стресс-устойчивости видов в условиях дополнительной нагрузки других факторов среды, в частности, при действии яркого света, как это было показано ранее для микроводорослей [Lesser, 2012]. Поэтому целью настоящей работы было исследование регуляции ферментативной и низкомолекулярной систем детоксикации АФК у макроводорослей умеренных широт в условиях кратковременного колебания температурного и светового режима на мелководье в летний период.

В качестве модельных организмов были выбраны широко распространенные красные водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Harv.) Masuda и *Chondrus pinnulatus* (Harvey) Okamura, прикрепленные формы которых собирали в летний период из естественных незатененных мест обитания в Амурском заливе (Японское море) на глубине 1.5 м. Температура в месте сбора составляла 22 °С. После 3-х дневной приаклимации в лабораторных условиях (22 °С ±0.5 °С; 41 Вт/(м² сек); 12ч:12ч) водоросли помещали в эксперименты, описанные ниже. В первом эксперименте (термостресс) в условиях лаборатории водоросли экспонировали 3 ч при низкой освещенности 41 Вт/(м² сек), которая насыщала, но не ингибировала фотосинтез, и температуре 26 °С, которая соответствовала максимальному прогреву воды на мелководье Амурского залива в типичный летний

солнечный день. Во втором эксперименте (комбинированный стресс) в течение 3 ч водоросли экспонировали на ярком свете (ФАР 350- 385 Вт/(м² сек), УФА 24-27 Вт/(м² сек); УФБ 1.3-1.9 Вт/(м² сек) под открытым небом (НИЦМБ, г. Владивосток) при 26 °С. Поддержание температуры в экспериментах обеспечивали термостатированные аквариумы. После проведения стрессовых экспозиций водоросли возвращали в исходные условия (22 °С ±0.5 °С; 41 Вт/(м² сек); 12ч:12ч) для наблюдения за процессом восстановления. В течение экспериментов контрольные образцы водорослей культивировали в условиях преакклимации. У контрольных и экспериментальных образцов анализировали скорость фотосинтеза, активность АОС и содержание малонового диальдегида (МДА), перекиси водорода (H₂O₂) после 3 ч стрессовых экспозиций, а также через 20 ч постстрессового периода. Максимальную скорость потенциального фотосинтеза (P_{max}) водорослей регистрировали стандартными методами оксиметрии [Granbom et al., 2001]. Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), аскорбатпероксидазы (АПО) и содержание аскорбата (АсК), глутатиона (ГЛ) анализировали согласно [Яковлева, Белоциценко, 2017]. Для оценки устойчивости водорослей к окислительному стрессу определяли содержание МДА [Kamal et al., 1989] и H₂O₂ [Velikova et al., 2000]. Все анализы проводили в 4-х кратной биологической повторности. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых переменных (*t*-test) при равных объемах выборок и дисперсий. Представленные значения соответствуют средним и их стандартным отклонениям (SD); различия считали значимыми при $P < 0.05$.

Сравнительный анализ антиоксидантного статуса верхне-сублиторальных водорослей Японского моря: *A. flabelliformis* и *C. pinnulatus*, показал, что активность СОД, КАТ и содержание АсК, ГЛ были выше в тканях анфельтиопсиса (табл. 1). В активности АПО и содержании МДА и H₂O₂ статистически значимых различий между видами обнаружено не было (табл. 1).

Таблица 1.

Активность АОС и уровень маркеров окислительного стресса у контрольных образцов водорослей

Вид	СОД,	КАТ,	АПО,	АсК,	ГЛ,	МДА,	H ₂ O ₂ ,
	отн. ед./г с.в.	отн. ед./г с.в.	отн. ед./г с.в.	мкмоль/г с.в.	мкмоль/г с.в.	нмоль/г с.в.	нмоль/г с.в.
<i>A. flabelliformis</i>	73.8 ^a	77.2 ^a	3.4 ^a	1.36 ^a	0.62 ^a	7.14 ^a	56 ^a
<i>C. pinnulatus</i>	54.2 ^b	39.1 ^b	3.2 ^a	0.86 ^b	0.23 ^b	6.54 ^a	61 ^a

Примечание. В таблице представлены среднеарифметические значения. Одинаковые буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают отсутствие статистически значимых различий между значениями параметра у исследованных видов, при $P < 0.05$. SD не превышало 15%, при $n=4$. с.в. – сухой вес.

В условиях комбинированного стресса (КС: высокая инсоляция; 26 °С) для обоих видов было отмечено характерное снижение максимальной скорости фотосинтеза, P_{max} (табл. 2) и накопление в тканях МДА и H₂O₂ (табл. 2). Однако, в постстрессовый период, у *A. flabelliformis* уровни P_{max} , МДА и H₂O₂ не превышали контрольные значения (табл. 2), тогда как у *C. pinnulatus* восстановление этих показателей до уровня контроля не происходило (табл. 2). Таким образом, изученные виды характеризуются разной степенью устойчивости к совместному действию кратковременного повышения температуры воды и высокой инсоляции. У стресс-чувствительного *C. pinnulatus* интенсификация окислительных процессов в условиях КС могла быть вызвана постэкспозиционной инактивацией СОД (рис. 1А) и снижением содержания АсК (рисунок, Г). Обращает внимание дальнейшее падение содержания АсК, сопровождающееся инактивацией АПО у этого вида в постстрессовый период

(рисунок, А, Г), что может указывать на истощение пула АсК вследствие нарушения процессов его ресинтеза [Asada, 1999]. У стресс-устойчивого *A. flabelliformis* наблюдаемое снижение фотоокислительной нагрузки в постстрессовый период, по-видимому, было обусловлено 2-3-х кратным повышением активности антиоксидантных ферментов (рисунок, А-В) и накоплением АсК, ГЛ при действии КС (рисунок, Г, Д).

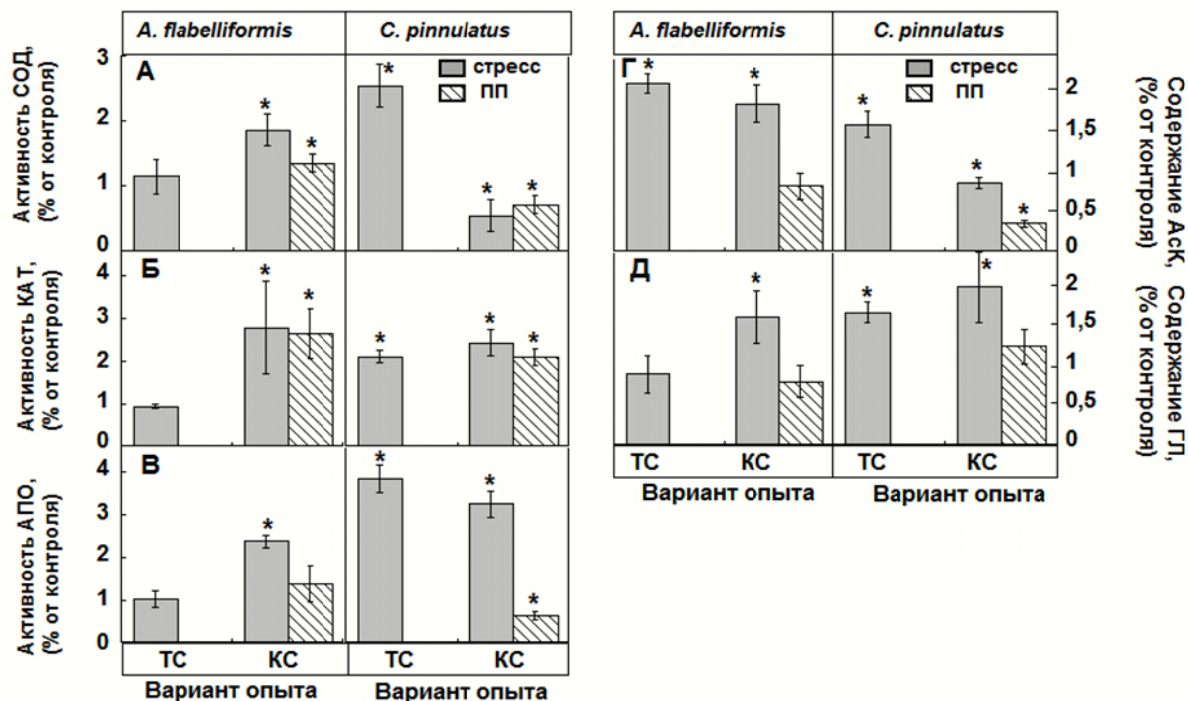


Рисунок. Активность СОД (А), КАТ (Б), АПО (В) и содержание АсК (Г), ГЛ (Д) у водорослей после термостресса, (ТС: слабый свет; 26 °С) или комбинированного стресса (КС: высокая инсоляция; 26 °С) и постстрессового периода (ПП: слабый свет; 22 °С). Данные представлены в единицах относительно контроля (см. материалы и методы). *отличие статистически значимо по отношению к контролю при $P < 0.05$.

Принимая во внимание высокую устойчивость обоих видов к световому стрессу в диапазоне комфортных температур: 15-20 °С [Белоциценко, 2015], мы предполагаем, что разная устойчивость *A. flabelliformis* и *C. pinnulatus* к КС была обусловлена различием в реакции их АОС на повышение температуры воды.

Таблица 2.

Максимальная скорость потенциального фотосинтеза (P_{max}) и содержание МДА, H_2O_2 у водорослей после термостресса, (ТС: низкий свет; 26 °С) или комбинированного стресса (КС: высокая инсоляция; 26 °С) и постстрессового периода (ПП: низкий свет; 22 °С).

Вид	P_{max}			МДА			H_2O_2		
	Вариант опыта			Вариант опыта			Вариант опыта		
	ТС	КС	ПП	ТС	КС	ПП	ТС	КС	ПП
<i>A. flabelliformis</i>	0.828*	0.606*	1.040	1.050	1.366*	0.989	0.895	1.877*	1.116
<i>C. pinnulatus</i>	0.523*	0.256*	0.445*	1.567*	2.243*	1.955*	1.866*	3.064*	2.677*

Примечание. Данные представлены в единицах относительно контроля (см. материалы и методы). На рисунке приведены среднеарифметические значения, $n=4$. *отличие статистически значимо по отношению к контролю при $P < 0.05$.

Действительно, в условиях термостресса (26 °С), при уровне освещенности насыщающем, но не ингибирующем фотосинтез *A. flabelliformis* и *C. pinnulatus*, повышение уровней МДА, H₂O₂ (табл. 2) и активация антиоксидантных ферментов (рисунок, А-В) были отмечены только у хондруса.

Это свидетельствует о развитии окислительного стресса у этой водоросли и ее повышенной чувствительности к тепловому воздействию [Choo et al., 2004]. Повидимому, подобная тенденция объясняется изначально низким конститутивным уровнем активности АОС у *C. pinnulatus* по сравнению с *A. flabelliformis* (табл. 1), что может быть связано с зонально-географической дифференциацией этих видов [Яковлева, Белоциценко, 2017].

Таким образом, отмеченные нами различия в функционировании АОС низкобореального *C. pinnulatus* и низкобореально-тропическо-нотального *A. flabelliformis* в условиях высокой инсоляции и повышенной температуры воды в летний период могут свидетельствовать о том, что способность к реализации антиоксидантного потенциала водорослей одной глубины обитания, но различного широтного распространения, определяется их генетически закрепленным диапазоном толерантности к температуре.

Работа выполнена в рамках госбюджетной темы ННЦМБ ДВО РАН (НИР 0268-2018-0006).

Литература

Белоциценко Е.С. Устойчивость морских макроводорослей к фото-окислительному стрессу в условиях флуктуации температуры: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владивосток: ДВО РАН, ИБМ. – 2015. – 28 с.

Яковлева И.М., Белоциценко Е.С. Антиоксидантный потенциал массовых видов макроводорослей Японского моря // Биология моря. – 2017. – Т. 43, № 5. – С. 372–382.

Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1999. – V. 50. – P. 601–639.

Bischof K., Rautenberger R. Seaweed responses to environmental stress: reactive oxygen and antioxidative strategies // Ecological studies. – 2012. – V. 219. – P. 109–132.

Choo K.S., Nilsson J., Pedersen M., Snoeijjs P. Photosynthesis, carbon uptake and antioxidant defense in two coexisting filamentous green algae under different stress conditions // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 2005. – V. 292. – P. 127–138.

Granbom M., Pedersén M., Kadel P., Lüning K. Circadian rhythm of photosynthesis in the red macroalga *Kappaphycus alvarezii*: dependence on light quantity and quality // J. Phycol. – 2001. – V. 37. – P. 1020–1025.

Kamal A.A., Goma A., el Khafif M., Hammad A.S. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts // Env. Res. – 1989. – V. 49. – P. 173–180.

Lesser M.P. Oxidative stress in tropical marine ecosystems // In: Abele D., Vazquez-Medina J.P., ZentenoSavin T. (eds), Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. – V. 1. – Wiley-Blackwell, Oxford. – P. 9–19.

Velikova V., Yordanov I., Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines // Plant Sci. – 2000. – V. 151. – P. 59–66.

**IMPACT OF SHORT-TERM THERMAL STRESS ON OXIDATIVE AND
ANTIOXIDANT REGULATION IN THE RED MACROALGAE
FROM THE SEA OF JAPAN**

E.S. Belotsitsenko, I.M. Yakovleva

Institute of Marine Biology, Vladivostok, Russia, *belotsitsenko_es@mail.ru*

Abstract. Changes in the activity of antioxidant enzymes and low-weight molecular antioxidants in the red macroalgae *Ahnfeltiopsis flabelliformis* and *Chondrus pinnulatus* after 3h exposure to thermal stress (26 °C) and after combined thermal and high light stress were investigated. Contribution of the increased temperature for the regulation of oxidative and antioxidant processes in the upper-subtidal red macroalgae during summer is discussed.

Keywords: *macroalgae, photooxidative stress, antioxidative enzymes, low-weight molecular antioxidants*