

МЕЛАТОНИН И ЕГО УЧАСТИЕ В РЕАКЦИЯХ ФОТООКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *ARABIDOPSIS THALIANA*

И.А. Бычков, Н.В. Кудрякова, В.В. Кузнецов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, *Ivan.a.b@mail.ru*

Аннотация. Проведено изучение функций мелатонина в снижении негативных последствий фотоокислительного стресса в срезанных листьях *Arabidopsis thaliana*. Показано, что он участвует в сохранении хлорофилла, поддержании активности фотосистемы II. Мелатонин уменьшал также накопление антоцианов и малонового диальдегида. Действие мелатонина, предположительно, было связано с прямой деактивацией активных форм кислорода, за счет увеличения содержания каротиноидов и пролина, выполняющих антиоксидантную функцию.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, антиоксидант, мелатонин, фотоокислительный стресс

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-170-174

Введение. Мелатонин впервые был идентифицирован в растительных организмах в 1995 году [Reiter at al., 2015]. Принято считать, что с одной стороны он способен выступать в качестве регулятора различных физиологических процессов, а с другой играет роль антиоксиданта [Arnao at al., 2014]. Согласно результатам анализа транскриптома *Arabidopsis*, мелатонин способен влиять на большое число генов ответа на стресс, включая гены антиоксидантных ферментов, гены стресс-индуцируемого гормонального сигналинга, гены транскрипционных факторов, связанных со стрессом, и другие [Weeda at al., 2014]. Антиоксидантная функция мелатонина проявляется в его способности связывать активные формы кислорода. Показано, что одна молекула мелатонина потенциально может дезактивировать через каскад реакций до десяти свободных радикалов [Tan at al., 2007].

К настоящему времени показана положительная роль мелатонина в снижении негативного действия ряда стрессоров абиотической природы. Мелатонин уменьшает окисление липидов мембран, снижает потерю хлорофилла, препятствует замедлению роста и развития растений разных таксонов при действии холода, гипертермии, засухи, недостатка кислорода, влиянии тяжелых металлов и засоления [Zhang at al., 2015]. Показано, что растения, подвергающиеся интенсивному облучению в естественных или искусственных условиях, накапливают больше мелатонина и продуктов его метаболизма в тканях [Hardeland, 2016], однако фотопротекторная роль мелатонина практически не изучена.

Целью данной работы являлось исследование участия мелатонина в снижении окислительного стресса листьев *Arabidopsis* в условиях повышенной освещенности.

Материалы и методы. Для работы использовали растения *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia 0. Растения выращивались в почве до достижения четырехнедельного возраста при 23 °С, режиме: свет/темнота – 16/8 ч и интенсивности освещения 100 мкМ⁻² с⁻¹. Для опыта отбирали 5 и 6 розеточные листья. Срезанные листья раскладывались в чашки Петри на бумажные фильтры на воду или растворы мелатонина (10 мкМ, 100 мкМ или 1 мМ). Чашки помещались в условия освещенности высокой интенсивности (250 мкМ⁻² с⁻¹). В качестве контроля использовали срезанные листья, инкубируемые на воде при рассеянном освещении (30 мкМ⁻² с⁻¹). Образцы выдерживались в данных условиях в течение 3 суток. Измерение содержания

фотосинтетических пигментов проводили по методу [Lichtenthaler, 1984]. Параметры фотосинтетической активности оценивали, измеряя флуоресценцию хлорофилла *a* с помощью флуориметра PAM-101 (Walz, Германия). Содержание свободного пролина определяли по методу [Bates et al., 1973]. Накопление малонового диальдегида оценивали по окрашенному комплексу ТБК с конечными продуктами окисления липидов [Heath, Packer, 1968], а уровень антоцианов – по методу [Giraud et al., 2008]. Все измерения проводились в 3-6 повторностях.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что мелатонин способен влиять на сохранение хлорофилла в условиях фотостресса (табл. 1). Вероятно, это связано как с более высоким уровнем антиоксидантной защиты в присутствии мелатонина, так и с его способностью ингибировать ферменты распада хлорофилла – хлорофиллазу и феофорбид-*a*-оксигеназу, как было показано в опытах по старению листьев [Hardeland, 2016]. Интересно, что содержание каротиноидов у обработанных мелатонином листьев достоверно увеличилось не только относительно водного варианта, но и относительно контроля. Общеизвестно, что каротиноиды дезактивируют молекулы синглетного кислорода, который активно образуется в хлоропластах под действием избыточной световой энергии. Следовательно, мелатонин не только сам выступает в роли антиоксиданта, но и действует через каротиноиды.

Таблица 1.

Влияние мелатонина на содержание фотосинтетических пигментов в листьях *Arabidopsis* в условиях фотоокислительного стресса

Вариант обработки	Хлорофилл <i>a</i> , мг/г сырого веса	Хлорофилл <i>b</i> , мг/г сырого веса	Хлорофилл <i>a+b</i> , мг/г сырого веса	Каротиноиды, мг/г сырого веса
Контроль (вода, 30 мкМ ⁻² с ⁻¹)	0,504±0,008	0,242±0,006	0,746±0,013	0,114±0,003
Вода (250 мкМ ⁻² с ⁻¹).	0,315±0,005	0,162±0,003	0,477±0,008	0,112±0,001
+10 мкМ мелатонина	0,411±0,027	0,210±0,005	0,611±0,014	0,135±0,006
+100 мкМ мелатонина	0,424±0,011	0,208±0,011	0,632±0,022	0,136±0,001
+1 мМ мелатонина	0,380±0,001	0,212±0,006	0,592±0,006	0,149±0,001

Раствор мелатонина высокой концентрации 1 мМ в меньшей степени способствовал сохранению хлорофилла *a*. Эта особенность согласуется с данными измерения флуоресценции хлорофилла (табл. 2). Фотосинтетическая активность растения зависит не только от содержания хлорофилла, но и от эффективности использования полученной энергии света. Показатель *Fv/Fm* определяет потенциально-возможный максимальный квантовый выход фотосистемы II, уменьшение величины этого показателя свидетельствует о повреждении фотосинтетического аппарата и может служить показателем стресса. Полученная энергия квантов света расходуется на полезную работу *Y(II)*, и рассеивается в виде тепла с помощью регулируемого *Y(NPQ)* и нерегулируемого *Y(NO)* не фотохимического тушения. Соотношение этих показателей характеризует эффективность фотосистемы. В нашем опыте фотоокислительный стресс уменьшал показатели *Fv/Fm*, *Y(II)* и *Y(NPQ)*, но увеличивал показатель *Y(NO)*. При обработке мелатонином с концентрацией 10 мкМ и 100 мкМ негативное воздействие света уменьшалось, однако этот эффект не проявлялся при использовании 1 мМ мелатонина.

Известно, что антоцианы накапливаются в растении при световом облучении высокой интенсивности [Shi and Xie, 2014]. Индуцируемое в ответ на свет накопление антоцианов может служить показателем степени стресса. В наших опытах фотоокислительный стресс вызывал более чем десятикратное увеличение содержания антоцианов в листьях, инкубируемых на воде, по сравнению с контролем (табл. 3). Обработка мелатонином значительно замедляла скорость их накопления.

Таблица 2.

Влияние мелатонина на фотохимические и нефотохимические процессы в листьях *Arabidopsis* в условиях фотоокислительного стресса (по данным флуориметрии)

Вариант обработки	Fv/Fm	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)
Контроль (вода, 30 мкМ ⁻² с ⁻¹)	0.807±0,001	0.692±0,004	0.079±0,006	0.230±0,007
Вода (250 мкМ ⁻² с ⁻¹)	0.707±0,007	0.647±0,007	0.038±0,007	0.315±0,007
+10 мкМ мелатонина	0.750±0,022	0.679±0,028	0.044±0,013	0.280±0,016
+100 мкМ мелатонина	0.756±0,044	0.664±0,046	0.045±0,007	0.291±0,040
+1 мМ мелатонина	0.710±0,055	0.549±0,080	0.075±0,015	0.376±0,065

Другим важным показателем устойчивости растения при воздействии негативных абиотических факторов является целостность клеточных мембран. Любой вид стресса сопровождается накоплением активных форм кислорода, которые являются причиной перекисного окисления липидов мембран. Мы оценивали целостность мембран, измеряя накопление малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта окисления липидов. В листьях, инкубируемых на воде, избыточный свет вызывал почти пятикратное увеличение количества МДА, мелатонин понижал эти значения до четырех- и трехкратного значения относительно контроля (табл. 3). В наименьшей степени МДА и антоцианы накапливались при использовании 1 мМ мелатонина.

Таблица 3.

Влияние мелатонина на накопление антоцианов и накопление малонового диальдегида в листьях *Arabidopsis* в условиях фотоокислительного стресса.

Вариант обработки	Накопление антоцианов, усл. ед.	Накопление МДА, мкМ/г сырой массы
Контроль (вода, 30 мкМ ⁻² с ⁻¹)	0,135±0,004	2,062±0,157
Вода (250 мкМ ⁻² с ⁻¹)	1,403±0,086	10,117±0,856
+10 мкМ мелатонина	0,823±0,076	8,396±0,461
+100 мкМ мелатонина	1,007±0,025	6,282±0,098
+1 мМ мелатонина	0,561±0,019	6,880±0,105

Воздействие света высокой интенсивности способствовало накоплению пролина у опытных растений (табл. 4). Примечательно, что добавление мелатонина усиливало его накопление. Пролин является эффективным антиоксидантом, способным принимать участие в прямом «тушении» свободно-радикальных реакций при окислительном стрессе [Liang et al., 2013]. Его накопление уменьшает окислительный стресс. Увеличение содержания пролина в нашем опыте свидетельствует о том, что растения, обработанные мелатонином, продолжают испытывать стресс, однако накопление антиоксидантов способствует уменьшению негативных последствий для опытных образцов.

Таблица 4.

Влияние мелатонина на накопление пролина в листьях *Arabidopsis* в условиях фотоокислительного стресса

Вариант обработки	Накопление пролина, мМ/г сырой массы
Контроль (вода, 30 мкМ ⁻² с ⁻¹)	0,134±0,005
Вода (250 мкМ ⁻² с ⁻¹)	0,317±0,010
+10 мкМ мелатонина	0,371±0,026
+100 мкМ мелатонина	0,336±0,044
+1 мМ мелатонина	0,520±0,073

Заключение. В условиях фотоокислительного стресса мелатонин снижает накопление антоцианов и способствует сохранению целостности липидов мембран, что свидетельствует об уменьшении испытываемого растениями стресса. Он также эффективно поддерживает уровень хлорофиллов и активность фотосинтетического аппарата в концентрациях 10 и 100 мкМ. Мелатонин повышает уровень каротиноидов и пролина, опосредованно действуя на свободные радикалы. Нужно отметить, что в данной постановке эксперимента ни в одном из вариантов мелатонин не снижал уровень окислительного стресса до контрольных величин, что демонстрирует пределы его возможностей как антиоксиданта. Показаны отличия в действии разных концентраций мелатонина, особенно в отношении параметров фотосинтеза. Можно предположить, на основании литературных данных, что в данном опыте мелатонин высокой концентрации (1 мМ) действовал в большей степени как прямой антиоксидант, и в меньшей – как регулятор активности фотосинтетических генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00584).

Литература

Arnao M.B., Hernandez-Ruiz Melatonin and its relationship to plant hormones // *Ann. Bot.* – 2018. – V. 121. – P. 195–207.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* – 1973. – V. 39. – P. 205–207.

Giraud E., Ho L.H., Clifton R. et al. The absence of alternative oxidase1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 147. – P. 595–610.

Hardeland R. Melatonin in plants – diversity of levels and multiplicity of functions // *Frontiers in Plant Science.* – 2016. – V.7. – P. 1–14.

Heath L.R., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1968. – V. 125. – P. 189–198.

Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Meth. Enzymol.* – 1987. – V. 148. – P. 350–382.

Reiter R.J., Tan D.X., Zhou Z. et al. Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive // *Molecules.* – 2015. – V. 20(4). – P.7396–7437.

Shi M.-Z., Xie D.-Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana* // *Recent Patents on Biotechnology.* – 2014. – V. 8. – P. 47–60.

Tan D.-X., Manchester L.C., Terron M.P. et al. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? // *J. Pineal Res.* – 2007. – V. 42. – P. 28–42.

Weeda S., Zhang N., Zhao X. et al. *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // *PlosOne.* – 2014. – V. 9. – P. 1–18.

Xinwen Liang, Lu Zhang, Sathish Kumar Natarajan, and Donald F. Becker Proline Mechanisms of Stress Survival // *Antioxidants & redox signaling.* – 2013. – V. 19. – P. 998–1011.

Zhang N., Sun Q., Zhang H. et al. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants // *Journal of Experimental Botany.* – 2015. – V. 66. – P. 647–656.

MELATONIN AND ITS ROLE IN THE REACTIONS OF PHOTO-OXIDATIVE STRESS *ARABIDOPSIS THALIANA*

I.A. Bychkov, N.V. Kudryakova, V.V. Kusnetsov

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, *Ivan.a.b@mail.ru*

Abstract. In this study, we examined the role of melatonin in reducing of the negative effects of photo-oxidative stress in detached leaves of *Arabidopsis*. Melatonin was shown to participate in the retention of chlorophyll and the maintenance of photosystem II. Melatonin also reduced the accumulation of anthocyanins and malonic dialdehyde. The effect of melatonin was presumably associated with the direct deactivation of reactive oxygen species, particularly with the increase in carotenoids and proline performing the antioxidant function.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, antioxidant, melatonin, photo-oxidative stress