

УДК 581.1

МЕЛАТОНИН ПОДДЕРЖИВАЕТ ФОТОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АССИМИЛЯЦИОННОГО АППАРАТА И ЗАМЕДЛЯЕТ СТАРЕНИЕ ЛИСТЬЕВ ОДНОДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ

© 2020 г. Е. Д. Данилова^{1,*}, М. В. Ефимова¹,
Л. В. Коломейчук¹, член-корреспондент РАН В. В. Кузнецов^{1,2}

Поступило 19.05.2020 г.
После доработки 29.05.2020 г.
Принято к публикации 30.05.2020 г.

Показано, что мелатонин поддерживает фотохимическую активность фотосистемы II (ФС II) в ходе старения листьев однодольных растений, замедляя деградацию основных фотосинтетических пигментов. Защитное действие мелатонина проявляется в сохранении максимальной квантовой эффективности (F_v/F_m) и эффективного ($\Phi(II)$) квантового выхода ФС II, в повышении регулируемой ($\Phi(NPQ)$) и понижении нерегулируемой диссипации энергии ($\Phi(NO)$). В основе указанных эффектов лежит способность мелатонина снижать интенсивность окислительного стресса за счет поддержания в ходе старения более высокого уровня каротиноидов, проявляющих выраженные антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: мелатонин, *Hordeum vulgare*, фотосинтетические пигменты, фотосистема II, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31857/S2686738920050091

Старение листьев — закономерный физиологический процесс, который регулируется онтогенетически и характеризуется разрушением клеточных структур и биомолекул и реутилизацией продуктов деградации другими органами растения [1]. Наиболее типичным признаком старения является пожелтение листьев, в основе которого лежит деструкция сложных пигментно-белковых комплексов, прежде всего, хлорофиллов. Другим важным критерием старения является фотохимическая активность фотосинтетического аппарата, которая оценивается на основании результатов измерений параметров флуоресценции хлорофилла. Несмотря на то, что старение контролируется генетически, инициировать этот процесс могут абиотические стрессоры и биопатогены. Эндогенными индукторами программы старения листа являются, прежде всего, активные формы кислорода (АФК), генерируемые хлоропластами и митохондриями, а также фитогормоны [1].

В регуляцию процесса старения листа вовлекаются несколько групп гормонов. Задерживают

старение листьев растений, прежде всего, цитокинины, а также ауксины и гиббереллины, тогда как ускоряют этот процесс этилен, абсцизовая, жасминовая и салициловая кислоты [1]. Среди соединений гормональной природы, особый интерес представляет мелатонин. В растениях мелатонин был идентифицирован только в 1996 г., однако активное изучение его биологической роли проводится лишь в течение последнего десятилетия [2]. В настоящее время мелатонин рассматривается как многофункциональная молекула, комбинирующая сигнальные свойства регулятора интегральных физиологических процессов со свойствами эффективного антистрессорного агента [2, 3]. Показана способность экзогенного мелатонина замедлять старение отсеченных листьев некоторых двудольных растений [4–6]. Данный эффект достигается за счет сохранения уровня фотосинтетических пигментов, повышения активности основных антиоксидантных ферментов и снижения генерации АФК.

При этом остается неясным, вовлекается ли поддержание мелатонином фотохимической активности фотосистемы II (ФС II) в задержку старения изолированных листьев однодольных растений. Ответ на данный вопрос особенно важен, поскольку именно хлоропласты являются центральной мишенью деградации во время старения листа, что предполагает нарушение фотосин-

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: nusy.l.d@gmail.com

тетической функции. При этом выяснение механизмов регуляции мелатонином старения листа однодольных растений имеет существенное значение для зерновых культур, поскольку известно, что вызванное неблагоприятными факторами среды преждевременное старение листьев оказывает негативное влияние на урожай.

Цель данной работы заключается в том, чтобы выяснить, сопровождается ли способность мелатонина замедлять старение изолированных листьев однодольных растений поддержанием фотохимической активности ассимилирующего аппарата.

Исследования проводили на растениях *Hordeum vulgare*, сорта Биом. Ячмень данного сорта характеризуется высокой продуктивностью и устойчивостью к полеганию и поражению головневыми заболеваниями. Растения выращивали в грунте с добавлением вермикулита в течение 5 суток при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в фитотроне с 16-ти часовым фотопериодом. Отсеченные (изолированные) листья ячменя помещали в чашки Петри с растворами мелатонина (0.1, 1 и 10 мкМ), синтетического цитокинина – 6-бензиламинопурина (БАП, 10 мкМ) или с дистиллированной водой (контроль). Цитокинин использовался в качестве положительного контроля, поскольку известно, что он способен задерживать старение изолированных листьев [1]. Экспозиция отсеченных листьев в темноте продолжалась в течение 7 дней. Измерение содержания фотосинтетических пигментов, оценку параметров фотохимической активности ФС II и фиксацию проб для определения уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили на первые, третьи, пятые и седьмые сутки после отсечения листьев.

Параметры фотохимической активности ФС II измеряли с помощью РАМ флуориметра (Junior-RAM, Heinz-Walz, Germany) так, как описано ранее [7]. Максимальный (F_v/F_m) и эффективный ($Y(II)$) квантовые выходы ФС II, коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции (qL и qP), квантовые выходы нерегулируемой ($Y(NO)$) и регулируемой ($Y(NPQ)$) диссипации энергии и некоторые другие характеристики рассчитывали с использованием программного обеспечения Junior-RAM. Содержание основных фотосинтетических пигментов измеряли согласно Лихтенгалеру [8], интенсивность ПОЛ оценивали спектрофотометрическим методом, основанным на образовании окрашенного комплекса – продукта малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании [9].

Эксперимент проводили в трех биологических повторностях. Количество листьев на биологический повтор каждой точки фиксации составляло 15 единиц. Полученные результаты представлены в таблице и на рисунке в виде средней арифмети-

ческой со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок использовали t -критерий Стьюдента при 95% уровне значимости.

Прежде чем изучать влияние мелатонина на фотохимическую активность ФС II, предстояло выяснить, задерживает ли данный гормон, подобно цитокинину, индуцированное темнотой старение изолированных листьев ячменя. В качестве одного из наиболее надежных критериев старения использовали динамику изменения содержания основных фотосинтетических пигментов. Фотосинтетические пигменты в значительной степени определяют функционирование ассимилирующего аппарата, а каротиноиды, помимо этого, защищают фотосинтетическую систему от действия АФК.

Как следует из полученных данных, инкубация отсеченных листьев на растворах цитокинина и мелатонина задерживала старение листьев ячменя (рис. 1), что проявлялось в снижении на 5 и 7 сутки интенсивности падения уровней пигментов в сравнении с контролем.

В ходе темновой инкубации изолированных листьев ячменя на воде (контрольный вариант) на третьи сутки наблюдалось падение содержания хлорофиллов a и b и каротиноидов в 3.2, 3.1 и 2.2 раза соответственно (рис. 2а, б, г). Их дальнейшая экспозиция (вплоть до 7-х суток) не приводила (за исключением хлорофилла a) к дополнительному снижению уровня пигментов. Соотношения суммы хлорофиллов к каротиноидам и хлорофилла a к хлорофиллу b несколько снижались на 3- и 5-е сутки соответственно (рис. 2д, е). При этом различия по содержанию фотосинтетических пигментов между листьями, инкубированными на растворах цитокинина и мелатонина, проявлялись только через 3 суток, тогда как на 7 сутки различия практически отсутствовали. Уровень анализируемых фотосинтетических пигментов был выше в листьях, находившихся на растворе цитокинина; мелатонин в самой низкой из используемых концентраций (0.1 мкМ) достоверно замедлял деградацию пигментов на третьи сутки опыта. На седьмые сутки эксперимента содержание хлорофилла a и каротиноидов в присутствии мелатонина превышало соответствующие контрольные значения в 1.5–2.0 и 1.4–1.8 раза. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что мелатонин, подобно цитокинину, замедляет процесс старения изолированных листьев ячменя. Аналогичный эффект применения экзогенного мелатонина (10 мкМ) был показан с отсечными листьями гардении и яблони, которые частично сохраняли зеленую окраску и повышенное содержание хлорофиллов относительно инкубированных на воде контрольных листьев [5, 6].

Для оценки защитного действия мелатонина на функционирование ассимиляционного аппа-

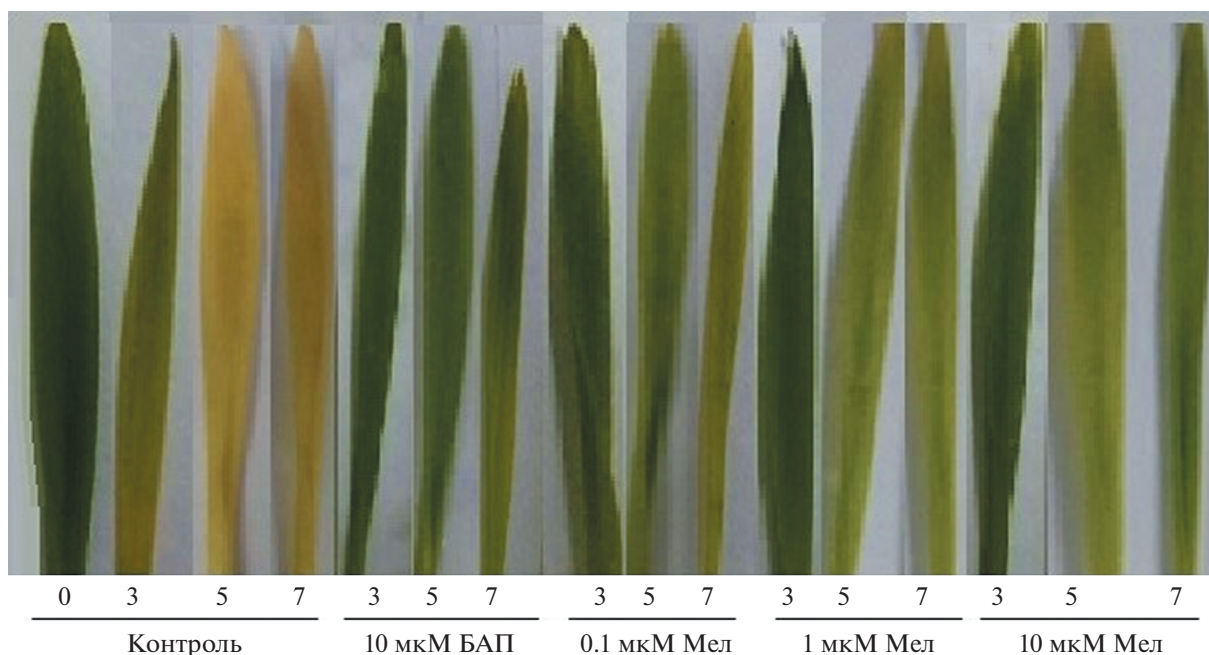


Рис. 1. Влияние мелатонина на старение изолированных листьев ячменя в условиях темноты. 0 — исходная точка, 3 — третьи, 5 — пятые и 7 — седьмые сутки инкубации.

рата в процессе старения изолированных листьев измеряли параметры фотохимической активности ФС II. Полученные данные свидетельствуют о том, что максимальная квантовая эффективность ФС II (F_v/F_m) интактных листьев ячменя составляла 0.79, что соответствует величинам F_v/F_m , характерным для растений, не подвергнутым стрессорным воздействиям (табл. 1). Через 3-е суток после отсечения листьев и экспозиции их в воде в отсутствие света, значение F_v/F_m снижалось до 0.69, на 7-е сутки — до 0.28, что говорит о серьезном нарушении функционирования фотосинтетического аппарата в ходе старения. Напротив, у листьев ячменя, инкубированных на растворах с гормонами, максимальная квантовая эффективность в течение всего эксперимента понижалась до значений 0.72 для БАП и 0.61 — для мелатонина, что свидетельствует о способности обоих гормонов поддерживать эффективность функционирования ФС II в стареющих листьях растений.

Величина эффективного квантового выхода ($Y(II)$) ФС II характеризует эффективность фотохимических реакций ФС II. Как видно из представленных данных, ($Y(II)$) ФС II листьев ячменя, инкубированных в воде в темноте, экспоненциально снижалась в течение всего эксперимента, достигая на седьмые сутки опыта значения 0.16, что в 4.4 раза ниже уровня этого параметра в интактных листьях. Падение значения $Y(II)$ на фоне уменьшения содержания хлорофиллов указывает на то, что в ходе индуцированного темнотой ста-

рения листьев нарушается поглощение энергии света и перенос электронов в ФС II. Экспозиция отсеченных листьев на растворе мелатонина на 7-е сутки обеспечивала 2-х кратное замедление падения эффективного квантового выхода по сравнению с контрольным вариантом. Подобный защитный эффект мелатонина был недавно отмечен на изолированных листьях двудольных растений [5, 6]. Косвенными показателями эффективности фотохимических реакций ФС II являются и коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции (qL) и (qP), которые свидетельствуют также и о доле открытых реакционных центров.

Параллельно со снижением эффективного квантового выхода на 7-е сутки эксперимента в 4.5 раза по сравнению с интактными листьями возрастал квантовый выход нерегулируемой диссипации энергии ($Y(NO)$) листьев ячменя, находившихся в дистиллированной воде. Мелатонин (1 и 10 мкМ) на 7 сутки эксперимента примерно в 2 раза замедлял рост нерегулируемой диссипации энергии, что также свидетельствует о защитном эффекте гормона на фотохимические процессы ФС II.

Одним из механизмов защиты фотосинтетического аппарата от повреждения при действии стрессоров является усиление регулируемой тепловой диссипации световой энергии ($Y(NPQ)$) ФС II [10]. Эффективность высоких концентраций (1 и 10 мкМ) мелатонина проявлялась на 7-е сутки инкубации, когда значения $Y(NPQ)$ значительно превышали контрольные параметры. Дан-

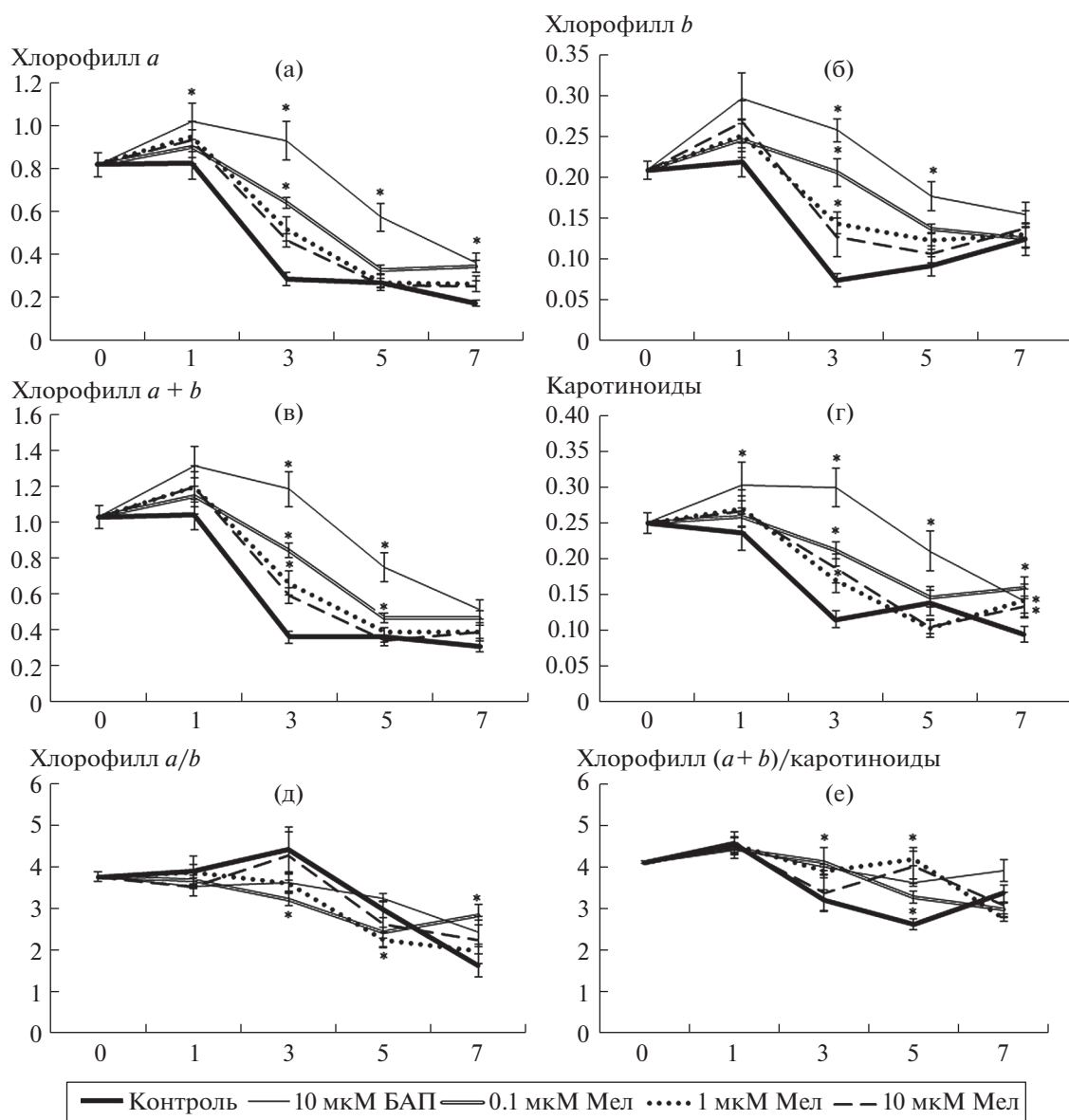


Рис. 2. Влияние мелатонина на содержание (мг/г сырой массы) (а–г) и соотношение (разы) (д, е) фотосинтетических пигментов в изолированных листьях ячменя в условиях темноты. Примечание. * $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением.

ную стратегию защиты ФС II от фотоповреждения можно считать весьма эффективной, о чем свидетельствует величина F_v/F_m для листьев растений ячменя, инкубированных в присутствии мелатонина, которая в конце эксперимента в 2.2 раза превышала значения F_v/F_m контрольного варианта.

Таким образом, нами впервые показано, что мелатонин оказывает выраженный протекторный эффект на фотохимическую активность фотосистемы II в ходе старения листьев однодольных растений, задерживая при этом деградацию основных фотосинтетических пигментов. Защитное действие мелатонина проявляется в повыше-

нии максимальной квантовой эффективности (F_v/F_m), эффективного ($Y(II)$) квантового выхода фотосистемы II, в повышении регулируемой ($Y(NPQ)$) и понижении нерегулируемой диссипации энергии ($Y(NO)$). В основе этого эффекта могут лежать антиоксидантные свойства мелатонина. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что на пятые сутки эксперимента содержание малонового диальдегида в отсеченных листьях ячменя в присутствии мелатонина было примерно в 1.5 раза ниже их содержания в контрольных листьях (данные не приведены). Тем более известно, что мелатонин оказывает выраженный протекторный эффект в

Таблица 1. Влияние мелатонина на фотохимическую активность фотосистемы II в изолированных листьях ячменя в условиях темноты

	F_v/F_m	$Y(II)$	qP	qL	$Y(NO)$	$Y(NPQ)$
Исходная точка	0.79 ± 0.01	0.71 ± 0.03	1.13 ± 0.02	1.10 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.12 ± 0.01
1 сутки						
Контроль	0.77 ± 0.01	0.67 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.03 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.13 ± 0.01
10 мкМ БАП	0.76 ± 0.01	0.60 ± 0.01	0.93 ± 0.02	0.83 ± 0.04	0.23 ± 0.01	0.17 ± 0.01
0.1 мкМ Мел	0.77 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.93 ± 0.03	0.84 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.01
1 мкМ Мел	0.76 ± 0.01	0.63 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.95 ± 0.05	0.21 ± 0.01	0.15 ± 0.01
10 мкМ Мел	0.76 ± 0.01	0.61 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.91 ± 0.06	0.22 ± 0.01	0.17 ± 0.03
3 сутки						
Контроль	0.69 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.84 ± 0.03	0.66 ± 0.06	0.37 ± 0.03	0.09 ± 0.03
10 мкМ БАП	0.77 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.86 ± 0.03	0.68 ± 0.06	$0.27 \pm 0.01^*$	0.15 ± 0.02
0.1 мкМ Мел	0.76 ± 0.01	$0.63 \pm 0.02^*$	0.93 ± 0.03	0.82 ± 0.07	$0.25 \pm 0.02^*$	0.12 ± 0.01
1 мкМ Мел	0.76 ± 0.01	$0.65 \pm 0.01^*$	$0.96 \pm 0.01^*$	$0.89 \pm 0.02^*$	$0.23 \pm 0.01^*$	0.12 ± 0.01
10 мкМ Мел	0.75 ± 0.01	$0.62 \pm 0.01^*$	0.89 ± 0.01	0.72 ± 0.02	$0.28 \pm 0.01^*$	0.10 ± 0.01
5 сутки						
Контроль	0.64 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.62 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.16 ± 0.04
10 мкМ БАП	0.72 ± 0.02	0.58 ± 0.04	0.87 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.32 ± 0.03	0.10 ± 0.02
0.1 мкМ Мел	0.71 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.87 ± 0.03	0.71 ± 0.07	0.33 ± 0.02	0.11 ± 0.02
1 мкМ Мел	0.73 ± 0.01	$0.63 \pm 0.01^*$	$0.92 \pm 0.01^*$	$0.78 \pm 0.04^*$	0.30 ± 0.01	$0.07 \pm 0.01^*$
10 мкМ Мел	0.71 ± 0.02	0.54 ± 0.03	0.85 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.14 ± 0.02
7 сутки						
Контроль	0.28 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.79 ± 0.06	0.73 ± 0.08	0.77 ± 0.03	0.07 ± 0.01
10 мкМ БАП	$0.72 \pm 0.01^*$	$0.47 \pm 0.02^*$	$0.68 \pm 0.03^*$	$0.41 \pm 0.04^*$	$0.46 \pm 0.02^*$	0.07 ± 0.01
0.1 мкМ Мел	$0.66 \pm 0.02^*$	$0.38 \pm 0.04^*$	$0.61 \pm 0.06^*$	$0.40 \pm 0.06^*$	$0.52 \pm 0.05^*$	0.10 ± 0.03
1 мкМ Мел	$0.61 \pm 0.04^*$	0.25 ± 0.05	$0.52 \pm 0.06^*$	$0.37 \pm 0.05^*$	$0.41 \pm 0.02^*$	$0.34 \pm 0.03^*$
10 мкМ Мел	$0.65 \pm 0.04^*$	$0.32 \pm 0.05^*$	$0.65 \pm 0.07^*$	$0.49 \pm 0.07^*$	$0.35 \pm 0.04^*$	$0.33 \pm 0.05^*$

Примечание. * $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением.

условиях стресса, выступая в качестве эффективного антиоксиданта [4, 11–13]. В этой связи важно отметить, что мелатонин может реализовать свои антиоксидантные свойства, достоверно задерживая снижение содержания каротиноидов в процессе старения листа. Как известно, каротиноиды входят в состав светособирающего комплекса, нейтрализуют синглетный кислород, подавляют образование свободных радикалов и выступают в качестве антиоксидантов, защищая метаболизм от АФК [14].

Полученные данные расширяют наши представления о защитном действии мелатонина в стрессовых условиях, что способствует разработке наиболее эффективных алгоритмов его применения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90051.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martin L.M., Mohammad-Reza H., Nestor C., et al. // Plants. 2019. V. 8. № 495. <https://doi.org/10.3390/plants8110495>
2. Arnao M.B., Marino B., Hernandez-Ruiz J. // Trends in Plant Science. 2019. V. 24. P. 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010>
3. Холодова В. П., Васильев С. В., Ефимова М. В. и др. // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 463–471. <https://doi.org/10.1134/s0015330318060088>
4. Liang D., Shen Y., Ni Z., et al. // Frontiers in Plant Science. 2018. V. 9. № 426. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00426>
5. Zhao D., Wang R., Meng J., et al. // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 10423. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10799-9>
6. Wang P., Yin L., Liang D., et al. // Journal Pineal Research. 2012. V. 53. P. 11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2011.00966.x>

7. Kolomeichuk L. V., Efimova M. V., Zlobin I. E., et al. // Photosynthesis Research. 2020. <https://doi.org/0.1007/s11120-020-00708-z>
8. Lichtenthaler H.K. // Methods Enzymology. 1987. V. 148. P. 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
9. Buege J.A., Aust S.D. // Methods Enzymology. 1978. V. 52. P. 302–310. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
10. Ruban A.V. // Plant physiology. 2016. V. 170. P. 1903–1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01935>
11. Johns J.R., Platts J.A. // Organic and Biomolecular Chemistry. 2014. V. 12. P. 7820–7827. <https://doi.org/10.1039/c4ob01396d>
12. Sharma A., Wang J., Xu D., et al. // Science of the total environment. 2020. V. 713. № 136675. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136675>
13. Bychkov I., Kudryakova N., Andreeva A., et al. // Plant physiology and biochemistry. 2019. V. 144. P. 402–412. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.013>
14. Luo F., Cheng S.C., Cai J.H., et al. // Food Chemistry. 2019. V. 297. № 124964. <https://doi.org/j.foodchem.2019.124964>

MELATONIN SUPPORTS PHOTOCHEMICAL ACTIVITY OF ASSIMILATION APPARATUS AND DELAYS SENESCENCE OF LEAVES OF MONOCOTYLEDONOUS PLANTS

E. D. Danilova^{a, #}, M. V. Efimova^a,
L. V. Kolomeichuk^a, and Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov^{a, b}

^a Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

^b Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#] e-mail: nusy.l.d@gmail.com

Melatonin supports the photochemical activity of photosystem II (PS II) and slows down the main photosynthetic pigments degradation during aging of the leaves of monocotyledonous plants. The protective effect of melatonin is manifested in an increase in the maximum (F_v/F_m) and effective ($Y(II)$) quantum yield of PS II, in an increase regulated ($Y(NPQ)$) and a decrease unregulated dissipation of excitation energy ($Y(NO)$). These effects are based on the ability of melatonin to reduce the intensity of oxidative stress while maintaining a high level of carotenoids, which exhibit pronounced antioxidant properties.

Keywords: melatonin, *Hordeum vulgare*, photosynthetic pigments, photosystem II, lipid peroxidation