

ФОТОСИНТЕЗ И СКОРОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА В РАСТЕНИЯХ ОЗИМОГО РАПСА, ОБРАБОТАННЫХ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

© 2019 г. Н. Г. Аверина^а, *, А. В. Емельянова^а, Р. А. Щербаков^а,
Н. В. Козел^а, Л. В. Обуховская^б, А. В. Усатов^с

^аИнститут биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

^бИнститут экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

^сЮжный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

*e-mail: averina_ng@tut.by; averina@ibp.org.by

Поступила в редакцию 28.09.2018 г.

После доработки 29.01.2019 г.

Принята к публикации 11.02.2019 г.

Изучено влияние экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в концентрации 200 мг/л на фотосинтез и структурную организацию фотосинтетического аппарата, скорость поглощения кислорода тканью, содержание ключевых дыхательных ферментов – цитохром с-оксидазы (ЦО) и альтернативной оксидазы (АОХ), а также активность ЦО в растениях озимого рапса (*Brassica napus* L.). Выявлено, что в 4–7-дневных растениях, выращенных на растворе АЛК, происходит накопление фенолов, а также их производных антоцианов, состав которых не отличается от состава антоцианов в контрольных растениях. В растениях варианта “АЛК” наблюдается ингибирование фотосинтеза путем снижения способности к формированию структурных компонентов фотосинтетического аппарата – пигмент-белковых комплексов (ПБК) фотосистем I и II. В таких растениях отмечено возращание интенсивности поглощения кислорода тканью в условиях затемнения, а также увеличение активности терминальной ЦО цитохромной части дыхательного пути и содержания другого терминального дыхательного фермента – АОХ, индукция которого, как правило, наблюдается в условиях стресса, в том числе окислительного.

Ключевые слова: *Brassica napus*, 5-аминолевулиновая кислота, хлорофилл, каротиноиды, 5-аминолевулинатдегидратаза, порфобилиногеназа, фотосинтез, белки ФС I и ФС II, скорость поглощения кислорода тканью, цитохром с-оксидаза, альтернативная оксидаза

DOI: 10.1134/S0015330319060034

ВВЕДЕНИЕ

Антоцианы относятся к наиболее распространенной и многочисленной группе фенольных соединений – флавоноидам [1]. Это нефотосинтетические пигменты, которые накапливаются в вакуолях, а также встречаются в кристаллическом виде в некоторых видах растений. Антоциановые пигменты являются наиболее универсальными из всех пигментов и обладают огромным разнообразием функций, многие из которых в первую очередь связаны с ответами растений на стрессовые воздействия [2]. Показано, что антоцианы во многих видах растений уменьшают степень фотоингибирования, а также ускоряют восстановле-

ние фотосинтетического аппарата растений [3]. При высокой освещенности антоцианы действуют как оптический фильтр, защищая уже насыщенную электрон-транспортную цепь от избыточных квантов света с высокой энергией. Они снижают накопление супероксид анион-радикалов, тем самым ослабляя структурные повреждения клеточных мембран [4]. Показано, что очищенные растворы антоцианов удаляют практически все виды активных форм кислорода и азота с эффективностью в четыре раза большей, чем аскорбат и α -токоферол [5]. Антоциановые пигменты в ходе ацилирования активно поглощают излучение в УФ-области, защищая растения (в частности, генетический аппарат) от губительного воздействия УФ лучей [6].

Антоцианы важны и для человека. Они активно используются в фармакологической, косметической и пищевой промышленности в качестве на-

Сокращения: АЛК – 5-аминолевулиновая кислота; АЛКД – АЛК-дегидратаза; ЦО – цитохром с-оксидаза; АОХ – альтернативная оксидаза; ФС – фотосистемы; ПБК – пигмент-белковые комплексы ФС I и ФС II; ПБГ – порфобилиноген; УПГ III – уропорфириноген III.

туральных красителей и биологически активных соединений, обладающих окислительно-восстановительными, антиоксидантными, противовоспалительными и нейропротекторными свойствами.

В настоящее время проводится множество исследований по поиску новых, дешевых и доступных источников антоцианов, а также соединений, стимулирующих их синтез. Существует ряд публикаций о стимуляции накопления антоцианов под действием 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в кожуре яблок [7–9] и в листьях голосеменного реликтового растения Гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba*) [10, 11]. АЛК – первичный предшественник в биосинтезе всех циклических (хлорофиллы, гемы, корриноиды) и линейных (билины, фикобилины) тетрапирролов – является уникальной природной молекулой, проявляющейся в растениях различные функциональные свойства [12]. В низких и средних концентрациях (до 100 мг/л в зависимости от способа обработки) АЛК оказывает стимулирующее действие на рост и урожайность ряда овощных и зерновых культур, что явилось основанием для создания на ее основе ряда коммерческих препаратов, использование которых оказалось эффективным приемом повышения урожайности сельскохозяйственных культур [12]. В условиях стрессовых воздействий, таких как засоление почв, нарушение режима оводненности, низкие температуры и освещенность, повышенное содержание нитратов, сульфатов, использование гербицидов и др., обработка АЛК способствует повышению устойчивости растений к этим стрессорам, что делает ее использование перспективной стратегией при борьбе с различными типами стрессов [12, 13].

Нами было показано, что при выращивании растений озимого рапса (*Brassica napus* L.) на растворах АЛК в концентрациях 50–300 мг/л в семядольных листьях, а также в гипокотылях накапливались существенные количества антоцианов, что обеспечивалось практически двукратным возрастанием активности дигидрофлавонол-4-редуктазы – ключевого фермента биосинтеза этих пигментов [14]. В растениях озимого рапса, обработанных АЛК, нами также было отмечено ингибирование накопления фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и каротиноидов, повышение содержания гема, пролина, возрастание антиоксидантной и антирадикальной активностей, а также активности супероксиддисмутазы [14]. До сих пор, однако, остается невыясненным вопрос о качественном составе антоцианов в растениях, выращенных на растворах АЛК, по сравнению с контрольными образцами. Использование растений озимого рапса в качестве перспективной модельной системы, обогащенной с помощью АЛК антоцианами, предполагает всестороннее изучение всего комплекса метаболических перестроек в этом объек-

те на биохимическом, биофизическом и генетическом уровнях.

В этой связи представляло значительный интерес оценить влияние АЛК на общее содержание вторичных соединений класса фенолов, а также качественный состав антоцианов, понять природу дефицита хлорофилла в условиях обработки растений озимого рапса его предшественником – АЛК, определить фотосинтетическую активность, способность растений поглощать кислород, а также сконцентрировать внимание на основных участниках этих двух процессов – компонентах пигмент-белковых комплексов двух фотосистем и активности терминальных дыхательных ферментов – цитохром с-оксидазы (ЦО) и альтернативной оксидазы (АОХ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание растений. Семена озимого рапса (*Brassica napus* L., сорт Зорны) выращивали до 4–7-дневного возраста под белыми люминесцентными лампами Philips TD-36/765 (40.5 и 66.2 мкмоль фотонов/(м² с)) при 26°C в режиме 14 ч света/10 ч темноты на воде (контроль), а также на растворе АЛК 200 мг/л. При отборе проб использовали семядольные листья.

Определение содержания фенолов. Количество фенольных соединений определяли с помощью метода Фолина и Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси [15]. Навеску растительного материала (0.2 г) растирали в 1.5 мл дистиллированной воды и инкубировали в течение 10 мин при температуре 90°C с использованием термошейкера, после чего центрифугировали гомогенат при 17000 g в течение 5 мин на центрифуге Heraeus Pico 17 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Супернатант переносили в мерные пробирки, осадок ресуспендировали в 0.5 мл горячей дистиллированной воды и вновь центрифугировали. Супернатанты объединяли, уравнивали объем во всех вариантах и к 125 мкл супернатанта приливали 750 мкл воды и 67.5 мкл реактива Фолина (AppliChem, Германия). Через 3 мин приливали 125 мкл насыщенного раствора Na₂CO₃ и 187.5 мкл воды и инкубировали в течение 1 ч, после чего измеряли оптическую плотность при 750 нм на спектрофотометре Solar PV 2201 (Беларусь). Содержание фенольных соединений рассчитывали в эквиваленте галловой кислоты по калибровочной кривой, построенной с использованием галловой кислоты производства AppliChem известной концентрации.

Определение антоцианов с помощью ВЭЖХ. В работе использовали жидкостной хроматограф высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C-18 Prominence (250 мм × 3; 5 мкм, фирмы

Macherey-Nagel, Германия). Процедуру осуществляли как описано в работе Le с соавт. [16]. Навеску 200 мг растительного материала экстрагировали 1 мл (1 : 1, v : v) смеси 50 мМ H_3PO_4 : 50% этанол. Экстракт центрифугировали при 12000 g 10 мин на микроцентрифуге Scanspeed (Дания), отбирали супернатант, а осадок повторно обрабатывали, как описано выше, с последующим центрифугированием и объединением супернатантов для анализа антоцианов. Мобильная фаза представляла собой 1% уксусную кислоту (раствор А) и ацетонитрил (раствор Б) со следующим градиентом: 0–8% Б от 0 до 5 мин, 8–45% Б от 5 до 40 мин и 45–0% Б от 40 до 45 мин. Скорость потока 0.5 мл/мин, температура колонки 25°C, объем инъекции – 40 мкл. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при 520 нм с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония).

Определение активности фотосинтеза и скорости поглощения кислорода с помощью компьютеризированной измерительной системы PlantVital® 5030. Половинку семядольного листа озимого рапса помещали в камеру прибора PlantVital® 5030 (Германия) на электрод – кислородный сенсор (Sensortech Meinsberg, Германия). Измерения проводили в течение 10–15 мин сначала в темноте, регистрируя скорость потребления кислорода, затем при освещении камеры, измеряя активность фотосинтеза по скорости выделения кислорода [17]. Регистрируемое прибором соотношение между скоростями выделения и поглощения кислорода показывает эффективность фотосинтеза по отношению к протекающим с участием кислорода реакциям окисления органического вещества. Для каждого варианта использовали 6 физиологических повторностей. Скорости потребления и выделения кислорода оценивали в мкмоль O_2 /(мг с), учитывая при этом сырую массу исходной навески.

Вестерн-блот-анализ содержания белковых компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистем I и II. Экстракцию из растений озимого рапса белков и их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг выполняли, как описано в работе Jansson с соавт. [18]. Навеску 0.2 г растительной ткани растирали в 1 мл буфера, содержащего 56 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 56 мМ Na_2CO_3 , 12% сахарозу, 2 мМ этилендиаминтетраацетат, 2% SDS-Na. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин. Надосадочную фракцию собирали и хранили при –20°C. После разделения белков с помощью денатурирующего гель-электрофореза, осуществляли электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану “Hybond-C pure” (Amersham, США) с порами 0.45 мкм. Иммуноде-

текцию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили с помощью антител на белок D1 реакционного центра ФС II, а также на белки светособирающих комплексов (ССК) ФС I: Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4 и ССК ФС II: Lhcb1, Lhcb2, Lhcb4, Lhcb5 и Lhcb6.

Определение активности ЦО. Активность ЦО оценивали согласно методам, описанным в работах Edmands и Burton, а также Ермакова с соавт. [19, 20] с нашими модификациями. Навеску 0.3 г растительного материала экстрагировали на холоду в 1.5 мл 0.1 М К,Na-фосфатного буфера, содержащего 0.1% Тритон X-100. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 12000 g на центрифуге с охлаждением (+4°C) Sigma 1-15K (Германия). Полученный супернатант использовали для анализа. Активность фермента определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности раствора при 550 нм в ходе окисления восстановленного цитохрома с с помощью спектрофотометра Uvikon 931 (Германия). Активность ЦО рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции 29.5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Определение содержания субъединицы СОХIIb ЦО и АОХ. Выделение митохондрий из проростков осуществляли с помощью дифференциального центрифугирования согласно методике, описанной в работе Боровик с соавт. [21]. Навеску 0.5 г растительного материала растирали на холоду в 1.5 мл буфера для выделения (рН 7.4), содержащего 300 мМ сахарозу, 40 мМ MOPS, 5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 0.05% цистеин и 0.1% БСА. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали 10 мин при 1100 g, после чего супернатант центрифугировали еще 10 мин при 15000 g. Осадок, содержащий митохондрии, растворяли в буфере Лэммли, содержащем 10% SDS, 20% глицин, 1 М Трис-HCl (рН 6.8), 0.02% бромфенол синий и 0.1 М ДТТ и подвергали в течение 5 мин действию ультразвука на установке УЗДН-А (Россия), после чего нагревали 3 мин при 90°C. Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг выполняли, как описано в работе Jansson с соавт. [18]. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Супернатант отбирали и хранили при –20°C. После разделения белков с помощью денатурирующего гель-электрофореза осуществляли электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану “Hybond-C pure” с порами 0.45 мкм. Иммунодетекцию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили с помощью антител на белок альтернативной оксидазы АОХ1/2, а также на субъединицу ЦО СОХIIb.

Определение содержания хлорофиллов и каротиноидов с помощью ВЭЖХ. Состав и содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в образцах определяли с помощью хроматографа высокого

давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). Выделение, разделение и идентификацию пигментов проводили согласно методике, описанной в работе Fornі с соавт. [22]. Экстракцию пигментов из растений осуществляли с помощью щелочного ацетона (100% ацетон + 0.4% NH_4OH в соотношении 9 : 1). Гомогенат центрифугировали 5 мин при 17000 g на центрифуге Heraeus Pico 17, супернатант переносили в мерные пробирки, а осадок промывали щелочным ацетоном. Процедуру отмывки повторяли до полного извлечения пигментов. Разделение пигментов на колонке проводили с использованием растворов А (90% ацетонитрил, 9.9% H_2O , 0.1% триэтиламин) и Б (100% этилацетат) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Пигменты регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A в диапазоне 200–800 нм. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при 440 нм. Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы.

Определение активности 5-аминолевулинатдегидратазы (АЛКД) и порфобилиногеназы (комплекса порфобилиногендеаминазы и уропорфириноген III-синтетазы). Активность АЛКД и порфобилиногеназы определяли, как описано в работе [23]. Навеску 0.5 г растительного материала растирали в охлажденных ступках в 1.5 мл 0.1 М Трис-НСІ буфера (рН 8.2), содержащего 0.2 М $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, а также 0.05 М ДТТ. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань. Из полученного ферментного препарата отбирали 0.5 мл и добавляли в инкубационную среду, содержащую 2 мл 0.1 М Трис-НСІ буфера (рН 8.2), 0.2 мл 0.2 М MgCl_2 , 0.2 мл 0.05 М ДТТ, 0.5 мл 1% раствора АЛК, 0.6 мл H_2O . Полученные пробы инкубировали 2 ч при 37°C. Контролем служили пробы, содержащие все вышеперечисленные компоненты, включая 0.5 мл H_2O вместо АЛК. Реакцию останавливали, добавляя 0.8 мл смеси 3 М трихлоруксусной кислоты: 0.2 М MgCl_2 (1 : 1, v/v). Затем пробы центрифугировали 10 мин при 6000 g. В осадке определяли содержание белков, а в супернатанте – порфобилиноген (ПБГ), являющийся продуктом деятельности АЛКД, и уропорфириноген III (УПГ III) – продукт деятельности порфобилиногендеаминазы и УПГ III-синтетазы. Для определения ПБГ к 2 мл супернатанта добавляли 2 мл модифицированного реагента Эрлиха и определяли оптическую плотность раствора при 553 нм. Использовали молярный коэффициент экстинкции 6.2×10^4 (М см)⁻¹. Далее определяли количество ПБГ, превратившегося в УПГ III под действием порфобилиногеназы, учитывая, что

на образование 1 молекулы УПГ III расходуется 4 молекулы ПБГ. Для определения количества УПГ III к 2 мл супернатанта добавляли 2 мл 5 н раствора НСІ и через 10 мин регистрировали оптическую плотность при 406 нм на спектрофотометре Solar PB 2201 (Беларусь). Использовали молярный коэффициент экстинкции 53×10^4 (М см)⁻¹.

В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США) и AppliChem (Германия), а также в некоторых случаях реактивы аналитической чистоты других производителей. Все антители, использованные в работе, были произведены фирмой Agrisera (Швеция).

Статистическая обработка данных. Приведены средние значения из 3–5 экспериментов и их стандартные ошибки. Различия по сравнению с контролем считали достоверными при уровне значимости $P \leq 0.05$. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ “Excel 2016”, “SigmaPlot 12.0” и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание фенолов и сравнительный анализ состава антоцианов

Было изучено общее содержание вторичных соединений класса фенолов в листовой ткани растений озимого рапса, как еще одной характеристики перспективной модельной системы с высоким содержанием антоцианов. В семядольных листьях 7-дневных растений озимого рапса, выращиваемых при освещенности 40.5 мкмоль фотонов/(м² с) на растворах АЛК в концентрациях 50, 100, 150 и 200 мг/л, отмечена дозозависимая стимуляция накопления фенолов по сравнению с контрольными растениями, не обработанными АЛК. Так стимуляция составила 17, 10, 24 и 45% по отношению к контролю соответственно. Ранее мы отметили, что такие растения обогащены относящимися к классу полифенолов флавоноидами – антоцианами [14], что визуально проявлялось в розово-фиолетовой окраске листьев по сравнению с зеленой окраской контрольных растений, выращенных на воде. В работах, отметивших аналогичное стимулирующее действие экзогенной АЛК, не проводили качественного анализа антоцианов в контрольных и опытных образцах [7, 8, 10, 11, 24], что, несомненно, представляет научный интерес. С использованием ВЭЖХ был проведен сравнительный качественный анализ антоцианов, основанный на оценке количества пиков и параметров удерживания индивидуальных компонентов антоцианов на хроматограммах контрольных растений и растений, выращенных на экзогенной АЛК 200 мг/л при освещенности 66.2 мкмоль фотонов/(м² с). На седьмой день раз-

вития содержание антоцианов в опытных вариантах превышало их содержание в контроле в среднем в 5.6 раза. В профилях элюции экстрактов контрольных и опытных растений было выявлено 7 полос, принадлежащих антоцианам (рис. 1, представлен вариант “АЛК”). Время удерживания веществ в опыте и контроле различалось лишь в сотом и тысячном знаках (таблица 1). Были отмечены лишь количественные различия – по высоте пиков и площади, занимаемой каждой полосой. Так, в одном из экспериментов полосы антоцианов варианта “АЛК” по занимаемой площади, пропорциональной концентрации вещества, превышали аналогичные в контроле в среднем в 6.4 раза.

Активность АЛКД и комплекса порфобилиногендеаминазы и уропорфириноген III-синтетазы (порфобилиногеназы)

Ранее нами было отмечено, что в растениях озимого рапса, выращенных на растворе экзогенной АЛК 200 мг/л и накопивших существенные количества антоцианов, значительно подавлено накопление хлорофиллов *a* и *b* [14]. Поскольку АЛК является предшественником хлорофилла в биосинтезе, одной из причин дефицита последнего могла быть ограниченная способность экзогенного субстрата превращаться в хлорофилл из-за субстратного ингибирования АЛК-дегидратазы, фермента, участвующего в конденсации двух молекул АЛК с образованием пиррола ПБГ [12]. На рисунке 2 представлены результаты анализа активности АЛКД, рассчитанной по количеству зарегистрированного ПБГ и той его части, которая превратилась под действием порфобилиногеназы в УПГ III [23]. В экспериментах использовали 4–5-дневные растения, окрашенные в варианте АЛК в розово-фиолетовый цвет, с низким содержанием хлорофилла (в среднем 60% от контроля). В опытных растениях чрезвычайно низкой оказалась активность порфобилиногеназы – скорость образования УПГ III составила

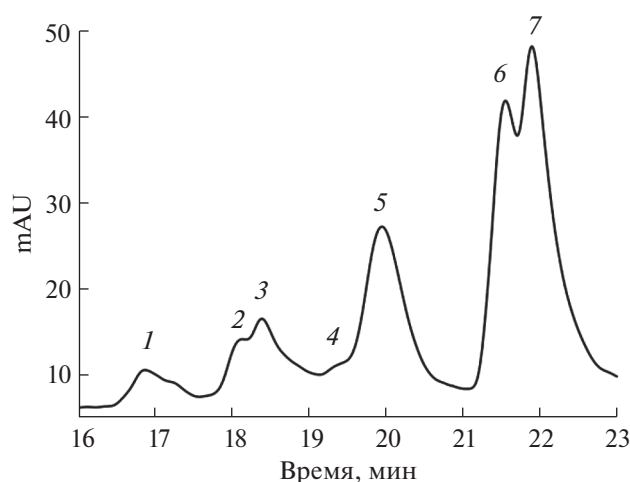


Рис. 1. Профиль элюции антоцианов, выделенных из семядольных листьев растений озимого рапса, выращенных на растворе АЛК 200 мг/л. Номера пиков соответствуют данным, представленным в таблице 1.

лишь 26.7% от таковой в контрольных растениях. Общее количество ПБГ, образованного АЛКД (с учетом УПГ III), также оказалось ниже в варианте “АЛК” – 58% от контроля.

К 7-дневному возрасту по мере накопления хлорофилла и снижения разницы в его содержании между вариантами (в среднем разница составляла 20%) ингибирование активности порфобилиногеназы и АЛКД под действием экзогенной АЛК уменьшалось. Так активность порфобилиногеназы в опытных растениях составила 46%, АЛКД – 86% от контроля.

Состав и содержание каротиноидов

Наряду с торможением накопления хлорофилла в листьях растений озимого рапса, выросших на растворе экзогенной АЛК, в них было отмечено и значительное снижение скорости накопления каротиноидов [14]. Поскольку АЛК в высоких кон-

Таблица 1. Хроматографические характеристики антоцианов, выделенных из 7-дневных растений озимого рапса

№ пика	Контроль			АЛК, 200 мг/л		
	<i>t</i> [*] , мин	<i>h</i> ^{**}	<i>S</i> ^{***}	<i>t</i> , мин	<i>h</i>	<i>S</i>
1	16.898	1675	78065	16.868	5389	257908
2	18.120	3112	69184	18.128	8917	189465
3	18.394	3770	145893	18.386	11280	433921
4	19.376	2021	43042	19.488	6374	121031
5	19.958	6094	279640	19.948	21921	970309
6	21.584	13161	301360	21.553	36458	814125
7	21.898	12956	492392	21.896	42729	1584628

Примечание. * *t* – время удержания; ** *h* – высота пиков; *** *S* – площадь пиков.

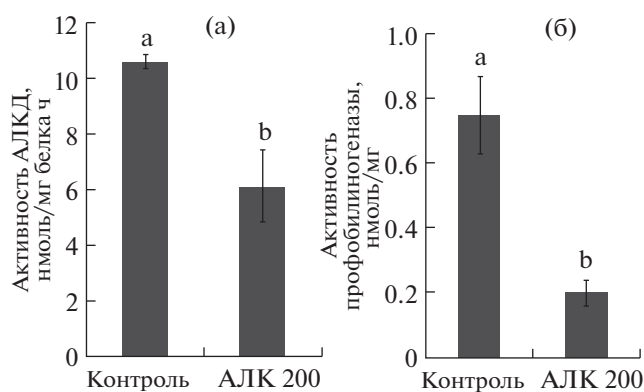


Рис. 2. Активность АЛКД (а) и порфобилиногеназы (б) в семядольных листьях 4–5-дневных растений озимого рапса, выращенных на воде (контроль) или на растворе экзогенной АЛК 200 мг/л. Достоверные различия при $P \leq 0.05$ отмечены разными латинскими буквами (а–б).

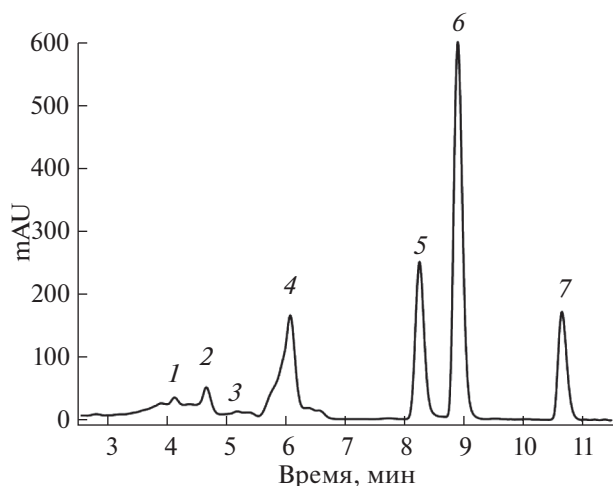


Рис. 3. Профиль элюции хлорофилла и каротиноидов, выделенных из семядольных листьев растений озимого рапса, выращенных на растворе АЛК 200 мг/л. 1 – неоксантин, 2 – виолаксантин, 3 – антраксантин, 4 – лютеин, 5 – хлорофилл *b*, 6 – хлорофилл *a*, 7 – β -каротин.

центрациях обладает свойствами фотодинамического гербицида и, усиливая фотодеструкционные процессы, может влиять на качественный состав каротиноидов, в частности, на пигменты ксантофиллового цикла, был осуществлен сравнительный анализ состава и содержания каротиноидов в контрольных и обработанных АЛК розово-фиолетовых (4–5-дневные растения) листьях рапса с помощью метода ВЭЖХ. Качественный состав пигментов в экстрактах контрольных и опытных растений оказался идентичным – обнаружены кислород-содержащие ксантофиллы: неоксантин, виолаксантин, антраксантин, лютеин и бес-

кислородный каротиноид β -каротин (рис. 3). Содержание вышеперечисленных пигментов в варианте “АЛК” составило 30, 37, 42, 35 и 33% от контроля соответственно (в среднем 35%). Оцененное методом ВЭЖХ содержание хлорофилла в этих же опытах дало следующие показатели: для хлорофилла *a* – 34% и для хлорофилла *b* – 33% от контроля, соотношение между хлорофиллами *a* и *b* составило 2.3 для контрольных растений и 2.4 для растений варианта “АЛК”.

Содержание апобелков пигмент-белковых комплексов (ПБК) фотосистем I и II

Поскольку хлорофилл является непосредственным участником фотосинтеза, далее был изучен белковый состав хлорофилл-белковых комплексов фотосинтетического аппарата, а также активность самого процесса. Опыты по определению содержания белков ПБК фотосинтетического аппарата в проростках озимого рапса показали, что обработка экзогенной АЛК снижала содержание белка D1 реакционного центра ФС II, что составляло 48% от контроля. Также отмечено снижение содержания белков светособирающих комплексов ФС I: Lhca1 – 73%, Lhca2 – 51%, Lhca3 – 56%, Lhca4 – 65% и ФС II: Lhcb1 – 27%, Lhcb2 – 33%, Lhcb4 – 47%, Lhcb5 – 70% и Lhcb6 – 59% по сравнению с их содержанием в растениях, выращенных на воде (рис. 4).

Активность фотосинтеза и поглощения кислорода

Отмеченные выше структурные изменения состава фотосинтетических мембран в растениях, обработанных экзогенной АЛК, сказались и на фотосинтетической активности. В розово-фиолетовых листьях 4–5-дневных растений с уровнем хлорофилла около 20% скорость фотосинтеза составляла 18% по сравнению с контролем (рис. 5а). В семядольных листьях 7-дневных растений варианта “АЛК” с содержанием хлорофилла в среднем 80% от контроля скорость выделения кислорода значительно возросла по сравнению с 4–5-дневными растениями, достигая уровня 78% от контроля, и составляла 0.0064 ± 0.0007 мкмоль O_2 /(мг с) (рис. 5в).

Вместе с тем обработка экзогенной АЛК оказала существенное стимулирующее влияние на потребление кислорода в затемненных семядольных листьях. На всех стадиях развития (4–7 дней) скорость потребления кислорода в темноте в опытных растениях возросла примерно в 2 раза по сравнению с таковой в контрольных растениях (рис. 5б, г).

Коэффициент фотосинтетической эффективности (скорость выделения кислорода/скорость

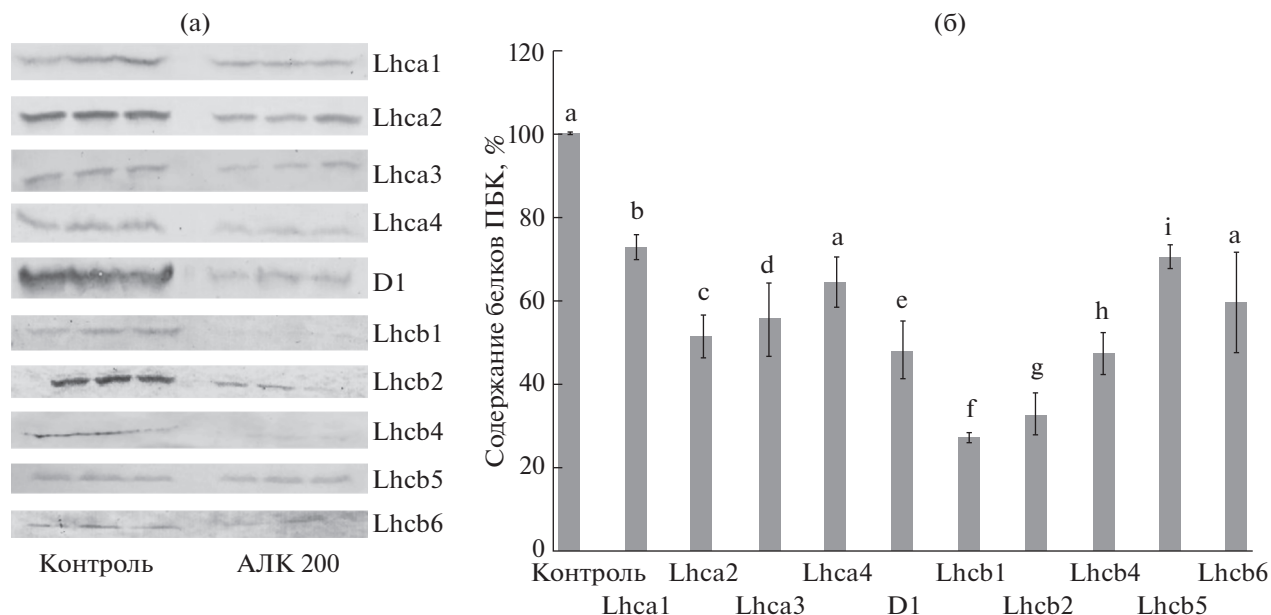


Рис. 4. Вестерн-блот-анализ белков: D1, Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4, а также Lhcb1, Lhcb2, Lhcb4, Lhcb5 и Lhcb6, входящих в состав ПБК фотосинтетического аппарата растений озимого рапса, выращенных на воде или растворе АЛК 200 мг/л (а), а также их количественная оценка (б). Линия на рисунке (б) соответствует 100% содержания белков в контроле. Достоверные различия при $P \leq 0.05$ отмечены разными латинскими буквами (а–i).

поглощения кислорода) оказался в среднем на 44% ниже в 7-дневных растениях варианта “АЛК”.

Активность и содержание субъединицы СОХIIb ЦО

Основными компонентами электронтранспортной дыхательной цепи, генерирующей АТФ в митохондриях, являются 8 гем-содержащих цитохромов, из которых наиболее значимым является терминальная ЦО, переносящая электрон от цитохрома *c* на кислород с образованием воды. На рисунке 6а представлена активность фермента, которая в растениях варианта “АЛК” составила 15.2 ± 3 нмоль/(мкг белка мин), что в 5 раз больше, чем в контрольных растениях, выращенных на воде. Такую же картину наблюдали при использовании вестерн-блот-анализа для оценки содержания субъединицы ЦО (СОХIIb), участвующей в образовании каталитического центра ферментного комплекса (рис. 6б, в). Как и в случае активности ЦО, содержание субъединицы СОХIIb фермента в опытных растениях в 5 раз превышало таковое в контроле.

Содержание АОХ

В условиях действия стрессовых биотических и абиотических факторов значительную роль в функционировании дыхательной электронтранспортной цепи митохондрий начинает играть терминальная АОХ, содержащая в активном центре

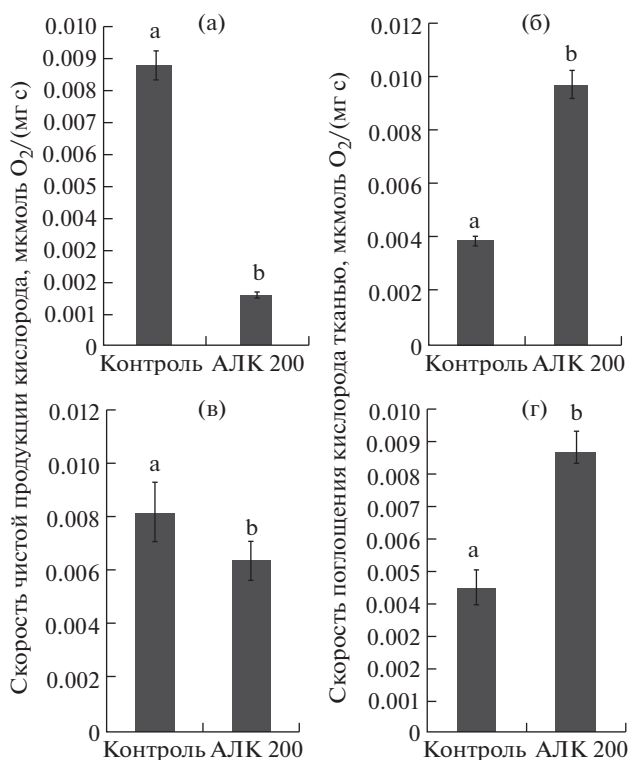


Рис. 5. Фотосинтетическая активность (а, в) и скорость поглощения кислорода листовой тканью (б, г) в 4–5-дневных (а, б) и в 7-дневных (в, г) семядольных листьях растений озимого рапса, выращенных на воде или на растворе АЛК 200 мг/л. Достоверные различия при $P \leq 0.05$ отмечены разными латинскими буквами (а–б).

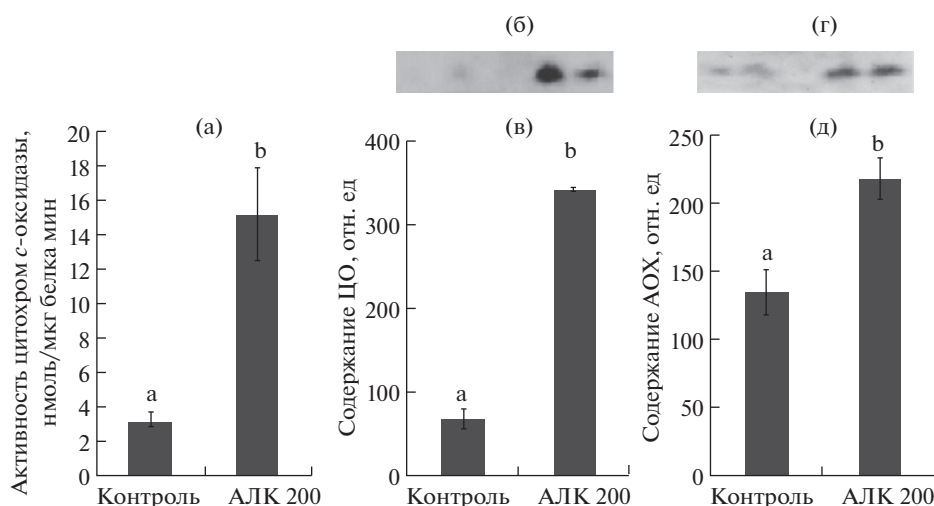


Рис. 6. Активность (а) и содержание (б, в) субъединицы СОХII ЦО, а также содержание АОХ (г, д) в 7-дневных семядольных листьях растений озимого рапса, выращенных на воде или на растворе АЛК 200 мг/л. Достоверные различия при $P \leq 0.05$ отмечены разными латинскими буквами (а–б).

2 атома негеминового Fe и катализирующая четырехэлектронное окисление восстановленного убихинона (убихинола) кислородом без образования АТФ. На рисунках бг и бд представлено содержание белка АОХ в 7-дневных контрольных и опытных растениях. Обработка АЛК в 1.6 раза увеличила содержание фермента в семядольных листьях по сравнению с контрольными образцами.

ОБСУЖДЕНИЕ

АЛК относится к экологически чистым естественным метаболитам растений, обладающим в низких концентрациях свойствами регулятора роста растений и антистрессора [12]. Исследование механизмов росторегулирующей и антистрессовой активности низких концентраций АЛК показало значительное возрастание в обработанных растениях уровня эндогенных цитокининов, стабилизацию белкового метаболизма, усиление ассимиляции неорганического азота за счет активации экспрессии гена нитратредуктазы и возрастание активности фермента [13], увеличение содержания универсального стресс-протектора пролина, снижение уровня активных форм кислорода и возрастание активности защитных ферментов [12].

В высоких концентрациях (200–400 мг/л и выше) АЛК проявляет свойства фотодинамического гербицида (ФДГ), вызывая повышенное накопление порфиринов (уропорфирин(оген)а III, копропорфирин(оген)а III, протопорфирина IX, Mg-протопорфирина IX и протохлорофиллида) — предшественников хлорофилла и гема в биосинтезе, которые, являясь фотосенсибилизаторами, генерируют образование активных форм кислорода, которые запускают фотодинамические про-

цессы, приводящие к разрушению растительных клеток. Теоретически АЛК является идеальным экологически чистым и безопасным для человека и животных ФДГ и должна действовать неселективно, поскольку система биосинтеза хлорофилла и гема присуща всем растениям. Однако однодольные и двудольные организмы показывают весьма широкий спектр различных ответных реакций на действие гербицидных концентраций АЛК [12]. Механизмы, используемые разными растениями для выживания в условиях фотодинамических процессов, генерируемых АЛК, мало изучены. В частности, показано, что уровень накопления порфиринов-фотосенсибилизаторов играет определяющую роль в чувствительности растений к АЛК и препаратам на ее основе. Например, низкая чувствительность однодольных организмов, в частности, злаков к АЛК, как фотогербициду, обеспечивается низкой способностью превращения АЛК (в среднем 20%) в порфирины-фотосенсибилизаторы [12]. У большинства чувствительных к этому ФДГ двудольных организмов, которые практически полностью погибают из-за развития фотоокислительных процессов (огурцы, мокрица, люпин), степень превращения АЛК в порфирины составляет в среднем 70%, а уровень накопления порфиринов на порядок превышает таковой у злаков [12].

Еще одним механизмом, функционирующим у ряда двудольных организмов, которые не демонстрируют фотодинамического обесцвечивания и повреждения тканей при использовании высоких концентраций экзогенной АЛК, является индуцированное действием АЛК накопление больших количеств вторичных метаболитов, таких как фенолы, флавоноиды и их производные антоцианы,

которые, как известно, обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [7, 8, 10, 11]. Функционирование этого механизма отмечается не только в листовой ткани [9–11], но и в кожуре плодов [7, 25], а также в каллусной ткани плодов яблок [9].

На примере листовой ткани двудольных растений озимого рапса показано возрастание под действием АЛК (200 мг/л) общего количества фенольных соединений, в том числе антоцианов, качественный состав которых остается при этом таким же, как и в контрольных растениях (рис. 1). Индукция накопления антоцианов под действием АЛК обеспечивается на молекулярном уровне повышением экспрессии генов структурных белков и транскрипционных факторов, а также активности ферментов, обеспечивающих синтез антоцианов [10, 14, 25]. Активизация защитной системы в таких растениях обеспечивается возрастанием содержания антистрессора пролина, а также антиоксидантной и антирадикальной активностей [14].

В условиях накопления антоцианов, особенно на ранних стадиях развития растений рапса (4–5-дневные проростки), отмечен низкий уровень накопления хлорофилловых пигментов (рис. 3) [14]. Дефицит хлорофиллов *a* и *b* на всех стадиях развития проростков варианта “АЛК” свидетельствует о том, что экзогенная аминокислота не использовалась в синтезе хлорофилла либо использовалась в очень ограниченных количествах. Отмеченное нами ингибирование скорости накопления хлорофилла в присутствии экзогенной АЛК могло быть вызвано подавлением в этих условиях синтеза эндогенной АЛК в результате избыточного накопления гема – ингибитора ключевого фермента синтеза АЛК – *glu*-*t*РНК-редуктазы [12, 14]. Мы предположили, что неспособность экзогенной АЛК восполнять уровень хлорофилла хотя бы до значений контрольных проростков может быть также связана с субстратным ингибированием АЛКД – фермента, осуществляющего конденсацию двух молекул АЛК с образованием ПБГ. Действительно, в 4–5-дневных растениях рапса активность АЛКД составила 58% от контроля (рис. 2). Однако оказалось, что основным фактором, лимитирующим превращение АЛК в порфирины, является активность порфобилиногеназы – комплекса порфобилиногендеаминазы и УПГ III-синтетазы, осуществляющего образование первичного порфирина в его восстановленной форме – УПГ III (рис. 2). В 4–5-дневных растениях активность этого комплекса составила лишь 26.7% от контроля. Интересно, что обработка кожуры яблок высокими концентрациями АЛК, вызывала их покраснение, обусловленное накоплением антоцианов [7, 8], но не усиление зеленой окраски, что также говорит о блокировании в этой ткани превращения экзогенной АЛК в

продукты хлорофиллообразования. Функционирование описанных выше механизмов может рассматриваться в качестве защитных против избыточного накопления из эндогенной и экзогенной АЛК порфиринов-фотосенсибилизаторов.

Отмеченная нами ранее стимуляция накопления гема (на фоне подавления синтеза хлорофилла) в растениях рапса, обработанных АЛК [14], еще раз подтверждает концепцию о независимом функционировании, физическом разделении, участии разных изоэнзимов и разных механизмов контроля систем синтеза хлорофилла и гема в хлоропласте, начиная от образования АЛК [12]. Обсуждаемая в последние годы роль гема как сигнальной молекулы, участвующей в пластидно-ядерной сигнализации и контролирующей экспрессию ряда ядерных генов [26, 27], могла бы объяснить наблюдаемое угнетение активности закодированных в ядре ферментов синтеза хлорофилла в условиях высоких концентраций АЛК.

Интересно отметить одинаковое по эффективности действие экзогенной АЛК на две независимые в метаболическом и функциональном отношении системы синтеза хлорофилла (содержание в среднем 33% от контроля) и каротиноидов (содержание 35% от контроля). Это дает возможность предположить влияние АЛК на некий общий механизм контроля их содержания путем координированного подавления экспрессии закодированных в ядерном геноме генов обеих систем с помощью пластидно-ядерной сигнализации. При этом в растениях варианта “АЛК” не было отмечено изменения состава каротиноидов по сравнению с контрольными растениями (рис. 3).

Наряду с пигментами действие АЛК привело к значительному снижению содержания белков основных ПБК фотосистем I и II (рис. 4) – белка D1 РЦ ФС II, четырех белков внешней “минорной” антенны ФС II – Lhcb4-6, белков внешней мобильной антенны ССКII – Lhcb1-2 и четырех белков ССКI ФС I – Lhca1-4. При этом наибольшее влияние АЛК оказала на мобильную внешнюю антенну ФС II (рис. 4), субъединицы Lhcb1-2, которые, входя в состав тримера, могут мигрировать от ФС II в область ФС I и ассоциироваться с ее внешней антенной. Значительное снижение содержания этих белков может отрицательно сказываться на перераспределении энергии между двумя фотосистемами.

Снижение содержания структурных компонентов ПБК фотосистем I и II в растениях варианта “АЛК” естественно сказалось и на эффективности фотосинтеза. В 4–5-дневных растениях с розово-фиолетовыми семядолями листьями и низким содержанием хлорофилла (<20% от контроля) скорость фотосинтеза составляла 18% по сравнению с растениями контрольного варианта (рис. 5a). В 7-дневных растениях, обработанных

АЛК, с содержанием хлорофилла около 80% скорость фотосинтеза по сравнению с 4–5-дневными растениями значительно возрастала и в среднем составляла 78% от контроля (рис. 5в). В таких дефицитных по фотосинтезу растениях, несомненно, должна быть снижена и продукция энергетического субстрата – молекул АТФ. В этих условиях в растениях варианта “АЛК” отмечена интенсификация потребления кислорода листовой тканью. Отчетливая активация поглощения кислорода в затемненных растениях (рис. 5б, г) частично могла бы обеспечиваться за счет стимуляции митохондриального дыхания. Об этом свидетельствует повышение уровня компонента дыхательных цитохромов – гема [14] и 5-кратного возрастания активности гем-содержащего терминального фермента ЦО (рис. 6), чему в свою очередь соответствовало повышение содержания одной из трех кодируемых в митохондриях ключевых субъединиц фермента, формирующих его активный центр. Некоторый вклад в дыхательный процесс могла бы вносить и АОХ (рис. 6), индукция которой, как правило, является универсальным механизмом ответа на окислительный стресс путем его уменьшения или предотвращения [28, 29]. Использование ингибиторного анализа в дальнейшем позволит оценить вклад цитохромного и альтернативного дыхательных путей в индуцированную с помощью АЛК активацию поглощения кислорода. Следует также отметить, что в литературе описано расщепление экзогенной АЛК эндогенными оксидазами на два углеродных фрагмента, один из которых (С1–С4) поступает в цикл Кребса [30] и, таким образом, в условиях использования высоких концентраций АЛК расщепление последней могло бы также давать вклад в стимуляцию потребления кислорода листовой тканью растений варианта “АЛК”. Не исключается также активация под действием АЛК и других, не участвующих в митохондриальном дыхании, оксидаз.

Таким образом, установлено, что в растениях озимого рапса, выращенных на растворе экзогенной АЛК в концентрации 200 мг/л, происходит накопление вторичных метаболитов – фенолов и их производных антоцианов, состав которых не отличается от контрольных растений. В обогащенных антоцианами растениях наблюдается ингибирование фотосинтеза, путем снижения способности к формированию структурных компонентов фотосинтетического аппарата – ПБК фотосистем I и II. В этих условиях в растениях варианта “АЛК” отмечена интенсификация поглощения кислорода листовой тканью в условиях затемнения, а также возрастание активности терминальной ЦО и увеличение уровня другого терминального дыхательного фермента – АОХ, индукция которого, как правило, наблюдается в условиях стресса, в том числе окислительного.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б17МС-019).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрытник Л.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект). Калининград: БФУ им. И. Канта, 2011. 111 с.
2. Gould K.S., Markham K.R., Smith R.H., Goris J.J. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn. // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. P. 1107.
3. Feild T.S., Lee D.W., Holbrook N.M. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood // Plant Physiol. 2001. V. 127. P. 566.
4. Neill S.O., Gould K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? // Funct. Plant Biol. 2003. V. 30. P. 865.
5. Wang H., Cao G., Prior R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 304.
6. Giusti M.M., Rodriguez-Saona L.E., Wrolstad R.E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. P. 4631.
7. Xie L., Wang Z.H., Cheng X.H., Gao J.J., Zhang Z.P., Wang L.J. 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples // Plant Growth Regul. 2013. V. 69. P. 295.
8. Chen L., Guo Y., Bai G., Li Y. Effect of 5-aminolevulinic acid and genistein on accumulation of polyphenol and anthocyanin in qinyang apples // J. Anim. Plant Sci. 2015. V. 25. P. 68.
9. Feng X., An Y., Zheng J., Sun M., Wang L. Proteomic and SSH analyses of ALA-promoted fruit coloration and evidence for the involvement of a MADS-BOX gen, MdMADS1 // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. 1615.
10. Feng X., Chang J., Cheng S.Y., Zhu J., Li L.L., Wang Y., Cheng H. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the antioxidant system in *Ginkgo biloba* leaves // Afr. J. Biotechnol. 2009. V. 8. P. 3769.
11. Xu F., Cheng S., Zhu J., Zhang W., Wang Y. Effect of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba* // Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 2011. V. 39. P. 41.
12. Аверина Н.Г., Яронская Е.Б. Биосинтез тетрапирролов в растениях. Минск: Беларуская навука, 2012. С. 413.
13. Beizai Z., Sherbakov R.A., Averina N.G. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants // J. Plant Growth Regul. 2014. V. 33. P. 745.
14. Аверина Н.Г., Емельянова А.В., Щербаков Р.А., Доманская И.Н., Усатов А.В. Индукция накопления антоцианов и состояние защитной системы расте-

- ний озимого рапса, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой // Физиология растений. 2017. Т. 64. С. 173.
15. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. Vitic. 1965. V. 16. P. 144.
16. Lee J., Rennaker C., Wrolstad R. Correlation of two anthocyanin methods: HPLC and spectrophotometric methods // Food chem. 2008. V. 110. P. 782.
17. Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Карасева Т.А., Клозе Э. Новые возможности в оценке состояния растений // Сибирский экологический журнал. 2008. Т. 2. С. 249.
18. Jansson S., Stefansson H., Nystrom U., Gustafsson P., Albertsson P.-A. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1320. P. 297.
19. Edmands S., Burton R.S. Cytochrome c oxidase activity in interpopulation hybrids of a marine copepod: a test for nuclear-nuclear or nuclear-cytoplasmic coadaptation // Evol. 1999. V. 53. P. 1972.
20. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Изд. 2-е. Ленинград: Колос, 1972. С. 51.
21. Боровик О.А., Грабельных О.И., Королева Н.А., Побежимова Т.П. Связь между активностью альтернативного пути дыхания, содержанием сахаров и морозоустойчивостью озимой пшеницы // Журнал стресс-физиол. и биохимии. 2013. Т. 9, № 4. С. 241.
22. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas // Chromatography. 2012. V. 1. P. 120.
23. Shemin D. Delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Rhodospseudomonas sphaeroides* // Methods in Enzymol / Ed. by Colowick S.P., Koplan N.O. N.-Y.: Academic Press, 1962. V. 5. P. 883.
24. Chen L., Guo Y., Bai G., Li Y. Effect of 5-aminolevulinic acid and genistein on accumulation of polyphenol and anthocyanin in 'qinyang' apples // J. Anim. Plant Sci. 2015. V. 25. P. 68.
25. Guo L., Cai Z.X., Zhang B.B., Xu J.L., Song H.F., Ma R.J. The mechanism analysis of anthocyanin accumulation in peach accelerated by ALA // Acta Hort. 2013. V. 40. P. 1043.
<https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2013.06.004>
26. Nagahatenna D.S.K., Langridge P., Whitford R. Tetrapyrrole-based drought stress signaling // Plant biotechnol. J. 2015. V. 13. P. 447.
27. Larkin R. Tetrapyrrole Signaling in Plants // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1586.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01586>
28. Рогов А.Г., Суханова Е.И., Уральская Л.А., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. Альтернативная оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции // Успехи биол. хим. 2014. Т. 54. С. 413.
29. Cvetkovska M., Vanlerberghe G.S. Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentration of superoxide and nitric oxide // New Phytol. 2012. V. 195. P. 32.
30. Duggan J.X., Meller E., Gassman M.L. Catabolism of 5-aminolevulinic acid to CO₂ by etiolated barley leaves // Plant Physiol. 1982. V. 69. P. 19.