

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ КОРНЕВОЙ ОБРАБОТКИ МЕЛАТОНИНОМ НА ФОТОСИНТЕЗ ЛИСТЬЕВ ОГУРЦА

© 2020 г. Е. В. Бойко<sup>а</sup>, \*, И. Ф. Головацкая<sup>а</sup>, О. Г. Бендер<sup>б</sup>, И. Н. Плюснин<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук, Томск, Россия

\*e-mail: Caterina.Soloveva@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 26.08.2019 г.

Изучено влияние кратковременной (15, 30, 60 и 120 мин) корневой обработки мелатонином (0.1 пМ и 1.0 мкМ) на физиологические характеристики листа 21-дневных растений огурца (*Cucumis sativus* L.) раннеспелого сорта Изящный, выращенных на питательной среде Мурасиге-Скуга. Экспериментальные данные по кинетике действия мелатонина показали, что с увеличением концентрации экзогенного мелатонина, используемого для корневой обработки, уменьшалось время последствия для активации фотосинтеза, транспирации и устьичной проводимости листа огурца. Подобная закономерность установлена для повышения интенсивности перекисного окисления липидов, содержания пролина и активации гваякол-зависимой пероксидазы (ЕС 1.11.1.7). Антирадикальная активность листа снижалась под действием мелатонина через 120 мин, чему предшествовало снижение суммы флавоноидов. Более сложная регуляция отмечена для активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (ЕС 1.15.1.1) и каталазы (ЕС 1.11.1.6). Обсуждаются возможные механизмы действия мелатонина на фотосинтетические параметры листа огурца.

**Ключевые слова:** *Cucumis sativus*, мелатонин, фотосинтез, антирадикальная активность, перекисное окисление липидов, пролин, супероксиддисмутазы, каталаза, гваякол-пероксидаза, флавоноиды

DOI: 10.31857/S0015330320020037

### ВВЕДЕНИЕ

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) – молекула индольной природы, обладающая гормональной активностью и оказывающая влияние на физиологические процессы клеточного и молекулярного уровней в живых организмах. Первоначально присутствие мелатонина было показано у беспозвоночных и позвоночных животных, в том числе и человека, позднее он был выявлен в грибах, микро- и макроводорослях и высших растениях [1]. Повсеместное распространение мелатонина в эволюционном древе живых существ свидетельствует об его судьбоносности в жизнедеятельности организмов, позволяя предполагать важность данного индола в регуляции различных функций. В отличие от животных концентрация мелатонина в растениях значительно выше. Вероятно, это связано с тем, что у растений индоламин синтези-

руется не только в митохондриях, но и в хлоропластах [2], кроме того показана зависимость от видовой, органной и онтогенетической специфичности, на уровень мелатонина влияют возраст растения и стадии его развития [3]. Молекула мелатонина обладает амфифильными свойствами, вследствие чего она преодолевает все тканевые барьеры, свободно проходит через клеточную мембрану. Мелатонин может воздействовать на внутриклеточные процессы напрямую, минуя систему рецепторов и вторичных мессенджеров, так и путем взаимодействия с рецептором. Недавние исследования на *Arabidopsis thaliana* показали, что индуцированное мелатонином закрытие устьиц опосредовано рецептором CAND2/PMTR1, активирующим G $\alpha$  субъединицу, а передача этого сигнала осуществляется через H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и Ca<sup>2+</sup> [4].

К настоящему времени установлена мультифункциональность молекулы фитомелатонина, играющего важную роль в росте и развитии растений. Показано, что он способствует укоренению черенков, уменьшает старение листьев, участвует в процессах прорастания семян, формирования и

**Сокращения:** АРА – антирадикальная активность; КАТ – каталаза; ГПО – гваякол-пероксидаза; ПО – пероксидаза; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СОД – супероксиддисмутазы.

созревания плодов и семян [1]. Мелатонин способен действовать как биостимулятор растений, повышающий устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессорам. Мелатонин регулирует биосинтез рибосом, метаболизм липидов, углеводный обмен и деградацию запасного белка [5]. Мелатонин снижает уровень активных форм кислорода (АФК), увеличивает содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов, хелатирует тяжелые металлы, регулирует некоторые стадии кальций-зависимой трансдукции сигналов и изменяет экспрессию стресс-регулируемых генов [6–8]. Степень протекторного действия мелатонина зачастую обусловлена его концентрацией и интенсивностью стресс-фактора [9]. Индоламин является важным модулятором генной экспрессии, связанной с гормонами растений, такими как индол-3-уксусная кислота, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота и этилен [1]. Показана способность мелатонина регулировать ИУК-зависимые реакции при развитии проростков *Arabidopsis* в темноте и на селективном свете; отмечено взаимодействие мелатонина с ИУК при растяжении колеоптилей пшеницы [10]. Экспериментальных данных, устанавливающих полифункциональность мелатонина, на данный момент достаточно, однако механизмы его действия на жизнедеятельность растений еще не совсем ясны. В связи с этим целью данного исследования стало изучение механизмов, обеспечивающих влияние экзогенного мелатонина на фотосинтетические параметры листа растений огурца.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были растения огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) раннеспелого сорта Изящный (Агрофирма “СеДеК”). Изучение влияния кратковременного действия мелатонина на фотосинтетическую активность листьев проводили на растениях огурца, находящихся на вегетативной стадии онтогенеза при формировании на побеге 4–5 листьев. Культивирование растений осуществляли по схеме, учитывающей возрастающее потребление питательных веществ с увеличением их размеров и интенсивности ростовых процессов. Семена огурца (350 шт.) проращивали в лотках в вермикулите на 25% питательной среде Мурасиге-Скуга (МС-среда), спустя 4 дня культивирования повышали концентрацию среды до 50%, на следующие 4 дня – до 75% и еще через 4 дня – до 100%. Далее растения были ранжированы, отобран средний класс 216 растений (по 72 растения на вариант) и перенесены на концентрированную МС-среду в индивидуальные емкости без вермикулита, растения культивировали еще 9 суток. Растения выращивали на белом свете при плотности потока падающих квантов – 200–

230 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), 16-часовом фотопериоде, влажности 60–70%, температура воздуха составляла 23–25°C. 21-дневные растения огурца делили на 3 группы и переносили по одному в новые сосуды со средой: МС-среда (контроль) или МС-среда + 0.1 пМ мелатонин или МС-среда + 1 мкМ мелатонин (опыт), предварительно промыв корни свежей МС-средой и дав питательному раствору стечь с корней на фильтровальную бумагу. На выбор изучаемых концентраций оказали влияние данные, полученные Weeda с соавт. [11], которые установили, что корневая обработка растений арабидопсис мелатонином в концентрациях 100 пМ и 1 мМ неодинаково изменяла экспрессию генов, участвующих в фотосинтезе, а также наши данные по чувствительности морфогенетических реакций разных линий 7-дневных проростков *A. thaliana* к его действию в диапазоне от 0.1 пМ до 1 мкМ [10]. Концентрации мелатонина, выбранные для нашего исследования, отличались друг от друга на семь порядков, т.е. в 10 000 000 раз, как и в работе Weeda с соавт. [11].

Определение интенсивности фотосинтеза (А) и транспирации (Е) проводили на неотделенных листьях 2 яруса (счет ярусов осуществляли снизу в соответствии с естественным приростом побега) растений огурца спустя 15, 30, 60 и 120 мин от начала обработки мелатонином. Измерение А и Е производили непосредственно за 1 мин до завершения обработки мелатонином, не вынимая растения из соответствующих опыту питательных сред. Растения контрольных вариантов измеряли одновременно с опытными спустя 15, 30, 60 и 120 минут. Для определения других биохимических показателей брали листья с 9 растений каждого варианта спустя 60 или 120 мин. При анализе антирадикальной активности (АРА) использовали гомогенат свежих листьев растений; для анализа пролиона и активности антиоксидантных ферментов (СОД, гваякол-зависимой пероксидазы, каталазы) листья фиксировали жидким азотом; для изучения флавоноидов растительный материал высушивали. Выбор листьев одинаковых ярусов растений для анализа обусловлен их возрастными морфофизиологическими и биохимическими изменениями [12].

Для измерения А и Е использовали портативный инфракрасный газоанализатор Li-6400 (LI-COR, США). В качестве искусственного источника света применяли систему фотодиодов (6400-02B LED). Определение интенсивности фотосинтеза проводили на неотделенных от растений листьях 2 яруса с использованием камеры-прищепки (листовой камеры). Температура внутри камеры поддерживалась специальной системой теплообмена с электрическим нагревателем и воздушным охлаждением. Температура, влажность и интенсивность ФАР в листовой камере устанавливали в соответствии с условиями выращивания растений, чтобы

исключить влияния этих параметров на поглощение  $\text{CO}_2$  (интенсивность фотосинтеза – А) и на интенсивность испарения  $\text{H}_2\text{O}$  (транспирация – Е). В листовой камере скорость потока  $\text{CO}_2$  составляла 400 мкмоль/с, а его содержание 400 мкмоль/моль. Влажность в камере составляла 60–70%.

Параметры А и Е фиксировали в течение 1 мин после стабилизации в листовой камере скорости потока и концентрации  $\text{CO}_2$  и влажности воздуха. Продолжительность экспозиции каждого варианта в листовой камере, включая время стабилизации и собственно измерений, составляла от 1.5 до 3 мин. Все измерения проводили с 10:00 до 14:00 ч. Параллельно с измерением газо- и водообмена листа фиксировали устьичную проводимость ( $g_s$ ) и концентрацию  $\text{CO}_2$  в межклеточном пространстве ( $C_i$ ) через 15, 30, 60 и 120 мин после внесения мелатонина в питательную среду [13].

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрическим методом, основанным на измерении плотности раствора, содержащего окрашенный комплекс его продукта малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании [14].

АРА оценивали по отношению к свободному радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу (ДФПГ) (“Sigma”, США) в листьях растений огурца. За счет делокализации электрона раствор ДФПГ в этаноле имеет темно-фиолетовое окрашивание с пиком поглощения при 517 нм. При взаимодействии с веществами, обладающими антирадикальными свойствами, ДФПГ переходит в нерадикальную форму, что сопровождается исчезновением максимума поглощения при  $\lambda = 517$  нм в видимой области спектра. Экстракцию веществ и определение АРА проводили по методу, описанному Blois [15]. Навеску листьев огурца гомогенизировали при температуре 2–4°C в 80% этаноле, гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. В реакционные пробирки вносили 1 мл супернатанта (экстракта низкомолекулярных антиоксидантов), 1 мл 80% этанола и 2 мл 200 мкМ ДФПГ. В контрольную пробирку вместо экстракта вносили эквивалентный объем 80% этанола. Пробирки встряхивали и оставляли в темноте на 30 мин, после чего определяли оптическую плотность растворов при длине волны 517 нм.

Для оценки работы антиоксидантной системы растений определяли содержание свободного пролина. Экстракцию и определение свободного пролина проводили по методу Bates [16], основанному на образовании окрашенного в красный цвет продукта в реакции аликвоты экстракта с нингидрином в кислой среде.

Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследуемом экстракте проводили согласно ранее описанному методу

[12], который основан на реакции окрашивания действующего вещества с раствором алюминия хлорида в уксуснокислой среде. Поглощение раствора измеряли при 414 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “Thermo Scientific”, США).

Оценку активности супероксиддисмутазы (СОД, ЕС 1.15.1.1), гваякол-зависимой пероксидазы (ГПО, ЕС 1.11.1.7), каталазы (КАТ, ЕС 1.11.1.6) проводили согласно методикам, описанным ранее [17].

Для оценки общей активности СОД использовали реакционную смесь, содержащую: 100 мкл супернатанта, 1.75 мл 50 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.8), 0.2 мл 0.1 М DL-метионина, 0.063 мл 1.7 мМ нитросинего тетразолия (“Fermentas”, США), 0.047 мл 1% Тритона X-100 и 0.060 мл 0.004% рибофлавина. Реакцию проводили при освещении светодиодами лампами ( $I = 232$  мкмоль/( $\text{m}^2$  с)) в течение 30 мин. Поглощение раствора измеряли при 560 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “Thermo Scientific”, США).

Для оценки ГПО реакционная смесь содержала 50 мкл супернатанта, 1.95 мл 0.066 М калий-фосфатного буфера (рН 7.4), 200 мкл 7 мМ гваякола, 200 мкл 0.01 М  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Поглощение раствора измеряли при 470 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “Thermo Scientific”, США).

Для оценки активности КАТ реакционная смесь содержала 25 мкл супернатанта, 1.875 мл 0.066 М калий-фосфатного буфера (рН 7.8), 100 мкл 0.05 М  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Поглощение раствора измеряли при 240 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “Thermo Scientific”, США).

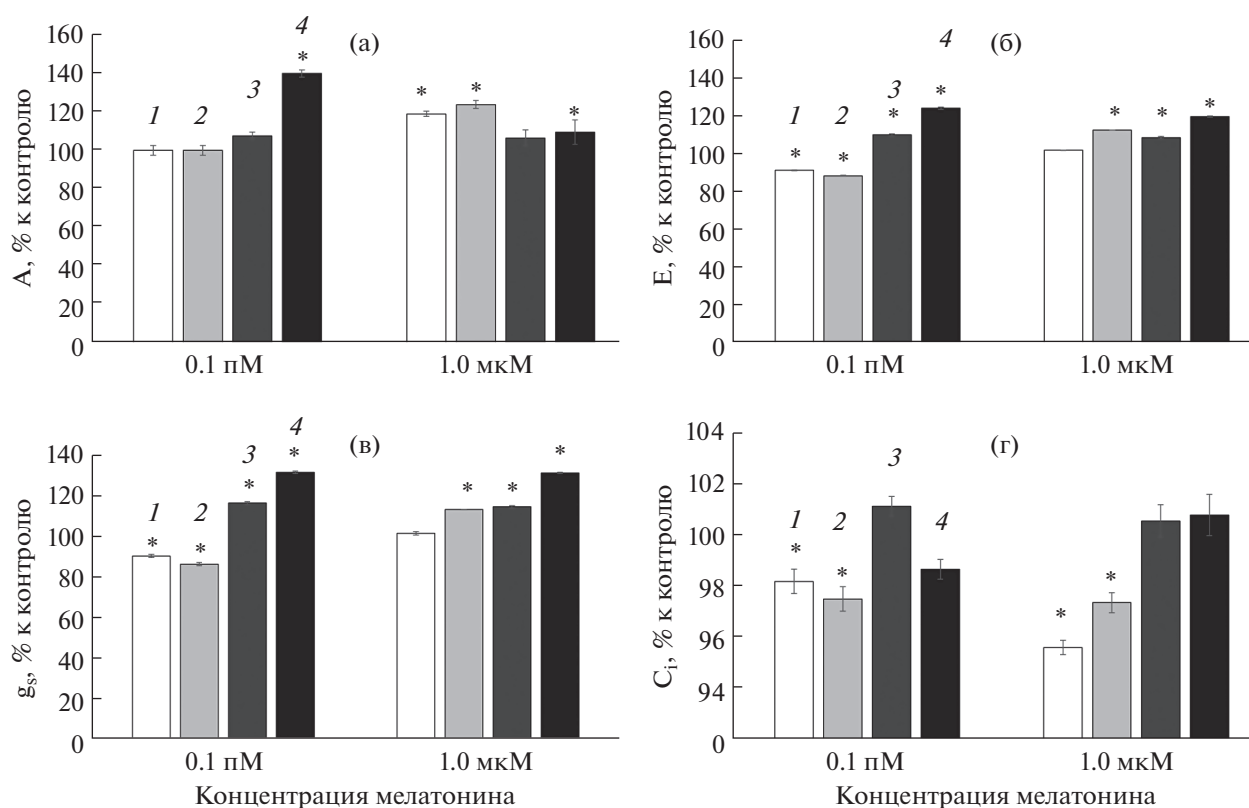
Концентрацию белка в полученных ферментных препаратах оценивали по методу Esen [18].

Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения  $t$ -критерия находили для 95% уровня значимости ( $P \leq 0.05$ ). В работе использовали 3 биологических повторности (по 9 растений) на вариант. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические ( $M$ ) биохимических параметров ( $n = 9$ ) с двухсторонними доверительными интервалами ( $M \pm 1.96SEM$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Влияние мелатонина на интенсивность видимого фотосинтеза и транспирацию*

Изучение физиологического состояния листа 2 яруса 21-дневных растений контрольного варианта показало, что А составила  $3.387 \pm 0.027$  мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{m}^2 \text{ c})$ , Е достигала  $1.127 \pm 0.0008$  ммоль  $\text{H}_2\text{O}/(\text{m}^2 \text{ c})$ , а  $g_s$  и  $C_i$  были соответственно равны  $0.074 \pm 0.0001$  моль  $\text{H}_2\text{O}/(\text{m}^2 \text{ c})$  и 311.0 мкмоль  $\text{CO}_2/\text{моль}$ .



**Рис. 1.** Влияние мелатонина на поглощение  $\text{CO}_2$ , фотосинтез А (а), интенсивность испарения  $\text{H}_2\text{O}$ , транспирация Е (б), устьичную проводимость,  $g_s$  (в), содержание  $\text{CO}_2$  в межклетниках,  $C_i$  (г) листа растений *Cucumis sativus* после корневой обработки в течение 15 (1), 30 (2), 60 (3) или 120 мин (4). \* $P \leq 0.05$  по сравнению с контролем.

Полученные нами результаты по влиянию мелатонина на фотосинтетические функции листа растений *C. sativus* представлены на рисунке 1. Добавление 0.1 пМ исследуемого вещества в питательную среду приводило к повышению А спустя 120 мин от начала обработки на 40%. Внесение мелатонина высокой концентрации 1 мкМ способствовало росту А уже спустя 15 мин обработки, максимум отмечен при 30 мин, затем наблюдали снижение данного показателя, но при этом значение оставалось выше контрольного.

Под влиянием низкой концентрации мелатонина происходило снижение Е через 15 и 30 мин после начала обработки, но спустя 60 мин Е повышалась и через 120 мин увеличение достигло 24%. Высокая концентрация экзогенного вещества приводила к увеличению показателя уже спустя 30 мин обработки, максимум также отмечен после 120 мин воздействия.

Кроме того, нами показано, что любая из исследуемых концентраций мелатонина оказывала достоверно стимулирующее влияние на  $g_s$ , так через 60 мин воздействия показатель возрос на 14–16%, а спустя 120 мин на 31–32%, что прямо пропорционально времени воздействия и связано, вероятно, с количеством поступившего в лист мелатонина.

Следует отметить, что при высокой концентрации мелатонина (1 мкМ) А тесно коррелировала с  $g_s$  и  $C_i$ , т.е. регулировалась состоянием устьиц. Добавление в МС-среду 0.1 пМ мелатонина через 120 мин вызывало увеличение А, Е, вместе с тем  $C_i$  в межклетниках уменьшалась (рис. 1г).

Отношение величины А к величине Е характеризует фотосинтетическую эффективность использования воды (WUE) и отражает зависимость фотосинтеза от водного статуса листа. WUE при 15-минутном воздействии высокой концентрации мелатонина возрастал, тогда как при более длительной обработке растений он возвращался к контрольным значениям (данные не представлены).

#### Влияние мелатонина на окислительный стресс

Оценка окислительного статуса клеток листа 2 яруса растений контрольного варианта показала присутствие МДА в количестве  $0.026 \pm 0.005$  мкмоль/г сырой массы (табл. 1). Действие мелатонина на интенсивность ПОЛ зависело от его концентрации и времени воздействия на корень. При 60-минутной обработке мелатонином низкой концентрации данный показатель не из-

**Таблица 1.** Влияние мелатонина на содержание малонового диальдегида в листьях растений *Cucumis sativus* в зависимости от его концентрации и времени действия

Концентрация мелатонина	Содержание МДА, мкмоль/г сырой массы	
	время обработки, мин	
	60	120
0 (контроль)	0.026 ± 0.005	
0.1 пМ	0.025 ± 0.006	0.050 ± 0.006*
1.0 мкМ	0.044 ± 0.009*	0.023 ± 0.001

Примечание. \* $P \leq 0.05$  по сравнению с контролем; 0 (контроль) – приведены усредненные значения контрольных вариантов, измеренных аналогично опытным через 60 и 120 мин.

менялся, в то время как его высокая концентрация увеличивала интенсивность ПОЛ (табл. 1). Спустя 120 мин от начала воздействия наблюдали противоположную тенденцию: низкая концентрация индоламина увеличивала интенсивность ПОЛ, в то время как высокие концентрации поддерживали окислительный статус на уровне контроля.

#### *Влияние мелатонина на содержание в листьях веществ с антирадикальными свойствами*

В растении большую роль в становлении окислительного статуса клеток играют низкомолекулярные соединения, имеющие антирадикальные свойства. К ним относятся фенольные соединения, тиолы, ароматические амины, аскорбиновая кислота.

В листе контрольного варианта АРА составил  $52.51 \pm 3.35$  отн. ед./г сырой массы. Анализ влияния мелатонина на этот параметр показал, что спустя 120 мин вне зависимости от концентрации мелатонин снижал АРА на 27 и 17% соответственно для низкой и высокой концентраций (рис. 2а).

#### *Влияние мелатонина на содержание флавоноидов в листьях растений огурца*

Флавоноиды принадлежат к классу полифенольных соединений и относятся к вторичным продуктам метаболизма растений [19]. Одной из изученных функций флавоноидов является их участие в защите растений от окислительного стресса, благодаря выраженной антиоксидантной активности.

В данном исследовании нами показано, что в листе *C. sativus* контрольного варианта содержание суммы флавоноидов составило  $1.029 \pm 0.058\%$  от сухой массы, тогда как в ответ на корневую обработку мелатонином в течение 60 мин происходило

снижение уровня флавоноидов в листьях растений на 15–19% независимо от вносимой концентрации (рис. 2б). Ингибирующий эффект мелатонина составил 20% при 120-минутном действии высокой его концентрации.

#### *Влияние мелатонина на аккумуляцию пролина в листьях растений огурца*

У листа 2 яруса 21-дневных растений огурца контрольного варианта содержание пролина составило  $0.939 \pm 0.09$  мкмоль/г сырой массы. Как видно из результатов рис. 2в, содержание важного осмопротектора пролина возрастает. Содержание пролина увеличивалось через 60 мин при действии 1 мкМ мелатонина и через 120 мин при 0.1 пМ (рис. 2в), соответственно 2-кратно и на 87%.

#### *Влияние мелатонина на активность антиоксидантных ферментов*

При изучении активности фермента ГПО было показано, что в листе контрольного варианта его активность составила  $0.51 \pm 0.06$  моль гваякола/(мг белка мин). После 60-минутного воздействия 1 мкМ мелатонина активность ГПО возросла на 67%, в то время как 0.1 пМ мелатонин увеличивал активность фермента в 3 раза при более длительном его воздействии.

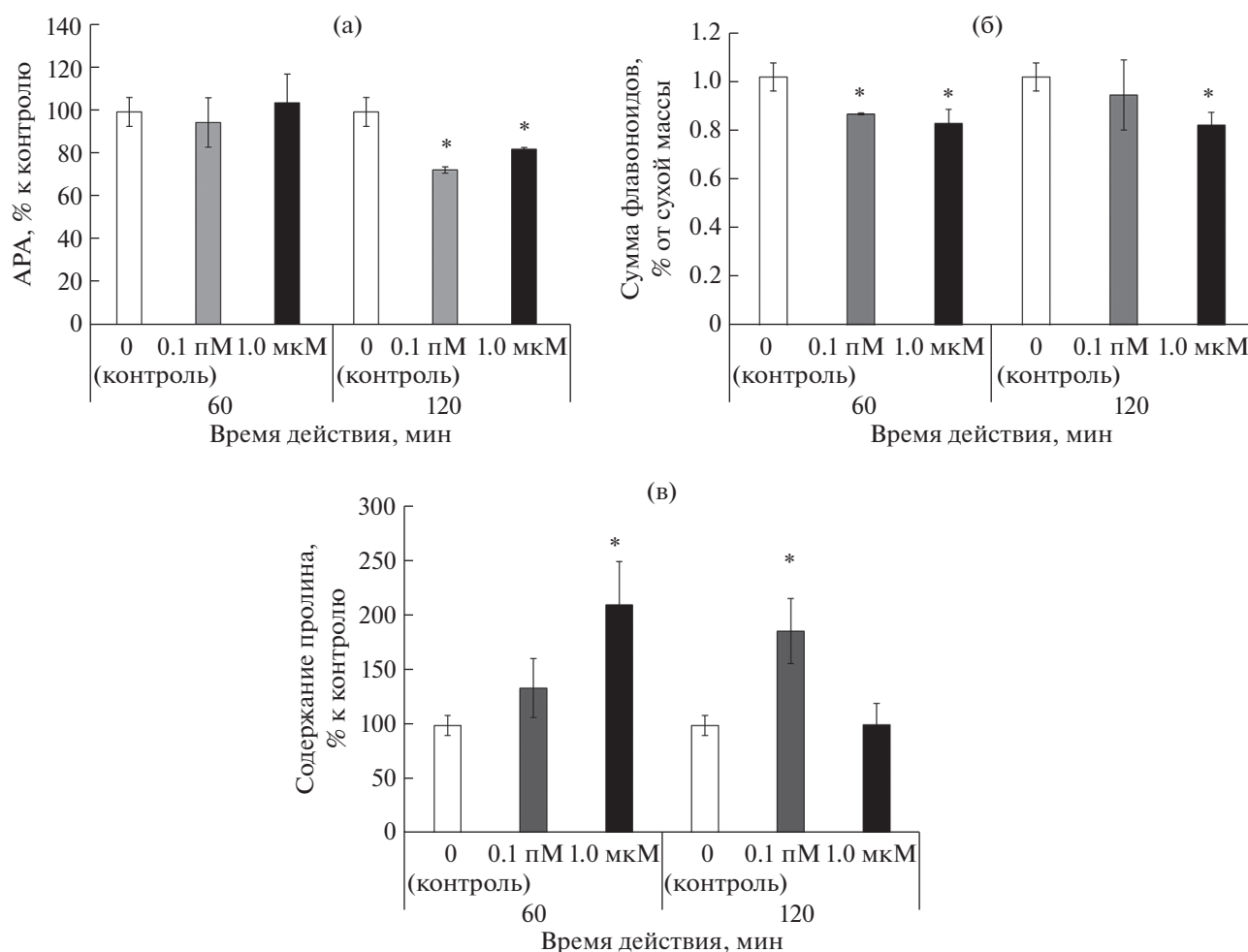
Исходная активность другого фермента СОД в листе контрольного варианта поддерживалась на уровне  $13.81 \pm 0.05$  усл. ед./мг белка. Кратковременная корневая обработка растений огурца мелатонином приводила к изменению активности СОД. Низкая концентрация индоламина снижала активность фермента через 60 мин на 26%, тогда как его высокая концентрация снижала активность только при 120-минутной обработке на 29% (табл. 2).

Активность КАТ в листьях растений огурца контрольного варианта составила  $38.59 \pm 2.05$  мкмоль  $H_2O_2$ /(мг белка мин), 60- и 120-минутные обработки корней мелатонином низкой концентрации приводили к увеличению данного показателя на 28 и 23% соответственно, в то время как высокая концентрация мелатонина достоверных изменений не оказывала (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность полученных нами экспериментальных данных позволяет обсудить роль мелатонина в регуляции фотосинтеза.

Показанная нами ранее зависимость энергии прорастания семян огурца и их всхожести от продолжительности обработки и концентрации экзогенного мелатонина [20] могла быть связана с его накоплением в семенах и проростках расте-



**Рис. 2.** Влияние мелатонина на антирадикальную активность (а), содержание флавоноидов (б) и уровень пролина (в) в листе растений *Cucumis sativus* в зависимости от концентрации и времени воздействия. \* $P \leq 0.05$  по сравнению с контролем.

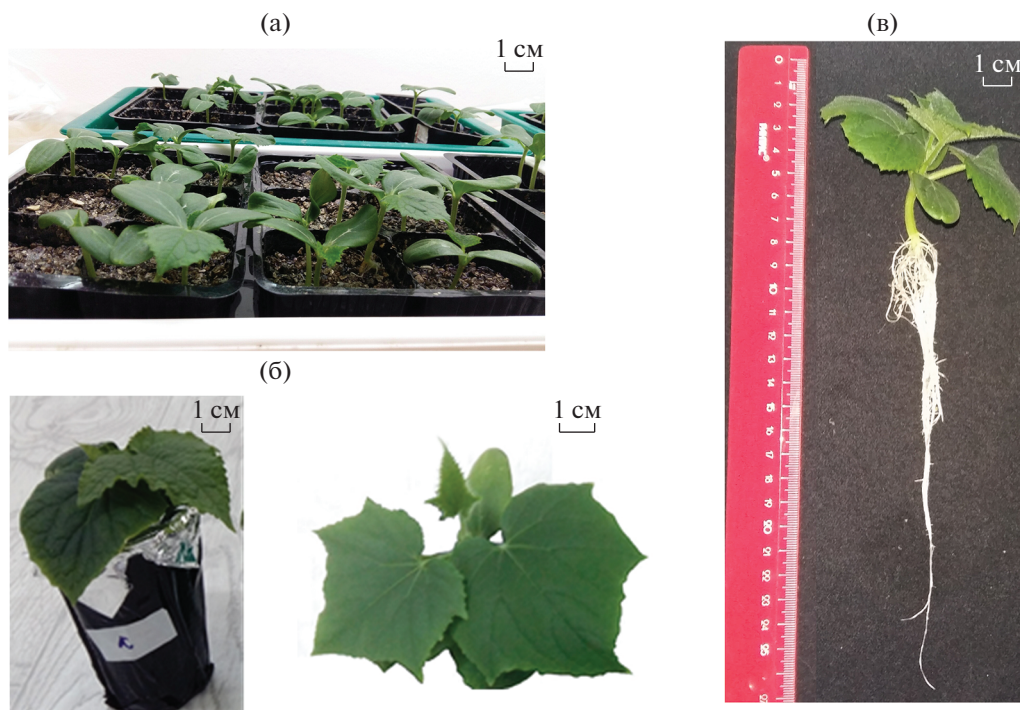
ний [21]. Опираясь на эти данные, нами была разработана схема эксперимента, позволившая оценить эффективность действия различных концентраций мелатонина, поступающего из корня, на фотосинтетические процессы и окислительный

статус листа растений огурца в динамике спустя 15, 30, 60 и 120 мин от начала обработки мелатонином. Преобладающее большинство исследований по данной тематике посвящено длительной обработке мелатонином (например, 16 часов или 4, 8,

**Таблица 2.** Влияние мелатонина на активность антиоксидантных ферментов в листьях растений *Cucumis sativus* в зависимости от его концентрации и времени воздействия

Концентрация мелатонина	Активность пероксидазы, моль гваякола/(мг белка мин)		Активность СОД, усл. ед./мг белка		Активность каталазы, мкмоль $H_2O_2$ /(мг белка мин)	
	время воздействия, мин					
	60	120	60	120	60	120
0 (контроль)	0.51 ± 0.06		13.81 ± 0.05		38.59 ± 2.05	
0.1 пМ	1.02 ± 0.50	1.67 ± 0.6*	10.17 ± 0.73*	11.39 ± 5.48	49.41 ± 4.94*	47.53 ± 3.19*
1.0 мкМ	0.85 ± 0.20*	0.60 ± 0.37	14.00 ± 2.18	9.72 ± 2.37*	—	41.26 ± 1.15

Примечание. \* $P \leq 0.05$  по сравнению с контролем; 0 (контроль) — приведены усредненные значения контрольных вариантов, измеренных аналогично опытным через 60 и 120 мин.



**Рис. 3.** Растения *Cucumis sativus* контрольного варианта: 7-дневные (а) и 21-дневные растения (б – вид сверху, в – вид сбоку).

10 сут) или эффективности мелатонина при действии стресс-факторов [11, 22, 23].

Нами было установлено, что с увеличением концентрации от 0.1 пМ до 1 мкМ экзогенного мелатонина, используемого для корневой обработки, уменьшалось время последствия для активации  $A$ ,  $E$  и  $g_s$  листа огурца (рис. 1). Повышение этих параметров листа обнаружено другими авторами при действии длительной корневой и внекорневой обработки этим индоламином растений томата [22].

Отмеченная нами временная динамика фотосинтетических параметров в ответ на действие мелатонина могла быть связана с его эндогенным содержанием, которое зависело от скорости транспорта по растению на расстояние, равное длине части корня от зоны поглощения, гипокотили и черешка листа (9–13.5 см) (рис. 3), а также продолжительности процессов адсорбции корнями и локальных изменений водообмена по пути следования вещества. Известно, что мелатонин, поглощенный корнем, движется вверх по ксилеме и связан с транспирационным током. Накопление мелатонина в листьях было пропорционально экзогенно применяемым концентрациям до 5 мМ без насыщения [24]. В то же время показано, что при опрыскивании мелатонином листьев арбуза наблюдали увеличение его концентрации и в корнях растений [25], из этого следует, что мелатонин может перемещаться в растениях различными транспортными системами в зависимости от фи-

зиологических условий. Кроме того, амфифильные свойства молекулы мелатонина обеспечивают ее свободное перемещение через клеточные мембраны на уровне растительных тканей, что может ускорять ее транспорт.

Поскольку фотосинтез и транспирация листьев являются двумя важнейшими тесно взаимосвязанными физиологическими процессами, то не случайна и тесная корреляция между показателями листа огурца  $A$  и  $E$ ,  $E$  и  $g_s$  под действием мелатонина (рис. 1). В связи с этим изменение  $A$  листа огурца обусловлено или изменением состояния устьиц ( $g_s$ ), или состояния воды в клетках листа. Поскольку в процессе функционирования фотосинтетического аппарата открытые устьица вызывают потерю воды клетками листьев, то при адаптации растений к нарушению водного статуса важная роль принадлежит совместимым осмолитам. Под действием мелатонина, поступающего из корня, возрастает содержание важного осмолитатора листа – пролина (рис. 2в), динамика изменения содержания которого согласуется с изменениями  $A$  (рис. 1а). Возможно, что вслед за открыванием и поддержанием открытости устьиц увеличивалась эффективность функционирования фотосинтетического аппарата, обеспечивающего повышение других осмотически активных веществ в листьях.

Другой механизм регуляции состояния устьиц может быть связан со способностью мелатонина

контролировать биосинтез АБК. Так, на примере растений яблони было показано, что мелатонин подавлял экспрессию гена синтеза абсцизовой кислоты *MdNCED3* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) и усиливал экспрессию генов его катаболизма *MdCYP707A1* и *MdCYP707A2* (ABA8-hydroxylase), тем самым снижая содержание АБК в условиях засухи [23]. Кроме того, на проростках кукурузы было обнаружено, что мелатонин способствует поддержанию высокого тургорного потенциала и относительного содержания воды в клетках [26], тем самым оставляя устьица открытыми как в оптимальных условиях, так и в условиях засухи.

Активация фотосинтетической функции листа огурца вызывает в нем изменение окислительного статуса, поскольку в световой фазе фотосинтеза процессы поглощения квантов солнечной энергии (в антенных комплексах хлоропластов) и переноса электронов (в ЭТЦ) всегда сопряжены с образованием синглетного кислорода и супероксидного радикала. Возникающий дисбаланс между поглощением квантов световой энергии и возможностью ее реализации в фотосинтезе приводит к нарастанию генерации  $^1\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^-$  и инициации возникновения других активных форм кислорода (АФК:  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и т.д.) [27].

В условиях невысокой интенсивности света нашего эксперимента в листе огурца мелатонин активирует А (рис. 1а), обуславливая повышение интенсивности ПОЛ (табл. 1), в зависимости от концентрации и времени действия мелатонина.

Несмотря на изменение окислительного статуса, хлоропласты могут сохранять свою целостность благодаря сложной и многогранной защитной системе, включающей в себя многочисленные антиоксиданты с перекрывающимися функциями [28]. Фотосинтетическая органелла продуцирует синглетный кислород в ФС II, тогда как восстановление молекулярного кислорода до супероксида происходит преимущественно в ФС I. Под действием СОД супероксид превращается в перекись водорода. ПО катализируют восстановление различных алкильных перекисных соединений ( $\text{ROOH}$ ) до воды и спирта ( $\text{ROH}$ ) за счет восстановителя, функцию последнего может выполнять аскорбиновая кислота.

Среди антиоксидантов листа огурца нами были исследованы представители неферментативной (пролин и флавоноиды) и ферментативной (ГПО, СОД и КАТ) групп систем защиты. При кратковременном действии мелатонина, вызывающем увеличение А, происходило увеличение уровня пролина, снижение АРА и уровня флавоноидов. Также нами установлено, что динамика изменения уровня пролина (рис. 2в) сопоставима с динамикой изменения интенсивности ПОЛ (табл. 1), что может свидетельствовать о его роли

в поддержании антиоксидантных свойств клетки. Другими авторами также показано повышение уровня пролина и растворимого белка у проростков капусты, но в ответ на семенную предобработку мелатонином [21].

АРА листа огурца снижалась под действием мелатонина через 120 мин, чему предшествовало снижение суммы флавоноидов. Более длительная обработка (в течение 4 или 8 сут) мелатонином в исследованиях других авторов приводила к повышению уровня АРА в растениях кукурузы при действии засухи, но эффект мелатонина не проявлялся в отсутствии действия стрессора [26].

Снижение суммы флавоноидов в листе огурца в ответ на 120-минутную обработку мелатонином, возможно, обусловлено антагонистическими взаимодействиями между некоторыми группами флавоноидов и мелатонином. Ранее Lee с соавт. [29] показали, что флавоноиды ингибировали синтез эндогенного индоламина. Листья риса, обработанные флавоноидами, имели более низкий уровень мелатонина, чем необработанные. Кроме того, полученные ими трансгенные растения риса с повышенным содержанием флавоноидов продуцировали меньше мелатонина, чем растения дикого типа [29].

Изучение кратковременного действия мелатонина на активность антиоксидантных ферментов ГПО, СОД и КАТ у листа огурца показало временную и концентрационную зависимость от индоламина. Для активации ГПО (ЕС 1.11.1.7) требуется более длительное время действия (120 мин) при низкой концентрации мелатонина и более короткое время действия (60 мин) при высокой концентрации (табл. 2), что согласуется с одновременной активацией А (рис. 1а) и образования АФК, вызывающего повышение интенсивности ПОЛ (табл. 1). Более сложная регуляция отмечена для активности антиоксидантных ферментов СОД (ЕС 1.15.1.1) и КАТ (ЕС 1.11.1.6), при которой происходит снижение активности СОД и повышение активности КАТ (табл. 2). “Несо согласованное” изменение активности разных антиоксидантных ферментов, вероятно, связано с первичными реакциями хлоропласта огурца в ответ на действие повышенного эндогенного уровня мелатонина. Ферменты участвуют в регуляции уровня АФК, связанного со стабилизацией хлоропласта на новом для фотосинтетических органелл гормональном или химическом фоне. АФК, определяющие окислительно-восстановительный статус, являются также неотъемлемой частью сигнальных молекул хлоропластов, которые перемещаются в ядро для передачи важной информации, касающейся окислительно-восстановительного давления в цепи переноса электронов [28, 30]. Существует специфичность в профилях экспрессии генов, запускаемых различными сигнальными АФК. Син-



глетный кислород запускает программы, связанные с чрезмерным возбуждением фотосистемы ФС II, тогда как супероксид и перекись водорода способствуют экспрессии других наборов генов, продукты которых уменьшают электронное давление на стороне восстановления ФС I [28]. Можно предположить наличие дозо-зависимых изменений спектра экспрессированных генов и соответственно выполнение мелатонином различных ролей в регуляции роста и развития растений огурца при низких и высоких концентрациях. Что подтверждается данными по обработке растений арабидопсиса мелатонином низкой концентрации 100 пМ в течение 16 ч, существенно изменяющей экспрессию 81 гена, тогда как высокой 1 мМ – 1308 генов. Однако не все гены, измененные низким уровнем мелатонина, были подвержены влиянию высокой концентрации [11]. В качестве механизмов регуляции фотосинтеза длительного действия мелатонина можно представить данные о его способности подавлять уровень транскриптов ключевых генов деградации хлорофилла, например, фермента хлорофиллазы (CLH1), показанного на растениях арабидопсиса [11].

Таким образом, действие экзогенного мелатонина на фотосинтетические реакции в листе огурца находится в зависимости от его концентрации и продолжительности воздействия на корень. С увеличением концентрации экзогенного мелатонина, используемого для корневой обработки, уменьшалось время последствия для активации фотосинтеза, транспирации и устьичной проводимости листа огурца. Подобная закономерность установлена для повышения интенсивности перекисного окисления липидов, содержания пролина и активации гваякол-зависимой пероксидазы. Предполагается одновременное функционирование параллельных механизмов действия мелатонина на фотосинтез: вовлечение его в регуляцию водного обмена устьичных клеток, обеспечивая регуляцию обмена CO<sub>2</sub>, и изменение уровня активных форм кислорода, участвующих в ретроградном сигналинге хлоропластов.

Статья написана в рамках научного проекта, выполненного при поддержке Программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J.* Melatonin and its relationship to plant hormones // *Ann. Bot.* 2018. V. 121. P. 195. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx114>
2. *Zheng X., Tan D.X., Allan A.C., Zuo B., Zhao Y., Reiter R.J., Wang L., Wang Z., Guo Y., Zhou J., Shan D., Li Q., Han Z., Kong J.* Chloroplastic biosynthesis of melatonin and its involvement in protection of plants from salt stress // *Sci. Rep.* 2017. V. 7: e41236. <https://doi.org/10.1038/srep41236>
3. *Sharif R., Xie C., Zhang H., Arnao M.B., Ali M., Ali Q., Muhammad I., Shalmani A., Nawaz M.A., Chen P., Li Y.* Melatonin and its effects on plant systems // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 2352. <https://doi.org/10.3390/molecules23092352>
4. *Wei J., Li D.X., Zhang J.R., Shan C., Rengel Z., Song Z.B., Chen Q.* Phytomelatonin receptor PMTR1-mediated signaling regulates stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // *J. Pineal Res.* 2018. V. 65: e12500. <https://doi.org/10.1111/jpi.12500>
5. *Zhang N., Zhang H., Sun Q., Cao Y., Li X., Zhao B., Wu P., Guo Y.* Proteomic analysis reveals a role of melatonin in promoting cucumber seed germination under high salinity by regulating energy production // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00566-1>
6. *Galano A., Medina M.E., Tan D.X.* Melatonin and its metabolite as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis // *J. Pineal Res.* 2015. V. 58. P. 107. <https://doi.org/10.1111/jpi.12196>
7. *Zhang N., Sun Q., Zhang H., Cao Y., Weeda S., Ren S., Guo Y.D.* Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 647. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru336>
8. *Wang L.Y., Liu J.L., Wang W.X., Sun Y.* Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress // *Photosynthetica.* 2016. V. 54. P. 19. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0140-3>
9. *Холодова В.П., Васильев С.В., Ефимова М.В., Воронин П.Ю., Рахманкулова З.Ф., Данилова Е.Ю., Кузнецов Вл.В.* Экзогенный мелатонин защищает растения рапса от токсического действия избытка меди // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. С. 463. <https://doi.org/10.1134/S0015330318060088>
10. *Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Карначук Р.А.* Роль мелатонина в регуляции ИУК-зависимых реакций растений в разных условиях освещения // *Вестн. Томск. гос. ун-в. Биол.* 2017. № 37. С. 144. <https://doi.org/10.17223/19988591/37/8>
11. *Weeda S., Zhang N., Zhao X., Ndip G., Guo Y., Buck G.A., Fu C., Ren S.* *Arabidopsis* transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // *PLoS One.* 2014. V. 9: e93462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093462>
12. *Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Видершпан А.Н., Лантев Н.И.* Возрастные морфофизиологические и биохимические изменения у растений *Lactuca sativa* L. под влиянием селена и света разной интенсивности // *Сельскохозяйственная биология.* 2018. Т. 53. № 5. С. 1025. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.5.1025rus>
13. *Головацкая И.Ф., Бендер О.Г., Ефимова М.В., Бойко Е.В., Малофий М.К., Мурган О.К., Плюснин И.Н.* Роль экзогенных стероидных фитогормонов в регуляции функционирования фотосинтетического

- аппарата растений // Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Томск, 2018. С. 103.
14. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302.
  15. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical // *Nature.* 1958. V. 181. P. 1199.
  16. 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.
  17. Ефимова М.В., Коломейчук Л.В., Бойко Е.В., Малофий М.К., Видершпан А.Н., Плюснин И.Н., Головацкая И.Ф., Мурган О.К., Кузнецов Вл.В. Физиологические механизмы устойчивости растений *Solanum tuberosum* L. к хлоридному засолению // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. С. 196.  
<https://doi.org/10.7868/S001533031803003X>
  18. Esen A.A. Simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein // *Anal. Biochem.* 1978. V. 89. P. 264.
  19. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдралилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: Synchronobook. 2013. 310 с.
  20. Бойко Е.В., Головацкая И.Ф. Влияние предпосевной обработки мелатонином и селенитом натрия на прорастание семян // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: материалы XIII Международного симпозиума. Москва, 2019. С. 135.
  21. Zhang N., Sun Q.Q., Li H.F., Li X.S., Cao Y.Y., Zhang H.J., Li S.T., Zhang L., Qi Y., Ren S.X., Zhao B., Guo Y.D. Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. Art. 222.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00197>
  22. Yang X.L., Xu H., Li D., Gao X., Li T.L., Wang R. Effect of melatonin priming on photosynthetic capacity of tomato leaves under low-temperature stress // *Photosynthetica.* 2018. V. 56. P. 884.  
<https://doi.org/10.1007/s11099-017-0748-6>
  23. Li C., Tan D.X., Liang D., Chang C., Jia D., Ma F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behavior in two *Malus* species under drought stress // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 669.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru476>
  24. Yoon Y., Kim M., Park W. Foliar accumulation of melatonin applied to the roots of maize (*Zea mays*) seedlings // *Biomolecules.* 2019. V. 9. P. 26.  
<https://doi.org/10.3390/biom9010026>
  25. Li H., Chang J., Zheng J., Dong Y., Liu Q., Yang X., Wei C., Zhang Y., Ma J., Zhang X. Local melatonin application induces cold tolerance in distant organs of *Citrullus lanatus* L. via long distance transport // *Sci. Rep.* 2017. V. 7: e40858.  
<https://doi.org/10.1038/srep40858>
  26. Ye J., Wang S., Deng X., Yin L., Xiong B., Wang X. Melatonin increased maize (*Zea mays* L.) seedling drought tolerance by alleviating drought-induced photosynthetic inhibition and oxidative damage // *Acta Physiol. Plant.* 2016. V. 38. P. 48.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-015-2045-y>
  27. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 2. С. 35.
  28. Foyer C.H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis // *Environ. Exp. Bot.* 2018. V. 154. P. 134.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
  29. Lee K., Hwang O.J., Reiter R.J., Back K. Flavonoids inhibit both rice and sheep serotonin N-acetyltransferases and reduce melatonin levels in plants // *J. Pineal Res.* 2018. V. 65: e12512.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12512>
  30. Кузнецов В.В. Хлоропласты. Структура и экспрессия пластидного генома // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. С. 243.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330318040012>