

УДК 581.522.4

РЕГУЛЯЦИЯ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ФИТОХРОМ-АКТИВИРУЮЩИМ
СВЕТОМ

В.Ю. Любимов, В.Д. Креславский, Г.Н. Ширшикова, А.А. Кособрюхов

REGULATION OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT POTENTIAL
BY IRRADIATION OF PLANT LEAVES WITH PHYTOCHROME-ACTIVATING
LIGHT

V.Yu. Lyubimov, V.D. Kreslavski, G.N. Shirshikova, A.A. Kosobryukhov

В листьях зелёных растений функционируют, помимо ряда других, две сигнально-регуляторные системы – светозависимая фитохромная и окислительная, функционирующая, прежде всего, на основе АФК. Последняя, в зависимости от абсолютной величины пула $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 и его динамики, может также запускать окислительный метаболизм углеродных соединений и синтез ферментов антиоксидантной защиты. В данной работе в экспериментах на проростках растений салата (*Lactuca sativa* L.) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*, экотип Columbia-0) исследовалась возможность взаимодействия этих двух систем. Показано, что при увеличении дозы КС от 0,6 до 3,6 кДж м⁻² происходит незначительное снижение активности каталазы и двухфазное изменение активности общей и аскорбатпероксидазы. Зависимость пула H_2O_2 от дозы КС носит зеркально отражённый характер по отношению к активности пероксидаз, а участие в этих процессах фитохрома-В подтверждается тем, что ДКС в значительной степени снижает КС-индуцированное изменение про-антиоксидантного потенциала. УФ-А облучение листьев салата приводило к почти двухкратному снижению активности ФС-2, вероятно в результате окислительного стресса и окислительного повреждения фотосистемы. Предоблучение КС в значительной степени снимало это ингибирование, возможно через снижение окислительной нагрузки на фотосинтетический аппарат. То же было экспериментально обнаружено и с помощью такого интегрального показателя как фотосинтетическая ассимиляция CO_2 . Причём, ингибирование ультрафиолетом и протекторная роль фитохромной системы были обнаружены по скорости нетто-ассимиляции углекислоты, но почти не затрагивали устьичную проводимость. Таким образом, полученные результаты можно интерпретировать как наличие регуляции про-/антиоксидантного потенциала фитохромной системой. Этот процесс существенно зависит от дозы КС-облучения и при оптимальной дозировке является механизмом, защищающим фотосинтетический аппарат от повреждения окислительным стрессом.

аскорбатпероксидаза, дальний красный свет, каталаза, красный свет, пероксид водорода, пероксидаза, фитохром, ФС 2, фотосинтез

In green leaves of plants, in addition to a number of others, two signal-regulatory systems operate – light-dependent phytochromic and oxidative – operating,

first of all, on the basis of the ROS. The latter of them, depending on the absolute value of the pool of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 and its dynamics, can also run the oxidative metabolism of carbon compounds and synthesis enzymes of the antioxidant defense. In this work, in experiments on seedlings of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0) we studied the possibility of the interaction between these two systems. It is shown that under the increasing dose of the RL from 0,6 up to 3.6 kJ m^{-2} a slight decrease in the activity of catalase and two-phase changes in the activity of general and ascorbate peroxidase occur. The dependence of H_2O_2 pool on RL-dose is mirrored in relation to the activity of peroxidase, and the participation in these processes of phytochrome-B is confirmed by the fact that FRL-irradiation significantly reduces the RL-induced change of prooxidant-antioxidant potential. UV-A irradiation of lettuce led to a twofold decrease of activity PS-2, probably as a result of the oxidative stress and the oxidative damage of photosystem membranes. Preillumination by RL significantly prevented this inhibition, possibly by reducing the oxidative stress on the photosynthetic apparatus. The same was experimentally observed with the aid of the integral process – photosynthetic CO_2 assimilation. Moreover, the inhibition by UV and the protective role of phytochromic systems were found with the net assimilation of carbon dioxide only, but almost not touched on stomatal conductance. Thus, the obtained results can be interpreted as the presence of regulation of prooxidant-antioxidant potential by the phytochromic system. This process significantly depends on the dose of RL-irradiation and, at the optimal dosage it is a mechanism that protects the photosynthetic apparatus against the damage from the oxidative stress.

ascorbate peroxidase, catalase, far red light, hydrogen peroxide, red light, peroxidase, phytochrom, photosynthesis, PS 2

ВВЕДЕНИЕ

Прооксидантно-антиоксидантный потенциал (ПАП) мезофильных клеток листьев растений является во многом определяющим фактором функционирования всех жизненно важных процессов фотоавтотрофной клетки: генетических, энерго-трансформирующих и метаболических. Основными параметрами, определяющими ПАП, являются стационарный пул активных форм кислорода (АФК) (главным образом $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2), а также активность утилизирующих эти АФК ферментов. Эти параметры могут изменяться под воздействием как экзогенных факторов (биотические и абиотические стрессоры), так и ряда эндогенных регуляторных систем. Одним из таких механизмов является светозависимая фитохромная система.

Фитохромы, и прежде всего фитохромы В и А, являются одними из ключевых фоторецепторов, реагирующих на качество света. В литературе имеется немало работ, которые посвящены изучению роли фитохрома В как индикатора соотношения красного света к дальнему красному (КС/ДКС) в спектре падающего излучения или ФхА, реагирующего на ДКС, в формировании защитных реакций фотосинтетического аппарата при действии различных стрессоров или в процессе старения [1-3]. Защитное действие облучения оранжево-красного света, предположительно за счет индукции образования активной формы ФхВ, обнаружено при исследовании действия УФ-В на активность фотосинтетического аппарата семядольных листьев проростков *Vigna sinensis* L. [4]. Обнаружено вовлечение фитохромной системы в защитное действие фотосинтетического аппарата против УФ-

радиации на листьях шпината [5, 6] и салата [7]. Одной из причин повышенной устойчивости к УФ-радиации может быть повышение активности в листьях ключевых антиоксидантных ферментов при действии предоблучения оражево-красным светом, которое приводит к повышению доли активной формы фитохрома В и, соответственно, к снижению содержания оксидантов в ответ на облучение УФ-радиацией и действие других стрессоров, вызывающих развитие окислительного стресса.

Целью настоящей работы было исследование возможного регулирования ПАП фототрофных клеток высших растений фотосенсибилизированной фитохромной сигнальной системой $\text{ФхВ}_k \rightleftharpoons \text{ФхВ}_{\text{дк}}$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 3-недельных проростках растений салата (*Lactuca sativa* L.) и арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*, экотип Columbia-0). Растения выращивали в контролируемых условиях: 12 ч темнота, 21°C, 12 ч свет (120 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), 25°C. Для создания стрессового состояния растения облучали в течение 40 мин УФ-А от лампы Т8 18W BLB (Selecta) с $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ нм}$, $\lambda_{1/2} = 24 \text{ нм}$, $I = 8\text{--}12 \text{ Вт м}^{-2}$ на поверхности листа. Предварительное освещение красным светом (КС: $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ нм}$, $\lambda_{1/2} = 32 \text{ нм}$) осуществляли с помощью светодиодной панели, а дальним красным (ДКС: $\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ нм}$, $\lambda_{1/2} = 12 \text{ нм}$) светом – от лампы накаливания через интерференционный светофильтр.

Активность общей пероксидазы измеряли спектрофотометрически, используя в качестве субстрата 3,3'-диаминобензидин-НСI ($\lambda = 450 \text{ нм}$, $E = 4,4 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Активность аскорбат пероксидазы измеряли спектрофотометрически по методу [8]. Активность каталазы измеряли стандартным спектрофотометрическим методом ($\lambda = 240 \text{ нм}$, $E = 43,6 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Пероксид водорода измеряли билюминесцентным методом [9] с некоторыми модификациями [10]. Скорость фотосинтеза измеряли на проростках инфракрасным газоанализатором Infralyt 4 (Infralyt GmbH, Marburg, Germany) в замкнутой системе при насыщающей интенсивности света. Измерение фотохимической активности ФС 2 подробно описано [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функционирование фитохромной системы, регулирующей многие биохимические и физиологические процессы как в фототрофных, так и гетеротрофных тканях растений, может, по-видимому, зависеть от дозы поглощённого Фх-активного излучения (для $\text{ФхВ}_k \rightarrow \text{ФхВ}_{\text{дк}}$ это свет с $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ нм}$). Мы исследовали зависимость состояния ПАП в листьях арабидопсис от дозы падающего на объект КС (рис. 1). ПАП характеризовали как комплекс показателей активности H_2O_2 -восстанавливающих ферментов (ДАБ-пероксидазы и каталазы) и стационарного уровня пероксида водорода (СУП).

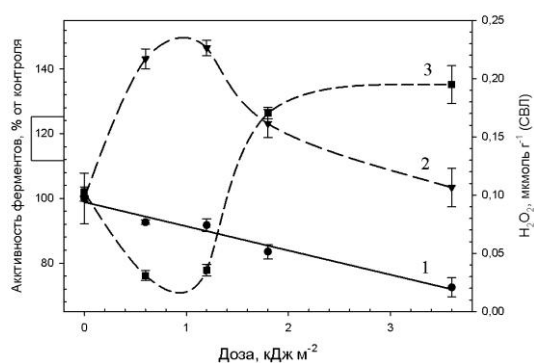


Рис. 1. Влияние дозы облучения КС ($\square=660$ нм, 1 Вт м^{-2}) на активность каталазы (1), пероксидазы (2) и стационарного пула пероксида водорода (3) в листьях арабидопсиса
 Fig. 1. Influence of dose of RL-irradiation ($\square=660$ nm, 1 W м^{-2}) upon activity of catalase (1), peroxidase (2), and stationary pool of hydrogen peroxide (3) in *Arabidopsis* leaves

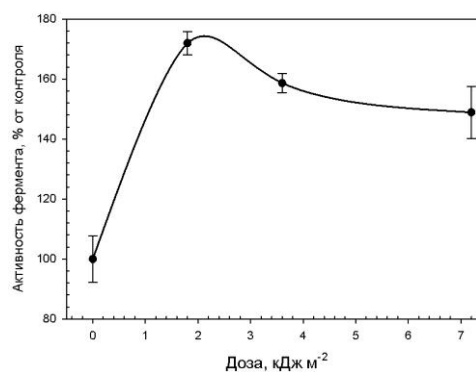


Рис. 2. Влияние дозы облучения КС ($\square=660$ нм, 1 Вт м^{-2}) на активность аскорбатпероксидазы в листьях салата
 Fig. 2. Influence of dose of RL-irradiation ($\square=660$ nm, 1 W м^{-2}) upon activity of ascorbate peroxidase in lettuce leaves

Было установлено, что при увеличении дозы КС от 0 до $3,6 \text{ кДж м}^{-2}$ (1 Вт м^{-2} , 60 мин) активность каталазы линейно снижалась до 80% от контрольного уровня. Однако характер изменения СУП не коррелировал с монотонным незначительным снижением каталазной активности: при низкой КС-облучённости, когда активность каталазы близка к контрольной, количество H_2O_2 снижалось на 20-25%, а при более высоких дозах КС кривая H_2O_2 проходила через контрольный уровень и затем превышала его на 30-35%. Процесс, ответственный за такое изменение СУП, был обнаружен при измерении активности ДАБ-пероксидазы: в области низких доз КС активность фермента превышала контрольный уровень на 40-45%, а при максимальной дозе приближалась к контрольному уровню (рис. 2). Эти результаты показывают, что существенно Фх-регулируемым ферментом, контролирующим ПАП, является пероксидаза, а не каталаза. Помимо цитоплазматических пероксидаз в хлоропластах функционирует мощный механизм детоксикации АФК – аскорбатпероксидазная система [8]. Дозовая кривая этого фермента по КС, промеренная на листьях салата, обнаружила ту же тенденцию, что и ДАБ-окисляющие пероксидазы. Для доказательства того, что при КС-облучении листьев высших растений изменения ПАП происходят благодаря функционированию именно фитохромной системы, был проведён эксперимент с использованием облучения дальним красным светом после КС (рис. 3). Такая схема облучения приводит к тому, что в том диапазоне доз КС, при которых пероксидазы активируются, наблюдалось частичное снятие эффекта (на 25-35%), что доказывает участие в регуляции ПАП системы $\text{ФхВ}_к \rightleftharpoons \text{ФхВ}_{дк}$. Таким образом, можно заключить, что регуляция ПАП фитохромной системой происходит, главным образом, через активность аскорбат- и цитоплазматических пероксидаз.

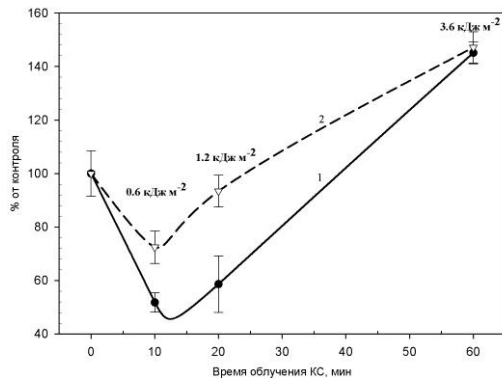


Рис. 3. Содержание перекиси водорода в листьях арабидопсиса при различных режимах КС(1)- и КС-ДКС(2)-облучения
 Fig. 3. Amount of hydrogen peroxide in Arabidopsis leaves under different RL(1)- and RL-FRL(2)-irradiation



Рис. 4. Влияние кратковременного облучения КС и ДКС на фотохимическую активность ФС 2 листьев салата после облучения УФ-А
 Fig. 4. Influence of RL- and FRL-irradiation on the photochemical activity of PS 2 in lettuce leaves after irradiation by UV-A

Известно, что разнообразные стрессы могут приводить в результате нарушения нормального дыхания и фотосинтеза к увеличению образования АФК, что может негативно отражаться на энергозапасующих и метаболических процессах. Одним из таких факторов является УФ-облучение. В наших экспериментах (рис. 4) такое воздействие приводило к значительному снижению фотохимической активности ФС 2 (кр. УФ). Активация фитохромной системы (кр. КС+УФ) частично (15-20%) снимала ингибирующее действие стрессора. Это неполное снятие ингибирования можно, исходя из наших данных, отнести на счёт сдвига ПАП к более восстановительному состоянию. Под действием УФ-стресса происходит резкое ингибирование (рис. 5, А, на 60-80%) ассимиляции CO₂. При этом устьичная проводимость снижается только на 20-35% (рис. 5, Б). Предоблучение КС снимает ингибирующий эффект стрессора по CO₂ на 40%, почти не влияя на проводимость. Анализ данных, представленных на рис. 4 и 5, даёт возможность заключить, что помимо некоторых известных на сегодня процессов под действием ФxВ_к ↔ ФxВ_{дк} через активность пероксидаз происходит регуляция ПАП, способствующая более эффективной работе фотосинтетического аппарата.

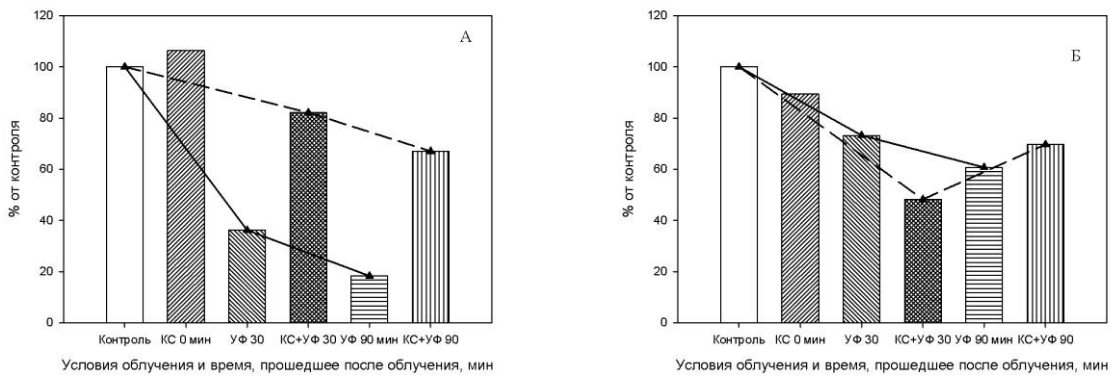


Рис. 5. Влияние УФ-А и предварительного КС-облучения на ассимиляцию CO₂ (А) и транспирацию (Б) листьев арабидопсис
 Fig. 5. Influence of UV-A and preliminary RL-irradiation upon the CO₂ assimilation (A) and transpiration (B) in *Arabidopsis* leaves

Работа поддержана грантами РФФИ №12-04-01035, 12-04-92101 и 13-04-91372.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Thiele, A. Heterologous expression of arabidopsis phytochrome B intragenic potato influences photosynthetic performance and tuber development / A. Thiele [and et.] // *Plant Physiol.* – 1999. – № 120. – Pp. 73-81.
2. Franklin, K.A. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development / K.A. Franklin, P.H. Quail // *J Exp. Bot.* – 2010/ – № 61. – Pp.11-24.
3. Carvalho, R.F. The role of phytochrome in stress tolerance / R.F. Carvalho, M.L. Campos, R.A. Azevedo // *J. Integr. Plant Biol.* – 2011. – № 53. – Pp. 920-929.
4. Lingakumar, K. Regulatory role of phytochrome on ultraviolet_b (280–315 nm) induced changes in growth and photosynthetic activities of *Vigna sinensis* L. / K. Lingakumar, G. Kulandaivelu // *Photosynthetica.* – 1993. – № 29. – Pp. 341-351.
5. Креславский, В.Д. Низкоэнергетический красный свет в области длин волн 620-660 нм уменьшает УФ-В-индуцированное уменьшение повреждения фотосистемы II в листьях шпината / В.Д. Креславский, А.А. Иванов, А.А. Кособрюхов // *Биофизика.* – 2004. – Т. 49, №5. – С. 840-844.
6. Креславский, В.Д. Предоблучение отделенных листьев шпината красным светом повышает устойчивость фотосинтетического аппарата к УФ-радиации / В.Д. Креславский [и др.] // *Физиология растений.* – 2012. – Т. 59, № 6. – С. 723-729.
7. Kreslavski, V.D. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A / V.D. Kreslavski [and et.] // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2013. – № 122. – Pp. 1-6.
8. Nakano, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // *Plant Cell Physiol.* – 1981. – № 22. – С. 867-880.
9. Cormier, M.J. An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques / M.J. Cormier, P.M. Prichard // *J. Biol. Chem.* – 1968. – № 243. – Pp. 4706-4714.

10. Любимов, В.Ю. Роль перекиси водорода в фотодыхании C₄-растений / В.Ю. Любимов, О.М. Застрижная // Физиол. раст. – 1992. – № 39. – С. 701-710.

11. Mehta, P. Analysis of salt stress induced changes in PS II heterogeneity by prompt fluorescence and delayed fluorescence in wheat (*Triticum vulgare*) / P. Mehta [and et.] // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 2011. – № 104. – Pp. 308-313.

REFERENCES

1. Thiele A., Herold M., Lenk I., Quail P.H., Gatz C. *Heterologous expression of arabidopsis phytochrome B intransgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development*. Plant Physiol., 1999, vol. 120, pp. 73-81.

2. Franklin K.A., Quail P.H. *Phytochrome functions in Arabidopsis development*. J Exp. Bot., 2010, vol. 61, pp. 11-24.

3. Carvalho R.F., Campos M.L., Azevedo R.A. *The role of phytochrome in stress tolerance*. J. Integr. Plant Biol., 2011, vol. 53, pp. 920-929.

4. Lingakumar K., Kulandaivelu G. *Regulatory role of phytochrome on ultraviolet_b (280–315 nm) induced changes in growth and photosynthetic activities of Vigna sinensis L*. Photosynthetica, 1993, vol. 29, pp. 341-351.

5. Kreslavskij V.D., Ivanov A.A., Kosobryuhov A.A. *Nizkojenergeticheskij krasnyj svet v oblasti dlin voln 620-660 nm umen'shaet UF-V-inducirovannoe umen'shenie povrezhdenija fotosistemy II v list'jah shpinata*. [The low-energetic red light in the wave length 620-660 nanometer decreases UV-B-induced reduction of the photosystem II damages in spinach leaves]. Biofizika, 2004, vol. 49, no. 5, pp. 840-844.

6. Kreslavskij V.D., Hristin M.S., Shabnova N.I., Ljubimov V.Ju. *Predoblučenje otdeľennykh list'ev shpinata krasnym svetom povyshaet ustojchivost' fotosinteticheskogo apparata k UF-radiacii*. [Preradiation of detached spinach leaves with red light increases the resistance of the photosynthetic apparatus to UV-radiation]. Fiziologija rastenij [Plant physiology]. 2012, vol. 59, no. 6, pp. 723-729.

7. Kreslavski V.D., Lyubimov V.Yu., Shirshikova G.N., Shmarev A.N., Kosobryukhov A.A., Schmitt F.-J., Friedrich T., Allakhverdiev S.I. *Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 2013, vol. 122, pp. 1-6.

8. Nakano Y, Asada K. *Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts*. Plant Cell Physiol., 1981, vol. 22, pp. 867-880

9. Cormier M.J., Prichard P.M. *An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques*. J. Biol. Chem., 1968, vol. 243, pp. 4706-4714

10. Ljubimov V. Ju., Zastrizhnaja O.M. *Rol' perekisi vodoroda v fotodyhanii S4-rasteniy*. [The role of peroxide in photorespiration]. Fiziol. rast. [plant physiology], 1992, vol. 39, pp. 701-710.

11. Mehta P., Kreslavski V., Bharti S., Allakhverdiev S.I., Anjana A. *Analysis of salt stress induced changes in PS II heterogeneity by prompt fluorescence and delayed fluorescence in wheat (Triticum vulgare)*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 2011, vol. 104, pp. 308-313.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Любимов Валерий Юрьевич – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, старший научный сотрудник, д.б.н., ведущий научный сотрудник, E-mail: valyu@stack.online.net

Lyubimov Valeriy Yurievich – Institute of Basic Biological Problems RAS, Senior Researcher, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, E-mail: valyu@stack.online.net

Креславский Владимир Данилович – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, старший научный сотрудник, д.б.н., ведущий научный сотрудник, E-mail: vkreslav@rambler.ru

Kreslavskiy Vladimir Danilovich – Institute of Basic Biological Problems RAS, Senior Researcher, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, E-mail: vkreslav@rambler.ru

Ширшикова Галина Николаевна – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, старший научный сотрудник, к.б.н., E-mail: gsh99@rambler.ru

Shirshikova Galina Nicolaevna – Institute of Basic Biological Problems RAS, Senior Researcher, Candidate of Biological Sciences, E-mail: gsh99@rambler.ru

Кособрюхов Анатолий Александрович – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, д.б.н., старший научный сотрудник, E-mail: kosobr@rambler.ru

Kosobryukhov Anatoliy Alexanderovich – Institute of Basic Biological Problems RAS, Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, E-mail: kosobr@rambler.ru