

УДК 577.342

*Е. В. ВЯЗОВ, Н. В. КОЗЕЛ, В. П. ДОМАНСКИЙ, Н. В. ШАЛЫГО***АКТИВНОСТЬ АСКОРБАТ-ГЛУТАТИОНОВОГО ЦИКЛА В РАСТЕНИЯХ ОГУРЦА
(*CUCUMIS SATIVUS*) В УСЛОВИЯХ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ***Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: viazau@yahoo.com**(Поступила в редакцию 10.10.2013)*

Введение. Светодиодные источники освещения являются весьма перспективными с точки зрения использования их для выращивания растений в условиях закрытого грунта. С одной стороны, это обусловлено низким энергопотреблением, высоким коэффициентом светоотдачи и длительным сроком службы таких источников, а с другой стороны, светодиоды позволяют сконструировать осветитель с определенным спектральным составом излучения, что крайне важно при разработке высокоэффективного источника фотосинтетически активного света [1–3]. Наибольший интерес представляют новые сверхъяркие светодиоды со светоотдачей, превышающей 100 лм/Вт и сроком службы более 5000 ч. Подобные светодиоды с длительным сроком службы были впервые представлены крупными производителями светодиодной техники в 2005 г., а стали широко доступными на рынке уже в 2009 г. Такое стремительное развитие светодиодной отрасли делает весьма актуальной проблему создания новых энергоэффективных осветителей на основе светодиодов для выращивания растений.

Однако внедрение светодиодных осветителей в сельскохозяйственный процесс имеет ряд трудностей. В первую очередь они обусловлены сложностью подбора оптимального спектрального состава такого освещения. Ранее в экспериментах по изучению влияния узкополосного излучения красных и синих светодиодов и их совместного действия на динамику окислительных процессов в растениях огурца нами было показано, что светодиодное освещение с одной спектральной полосой (синей либо красной) оказывает существенное стрессовое воздействие на растительный организм, выражающееся в накоплении активных форм кислорода (АФК), в том числе пероксида водорода, а также интенсификации процессов пероксидного окисления липидов в листьях огурца [4]. Совместное действие синего и красного узкополосного света также приводило к накоплению в них АФК и деструкции мембран, хотя и в меньшей степени, что указывает на наличие стрессовых условий.

Известно, что уровень АФК в растениях контролируется антиоксидантной системой, в состав которой входят низкомолекулярные соединения, из которых наиболее важными для растительной клетки являются аскорбат, токоферол, глутатион и каротиноиды, а также специфические антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза (АПО), глутатионредуктаза (ГР), каталаза [5–7]. В детоксикации одной из АФК – пероксида водорода (H_2O_2) – в растительной клетке важное значение играет аскорбат-глутатионовый цикл, механизм функционирования которого заключается в восстановлении H_2O_2 до воды с участием аскорбата и АПО. Аскорбат в этой реакции окисляется до дегидроаскорбата, который вновь превращается в восстановленную форму за счет восстановленного глутатиона. При этом восстановленный глутатион превращается в окисленную форму, которая в свою очередь восстанавливается в НАДФ-Н-зависимой реакции с участием фермента ГР [6, 8]. Исследование активности аскорбат-глутатионного цикла может дать представление о степени развития окислительного стресса в растениях, а также о характере протекания окислительных процессов и способности растительного организма сопротивляться стрессовому воздействию.

Целью данной работы стало изучение особенностей функционирования аскорбат-глутатионового цикла в растениях огурца при светодиодном освещении для выявления механизмов протекания окислительного стресса в растениях при использовании светодиодов.

Объект и методы исследования. В опытах использовали растения огурца (*Cucumis sativus* L.) тепличного сорта Кураж, районированного в Республике Беларусь, выращенные в лабораторных условиях под люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/765 в режиме 14 ч света (5 Вт/м²) и 10 ч темноты при температуре 23±1°C и относительной влажности воздуха 65±5 % до появления зачатка первого листа, что составляло в среднем 13 сут. Затем растения непрерывно освещали синим (450–465 нм, вариант «Синий»), красным (630–650 нм, вариант «Красный»), а также одновременно красным и синим светом с отношением числа светодиодов 2:1 соответственно (вариант «Кр.+Синий»), используя светильники со светодиодами XLamp фирмы Cree до полного развития первого листа (8 сут). Потребляемая мощность одного светодиода 1 Вт. Контролем служили растения огурцов, выращенные в указанном выше световом режиме и далее непрерывно освещаемые в течение 8 сут белым светом люминесцентной лампы (вариант «Белый») с потребляемой мощностью 18 Вт. Все указанные светильники были выравнены по интенсивности освещения, которая составляла 5 Вт/м². Во всех экспериментах для анализа брали первый лист.

Для количественного определения общего и восстановленного аскорбата использовали спектрофотометрический метод, в основе которого лежит реакция восстановления аскорбатом Fe³⁺ до Fe²⁺ [9]. Навеску растительного материала (0,5 г) растирали до гомогената на холоду в 5 % сульфосалициловой кислоте. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g, а затем проводили нейтрализацию супернатанта с помощью 5 М NaOH до pH 6,0. Для определения общего аскорбата к 200 мкл нейтрализованного экстракта добавляли 50 мкл 10 мМ дитиотреитола и 50 мкл 40 мМ раствора N-этилmaleимида, а для определения восстановленного аскорбата к такому же объему нейтрализованного экстракта приливали 100 мкл дистиллированной воды. Затем к растворам, содержащим как общий, так и восстановленный аскорбат, последовательно добавляли 200 мкл 10 % ТХУ, 200 мкл 44 % фосфорной кислоты, 200 мкл 4 % 2,2'-дипиридила и 100 мкл 3%-ного раствора FeCl₃. Контрольная проба вместо экстракта содержала разбавленный K-Na-фосфатный буфер (pH 7,4) и проходила такую же обработку, как и опытные образцы. Все пробы инкубировали 60 мин при 30 °С, после чего проводили их спектрофотометрический анализ при длине волны поглощаемого света 524 нм. Концентрацию аскорбата определяли используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon = 8,7 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [10].

Количественное определение окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона проводили согласно методу [11], модифицированному в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [12]. В основе данного метода лежит способность о-фталевого альдегида образовывать флуоресцирующий продукт с GSSG при pH 12,0 и с GSH при pH 8,0. Для экстракции GSSG и GSH навески (0,5 г) листьев огурца растирали в фарфоровой ступке в 4 мл смеси, состоящей из 0,1 М K-Na-фосфатного буфера (pH 8,0) и 25%-ного раствора метафосфорной кислоты в соотношении 3,75:1 (по объему), гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 8000 g, после чего надосадочную жидкость повторно центрифугировали 5 мин при 13000 g. Полученный супернатант использовали для спектрофлуориметрического определения GSSG и GSH, как описано в работе [12].

Для определения активности АПО (ЕС 1.11.1.11) использовали реакцию восстановления пероксида водорода аскорбатом, катализируемую АПО [10]. Для получения грубого ферментного препарата АПО 0,5 г растений гомогенизировали в 4 мл охлажденного 50 мМ K-Na-фосфатного буфера (pH 7,8), содержащего 1 мМ ЭДТА и 10 мМ аскорбата натрия. Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин при 4 °С. Активность АПО определяли по кинетике потребления аскорбата, регистрируя изменение оптической плотности при 290 нм в течение 20 с ($\epsilon = 2,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Реакционная среда содержала 50 мМ K-Na-фосфатный буфер (pH 7,0), 1 мМ ЭДТА, 1 мкМ H₂O₂ и 50 мкл грубого ферментного препарата.

Активность ГР (ЕС 1.6.4.2) определяли по [13]. Для получения грубого ферментного препарата ГР навеску растительного материала весом 0,5 г растирали в фарфоровой ступке в 4 мл охлажденного 0,1 М K-Na-фосфатного буфера (pH 7,8), содержащего 1 мМ ЭДТА и 10 мМ аскорба-

та натрия. Гомогенат центрифугировали при 15000 g 15 мин при 4 °С. Активность ГР определяли по кинетике окисления НАДФ-Н в присутствии окисленного глутатиона, которую регистрировали по уменьшению оптической плотности при 340 нм в течение 5 мин ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Реакционная среда содержала 0,1 М К-На-фосфатный буфер (рН 7,8), 0,2 мМ НАДФ-Н, 0,2 мМ окисленный глутатион и 200 мкл ферментного препарата.

Содержание белка определяли по методу Bradford [14], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

При определении активности ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов использовали реактивы фирмы Sigma (США), а также в некоторых случаях реактивы аналитической чистоты других производителей. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре Uvikon 931 фирмы «Kontron» (Германия), флуориметрические анализы осуществляли с помощью спектрофлуориметра Solar CM 2203 (Беларусь).

Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные из трех независимых опытов. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 11.2.

Результаты и их обсуждение. Анализ содержания аскорбата и глутатиона в листьях огурца показал существенные изменения в их количестве при светодиодном освещении по сравнению с контролем (белый свет). Установлено, что в листьях растений, выращенных под красными, а также под красными и синими светодиодами совместно, снижается содержание как общего аскорбата, так и его физиологически активной формы – восстановленного аскорбата (рис. 1, а). Причем в варианте с использованием совместно красных и синих светодиодов потребление аскорбата в листьях огурца было более значительным – количество общего аскорбата снизилось на 47 % и на 40 % восстановленного по сравнению с контролем. В то же время в листьях огурца, находившихся под синими светодиодами, общее содержание аскорбата, напротив, увеличивалось (примерно на 40 %) относительно растений, выращенных под белым светом, что указывает на синтез в таких растениях аскорбата *de novo*. Однако уровень восстановленной формы антиоксиданта в варианте с использованием синих светодиодов снижался относительно контроля в среднем на 30 %.

Анализ содержания GSH и GSSG в условиях светодиодного освещения позволил выявить в некоторых вариантах увеличение GSH при практически неизменном содержании GSSG (рис. 1, б). Так, значительное увеличение содержания GSH наблюдали в листьях растений, выращенных под осветителем с красными и осветителем с синими светодиодами – на 51 и 53 % по сравнению с контролем соответственно. При использовании совместно красных и синих светодиодов достоверного изменения в содержании обеих форм глутатиона относительно контроля зафиксировано не было. Выявленное увеличение количества глутатиона (преимущественно восстановленной формы) в варианте с красным и в варианте с синим светодиодным освещением связано с его эффективным

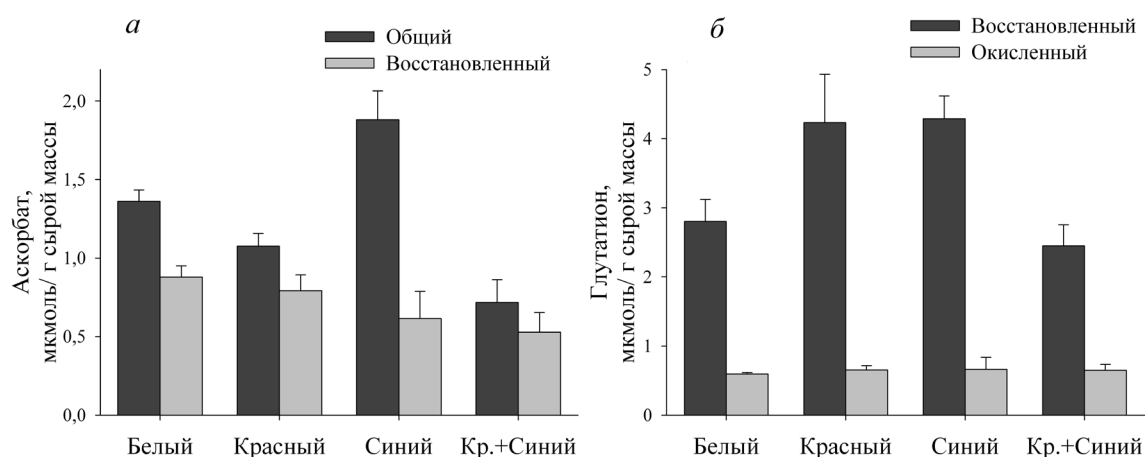


Рис. 1. Изменение содержания общего и восстановленного аскорбата (а), а также восстановленного и окисленного глутатиона (б) в растениях огурца при светодиодном освещении (варианты «Красный», «Синий», «Кр.+Синий») или освещении люминесцентной лампой (вариант «Белый»)

синтезом *de novo* для участия в антиокислительных процессах в клетке, в том числе и в поддержании пула восстановленного аскорбата.

Изменение содержания в растениях огурца низкомолекулярных антиоксидантов аскорбата и глутатиона указывает на протекание в листьях таких растений окислительных процессов. Однако, как нами было показано ранее [15], определение количества этих компонентов защитной системы не дает информации о степени стрессового воздействия и устойчивости к нему растительного организма. Для получения более полной информации о протекании антиокислительных процессов в клетках растений необходим дополнительный анализ высокомолекулярных компонентов аскорбат-глутатионового цикла, в частности, анализ активности АПО и ГР, результаты которого представлены ниже.

Установлено, что наиболее существенные изменения активности АПО происходят лишь в растениях, находившихся под красным светом – активность фермента в листьях увеличивается более чем в 1,7 раза по отношению к контрольным растениям (рис. 2, *а*). Возрастала на 17 % активность АПО и в растениях, выращенных под светильником с красными и синими светодиодами, в то время как под одними синими светодиодами достоверного изменения активности фермента не выявлено.

В варианте с красным светом в листьях растений огурца также обнаружено значительное (на 80 %) увеличение активности второго ключевого фермента аскорбат-глутатионового цикла – ГР (рис. 2, *б*). При этом в условиях освещения растений синими светодиодами активность ГР в листьях, наоборот, снижалась и составляла менее 70 % от контроля. В варианте с совместным освещением растений красными и синими светодиодами активность АПО практически не изменялась по отношению к контрольным растениям.

Суммируя полученные результаты по содержанию аскорбата и глутатиона, а также активности АПО и ГР, можно заключить, что существенная активация аскорбат-глутатионового цикла в листьях растений огурца происходит лишь в варианте с использованием красного светодиодного освещения, что проявляется в значительном увеличении содержания восстановленного глутатиона, а также повышении активности АПО и ГР на фоне интенсивного потребления аскорбата. Для растений, находившихся под синим светом, наоборот, характерно снижение активности ГР при достаточно высоких уровнях аскорбата и глутатиона, что может быть следствием замедления функционирования аскорбат-глутатионового цикла в таких растениях.

Выявленные различия между действием на растительный организм красного и синего светодиодного освещения, видимо, связаны с разной природой окислительных процессов, инициированных таким освещением в листьях растений. Известно, что синий свет оказывает существенное регуляторное действие на рост и развитие растений. Это связано с наличием в клетках растительных организмов рецепторов синего света – фототропинов, участвующих в широком спектре реакций ответа растений на изменяющиеся световые условия, в том числе фототропизме, миграции хлоропластов, а также изменении величины открытия устьиц [16]. Как видно из рис. 3, отсут-

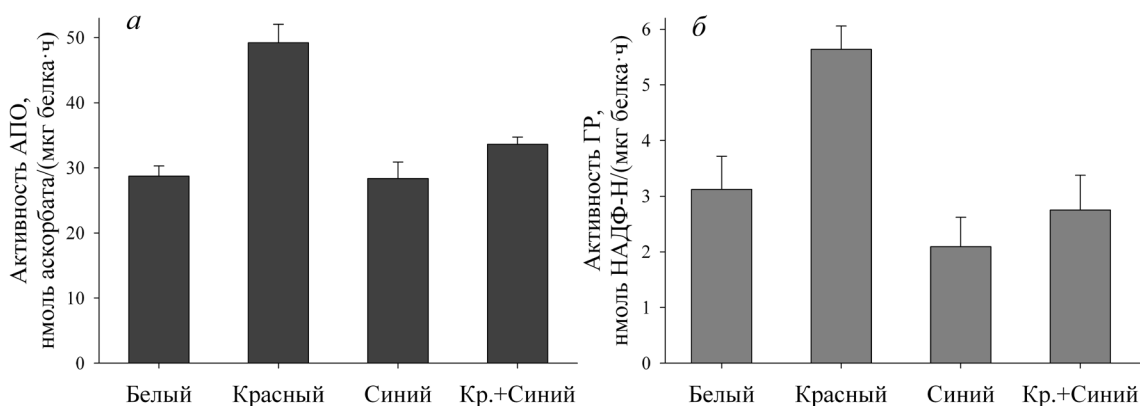


Рис. 2. Изменение активности АПО (*а*) и ГР (*б*) в растениях огурца при светодиодном освещении (варианты «Красный», «Синий», «Кр.+Синий») или освещении люминесцентной лампой (вариант «Белый»)



Рис. 3. Внешний вид растений огурца, находившихся 8 сут под светодиодным освещением (варианты «Красный», «Синий», «Кр.+Синий») или под люминесцентной лампой (вариант «Белый»)

ствии (вариант «Красный») либо избыток синего (вариант «Синий») света приводит к заметным изменениям морфометрии растений огурца. Так, для растений, находившихся под красным светом, было характерно снижение относительно контроля высоты надземной части, а также отсутствие ориентации листовой пластинки перпендикулярно к направлению падения светового потока. В то же время под синим светом, наоборот, чрезмерно увеличивалась высота растения, снижалась толщина листовой пластинки, листья содержали меньшее количество фотосинтетических пигментов [17]. Такие существенные различия в росте и развитии растений, находившихся под осветителем с красными и осветителем с синими светодиодами могут быть причиной различий в характере протекания в листьях этих растений окислительных процессов. В варианте с использованием красного света мы наблюдали схожее изменение активности аскорбат-глутатионового цикла с изменением функционирования этой защитной системы при фотоокислительном стрессе, инициируемом в клетках растений генерацией синглетного кислорода [18]. Возможно, при действии синего света в листьях растений огурца запускаются другие свободнорадикальные реакции.

Растения, находившиеся под светильником с красными и синими светодиодами, морфометрически были ближе к контрольному варианту. И хотя в них также развивался окислительный стресс, на что указывает незначительная активация АПО и интенсивное потребление аскорбата, уровень стрессового воздействия для этого варианта был ниже. Однако важно отметить, что полученные результаты указывают на то, что комбинированное использование красных и синих светодиодов недостаточно для создания полноценного освещения для выращивания растений огурца. Ранее подобный результат был получен нами при исследовании продуктивности под светодиодами сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis* [19] и является, видимо, следствием развития фотоокислительного стресса в клетках фотосинтезирующих организмов при облучении их высокими дозами света, наиболее эффективно поглощаемого светособирающими пигментами. Мы предполагаем, что расширение полос испускания светодиодного осветителя за счет использования светодиодов с максимумами излучения в желто-оранжевой и голубой области спектра без увеличения общей интенсивности светового потока позволит сконструировать более эффективный источник фотосинтетически активного света.

Сопоставляя приведенные выше данные с результатами, полученными нами ранее [4], важно подчеркнуть, что степень изменения активности аскорбат-глутатионового цикла находится в прямой зависимости от степени накопления АФК и развития деструктивных процессов в листьях растений огурца при светодиодном освещении.

Заклучение. Показано, что использование светодиодного освещения с узкой красной или синей полосой спектра излучения приводит к развитию в листьях огурца окислительного стресса, сопровождающегося изменением активности аскорбат-глутатионового цикла, участвующего в клетках растений в детоксикации пероксида водорода. Комбинированное использование красных и синих светодиодов недостаточно для создания полноценного освещения при выращивании растений огурца, на что указывает измененная по сравнению с контролем (вариант «Белый») активность аскорбат-глутатионового цикла. Предполагается, что расширение полос испускания светодиодного осветителя за счет использования светодиодов с максимумами излучения в желто-оранжевой и голубой области спектра позволит сконструировать более эффективные источники фотосинтетически активного света. При проектировании таких источников освещения определение активности аскорбат-глутатионового цикла может дать ценную информацию, а именно: нормализация функционирования активности аскорбат-глутатионового цикла будет свидетельствовать об эффективности создаваемых светильников.

Литература

1. Аверчева О. В., Бассарская Е. М., Жигалова Т. В. и др. // Физиол. растен. 2010. Т. 57. С. 404–414.
2. Мартиросян Ю. Ц., Кособрюхов А. А., Креславский В. Д. и др. // С.-х. биология. 2008. № 3. С. 102–105.
3. Бахарев И., Прокофьев А., Туркин А. и др. // Современные технологии автоматизации. 2010. № 2. С. 76–82.
4. Вязов Е. В., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 2. С. 71–74.
5. Arora A, Sairam R. K., Srivastava G. C. // Current Science. 2002. Vol. 82, N 10. P. 1227–1238.
6. Apel K., Hirt H. // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. Vol. 55, N 1. P. 373–399.
7. Asada K. // Plant Physiol. 2006. Vol. 141. P. 391–396.
8. Asada K. // Phil. Trans. R. Soc. Lond B Biol Sci. 2000. Vol. 355, N 1402. P. 1419–1431.
9. Law M. Y., Charles SA, Halliwell B. // Biochem. J. 1983. Vol. 210. P. 899–903.
10. Nakano Y., Asada K. // Plant Cell Physiol. 1981. Vol. 22, N 5. P. 867–880.
11. Hissin P. J., Hilf R. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 74, N 1. P. 214–226.
12. Шалыго Н. В., Щербакоев Р. А., Доманская И. Н. и др. // Физиол. и биохим. культ. растен. 2007. Т. 39, № 3. С. 264–270.
13. Gechev T., Gadjevi I., Breusagemet E. V. et al. // Cell. Mol. Life Sci. 2002. Vol. 59, N 4. P. 708–714.
14. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
15. Козел Н. В., Доманский В. П. // Вестн. фонда фонд. иссл. 2012. № 1. С. 89–100.
16. Briggs W., John C. // Trends in Plant Science. 2002. Vol. 7 N 5. P. 204–210.
17. Вязов Е. В., Шалыго Н. В. // Материалы Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Минск, 19–21 июня 2012 г. Мн., 2012. С. 98–101.
18. Козел Н. В., Шалыго Н. В. // Физиол. растен. 2009. Т. 56, № 3. С. 351.
19. Доманский В. П., Козел Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 3. С. 56–59.

Y. V. VIAZAU, N. V. KOZEL, V. P. DOMANSKII, N. V. SHALYGO

ACTIVITY OF ASCORBATE-GLUTATHIONE CYCLE IN CUCUMBER PLANTS (*CUCUMIS SATIVUS*) UNDER LED LIGHTING

Summary

The use of light-emitting diode lighting with a non-optimal spectral composition leads to the development of oxidative stress in cucumber leaves, accompanied by changes in the activity ascorbate-glutathione cycle.