

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИНА И ВОДНОГО ДЕФИЦИТА НА РОСТ, УРОВЕНЬ МДА И ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЙ ГИПОКОТИЛЕЙ И КОРНЕЙ ЛЮПИНА

© 2022 г. И. П. Генерозова^{а, *}, С. В. Васильев^а, П. А. Буцанец^а, А. Г. Шугаев^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: igenerozova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2022 г.

После доработки 22.03.2022 г.

Принята к публикации 27.03.2022 г.

Известно, что мелатонин способен повышать устойчивость растений к неблагоприятным абиотическим факторам (НФ), включая обезвоживание, однако механизмы подобного действия фитогормона остаются малоизученными. В работе было исследовано влияние мелатонина на рост, водный статус, уровень малонового диальдегида (МДА) и дыхание митохондрий, выделенных из различных органов этиолированных проростков люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) в условиях обезвоживания. 4-суточные проростки лишали воды на одни сутки, что вызывало увеличение водного дефицита корней до 22%, а гипокотилей до 6%. Показано, что обезвоживание проростков вызывало торможение роста гипокотилей, тогда как прирост корней был на 13% больше, чем в контроле. Содержание МДА в тканях корней и гипокотилей возрастало. Обезвоживание проростков негативно сказывалось на дыхании митохондрий гипокотилей и корней, при этом снижалась скорость окисления субстратов, особенно малата, в состоянии 3, преимущественно за счет ингибирования активности цитохромного пути окисления (ЦП). Например, при окислении малата в митохондриях гипокотилей активность ЦП снижалась в 1.8 раза, а в митохондриях корней – в 4–5 раз. Обработка проростков мелатонином (0.1 мкМ) предотвращала увеличение содержания МДА в условиях обезвоживания у гипокотилей, но содержание МДА в корнях под влиянием мелатонина, наоборот, возрастало на 27%. В присутствии мелатонина рост гипокотилей в условиях обезвоживания приблизился к контрольному варианту, тогда как прирост корней под влиянием мелатонина был ниже контроля. Обработка проростков мелатонином не оказывала существенного влияния на дыхание митохондрий гипокотилей и корней контрольных растений. Однако в условиях водного дефицита мелатонин полностью предотвращал ингибирование окисления субстратов в состоянии 3 в митохондриях гипокотилей, преимущественно за счет поддержания активности ЦП. В результате, обработка мелатонином вызвала увеличение скорости окисления малата в состоянии 3 в митохондриях гипокотилей на 87%, а сукцината на 26% по сравнению с митохондриями контрольных проростков. В митохондриях корней обработка растений гормоном лишь частично обращала ингибирующее действие обезвоживания на процесс окислительного фосфорилирования, при этом сохранялось торможение окисления дыхательных субстратов, особенно сукцината, а также торможение активности ЦП. Обсуждается возможная причина различного действия мелатонина и водного дефицита на уровень окислительного стресса и функционирование митохондрий в клетках гипокотилей и корней проростков люпина.

Ключевые слова: *Lupinus angustifolius*, гипокотили и корни этиолированных проростков люпина, водный дефицит, мелатонин, митохондрии, окисление субстратов, рост, содержание МДА

DOI: 10.31857/S0015330322050074

ВВЕДЕНИЕ

Мелатонин широко исследуют в течение ряда лет как молекулу с широким спектром действия, влияющим на метаболизм биологических объек-

тов животного и растительного происхождения [1–3]. Его рассматривают в первую очередь как антиоксидант, способный подавить избыточное накопление АФК при действии неблагоприятных абиотических факторов (НФ) [3]. Относительно недавно, благодаря открытию рецепторов мелатонина, его стали относить к разряду регуляторных молекул, рассматривая как новый растительный гормон [4, 5]. Но есть данные и о негативном

Сокращения: АП – альтернативный путь дыхания, ВД – водный дефицит, ДК – дыхательный контроль, МДА – малоновый диальдегид, НФ – неблагоприятный абиотический фактор, ЦП – цитохромный путь дыхания.

прооксидантном влиянии мелатонина, полученные главным образом в экспериментах *in vitro* на выделенных митохондриях [2, 6], и о прооксидантном влиянии продуктов превращения мелатонина, полученные на листьях табака [7]. Agathokleous с соавторами [2] пришли к выводу, что мелатонин включается в стресс-адаптивную защиту у растений и животных по принципу гормезиса, свойственному фармакологическим соединениям, то есть бифазной дозовой зависимости. Разную дозовую зависимость при действии мелатонина на семена и растения *A. thaliana* показали Fernandes с соавторами [8].

Роль мелатонина в поддержании метаболизма в условиях воздействия НФ на растения исследовали преимущественно при температурном воздействии, обезвоживании, засолении, влиянии тяжелых металлов. Потеря растениями воды — широко распространенный НФ, который возникает при многих абиотических воздействиях — под влиянием высокой или низкой температуры, в условиях засоления, при дегидратации почвы. Водный стресс вызывает разбалансировку между генерацией и разрушением АФК, следствием чего является повышение окислительного стресса [9, 10]. Свой вклад в этот процесс вносит дыхательная система митохондрий, которая является источником АФК, и этот процесс заметно активизируется вследствие нарушения работы ЭТЦ в условиях обезвоживания [10, 11]. Процесс преодоления окислительного стресса на уровне митохондрий включает активирование оксидоредуктаз, таких как альтернативная СN-резистентная оксидаза и ротенон-нечувствительная NAD(P)·H-дегидрогеназа [12].

Обработка мелатонином растений или семян, как показали исследования, могла значительно повысить устойчивость к потере воды и тем самым предотвратить значительное снижение урожая сельскохозяйственных культур [13]. В работах, посвященных действию обезвоживания, основное внимание уделялось роли мелатонина в нейтрализации АФК, стимулировании антиоксидантной защиты растений, а также активировании работы фотосинтетической системы растений [13]. В то же время, дыхательный метаболизм, наряду с фотосинтезом, является важнейшим энергообеспечивающим процессом у растений, и его роль при действии НФ становится определяющей для выживания растений. При сильном водном дефиците фотосинтез мог упасть до нуля, тогда как дыхание всегда сохранялось на минимально необходимом уровне [14], а в некоторых случаях возрастало [15], и для восстановления фотосинтеза после водного стресса был необходим высокий уровень дыхательного метаболизма [16]. В отсутствие фотосинтеза у этиолированных объектов роль дыхания в поддержании энергетики клеток является первостепенной. Однако взаимодействие мелатонина с компонентами дыхательной системы ис-

следовали до настоящего времени, главным образом, на митохондриях объектов животного происхождения [17, 18]. Было показано влияние мелатонина на работу комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также на антиоксидантную систему. Влиянию мелатонина на работу компонентов дыхательной системы митохондрий у растений в условиях действия НФ, насколько известно, посвящена одна работа [1]. Было показано, что как холод, так и мелатонин, стимулировали скорость окисления сукцината, активность АТФ-синтазы и выработку АТФ, кроме того, мелатонин вызывал ускорение роста растений. Учитывая дефицит исследований в этой области, целью работы было выяснить влияние мелатонина на рост проростков, уровень окислительного стресса и дыхание митохондрий гипокотилей и корней люпина в условиях недостатка воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Использовали 5-суточные этиолированные проростки люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L., сорт Ладный). Семена были получены в ФГБНУ Федеральном Исследовательском Центре “Немчиновка” (<https://www.fic-nemchinovka.ru/>). 4-суточные проростки люпина, выращенные на 0.5 питательном растворе Хогланда, обрабатывали мелатонином (0.1 мкМ). Для этого проростки помещали на 1 ч в раствор Хогланда (0.5) с мелатонином, который барботировался воздухом. Затем проростки переносили на сухую фильтровальную бумагу на 1 сут. Контролем служили 5-суточные проростки, выращенные в отсутствие действия обезвоживания. Концентрация мелатонина (0.1 мкМ), которая оказывала влияние на работу ЭТЦ митохондрий, была выбрана на основе результатов предварительных экспериментов. Размер проростков определяли с помощью линейки с нониусом.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из контрольных и подвергнутых действию обезвоживания и обработки мелатонином гипокотилей и корней проростков люпина, используя единую методику дифференциального центрифугирования, описанную ранее [19] в небольшой модификации. Этапы центрифугирования проводили на высокоскоростной центрифуге с охлаждением HITACHI CR22G-III (Hitachi, Япония) при 4°C. Навеску растительного материала измельчали со средой гомогенизации в соотношении 1 : 4 веса ткани (г) к объему среды гомогенизации (мл), которая содержала 0.4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Гомогенат фильтровали через 4 слоя мираклоза и центрифугировали при 15000 g 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде отмывания, содержащей 0.4 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 10 мМ ЭДТА, 0.2%

БСА, свободный от ЖК и центрифугировали 5 мин при 4000 g. Отделяли супернатант и центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий, содержащий около 5 мг/мл белка, ресуспендировали в 1 мл среды, содержащей 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК и хранили при 0°C.

Измерение поглощения кислорода митохондриями. Поглощение кислорода митохондриями измеряли полярографически с использованием кислородного электрода типа Кларка. Стандартная инкубационная среда (1 мл) содержала 0.3 М сахарозу, 20 мМ HEPES-буфер (pH 7.4), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ KН₂PO₄ (pH 7.4) и 0.1% БСА. Дополнительно, там где указано на рисунках, в среду инкубации добавляли дыхательные субстраты — 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата или 10 мМ сукцинат, а также 100 или 200 мкМ АДФ (при окислении сукцината или малата в состоянии 3 соответственно). Содержание белка митохондрий определяли по методу Бредфорд с БСА в качестве стандарта.

Определение активности путей митохондриального окисления. Активность различных путей митохондриального окисления определяли с использованием ингибиторного анализа [20]. Активность цитохромного пути (ЦП) митохондриального окисления определяли по степени чувствительности дыхания митохондрий в состоянии 3 к 2 мМ KCN. Максимальную активность альтернативного цианид-резистентного пути (АП) митохондриального окисления определяли по степени чувствительности дыхания к 2 мМ салицилгидроксамовой кислоты в присутствии цианида. Оптимальные концентрации ингибиторов были подобраны в ходе предварительных экспериментов путем титрования.

Определение водного дефицита. Водный дефицит (ВД) тканей определяли в соответствии со следующей формулой [21] (1):

$$\text{ВД} = \frac{(\text{тургесцентный вес} - \text{начальный вес}) / (\text{тургесцентный вес} - \text{сухой вес}) \times 100\%}{1} \quad (1)$$

Определение содержания МДА. Содержание малонового диальдегида (МДА) в тканях определяли по методу [21]. Навеску ткани (1 г) гомогенизировали с 25 мл водно-этанольного раствора в пропорции 20 : 80, затем пробы центрифугировали при 3000 g 10 мин. Далее 1 мл аликвоты добавляли в пробирки, содержавшие 20% ТХУ (–ТБК раствор) или содержавшие в дополнение к ТХУ, 65% ТБК (+ ТБК раствор). Образцы выдерживали на водяной бане при температуре 95°C в течение 30 мин, немедленно охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Интенсивность окрашивания супернатанта определяли на спектрофотометре

Genesis 10uv при трех длинах волн (400, 532 и 600 нм). Содержание МДА (нмоль/мл) определяли по следующим формулам (2–4):

$$(A_{532(+)\text{ТБК}} - A_{600(+)\text{ТБК}}) - (A_{532(-)\text{ТБК}} - A_{600(-)\text{ТБК}}) = A, \quad (2)$$

$$(A_{440(+)\text{ТБК}} - A_{600(+)\text{ТБК}}) \times 0.0571 = B, \quad (3)$$

$$\text{МДА} = ((A - B) \times 157000) \times 10^6. \quad (4)$$

Статистическая обработка данных. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные отклонения. В работе приведены данные опытов, имеющих 3–5-кратную биологическую повторность. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey-теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на рост проростков. У 5-суточных гипокотилей и корней контрольных растений водный дефицит соответствовал обычным показателям для проростков и находился в пределах 4–10%. Они активно росли: за сутки длина гипокотилей возрастала на 52%, длина корней — на 29.9% (табл. 1). При обезвоживании показатель водного дефицита у гипокотилей вырос с 3.9 до 5.9%, у корней — с 8 до 22%. Обработка мелатонином контрольных проростков не повлияла на водный дефицит тканей, но снизила потерю воды в условиях обезвоживания, в результате у гипокотилей водный дефицит понизился до 4.9%, у корней — до 8.3% (рис. 1).

Суточное обезвоживание снижало скорость роста гипокотилей — в отсутствие воды их длина увеличивалась на 42.8%, но оказывало стимулирующее действие на рост корней: длина корней возрастала на 46.5%. При обработке мелатонином гипокотили в отсутствие влаги прибавляли 51.8% длины, корни — 41.5% (табл. 1). Таким образом, обработка проростков мелатонином стимулировала рост гипокотилей в условиях отсутствия воды, тогда как прирост корней в этих условиях тормозился.

Влияние водного дефицита на дыхание митохондрий гипокотилей и корней. Митохондрии, выделенные из гипокотилей контрольных проростков люпина, характеризовались высокой скоростью окисления малата и сукцината в состоянии 3 (в присутствии АДФ), которое осуществлялось преимущественно с участием основного ЦП транспорта электронов, а также прочным сопряжением процессов окисления и фосфорилирования, на

Таблица 1. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на рост гипокотилей и корней проростков люпина

Варианты опытов	4-суточные проростки (контроль 1)	Обезвоживание (одни сутки)	Обезвоживание + мелатонин (0.1 мкМ)	5-суточные проростки (контроль 2)
Длина гипокотиля, мм	55.25 ± 1.1a	78.95 ± 2.4c	83.85 ± 3.3b	84.35 ± 2.1b
%		+42.8%	+51.76%	+52.67%
Длина корня, мм	40.4 ± 1.3d	59.2 ± 1.1f	57.15 ± 0.9g	52.5 ± 3.4e
%		+46.5%	+41.46%	+29.9%

Примечание. Представлены средние значения и их стандартные отклонения. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey-теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

что указывал высокий коэффициент дыхательного контроля (ДК), который определяется отношением скорости окисления субстрата в состоянии 3 к таковой в состоянии 4, после исчерпания АДФ в ходе синтеза АТФ (рис. 2).

По сравнению с контрольными проростками, у митохондрий, изолированных из гипокотилей проростков, перенесших обезвоживание, снижа-

лась скорость окисления НАД-зависимого субстрата (малата) в состоянии 3 (на 40%) за счет снижения активности ЦП, а также почти на 40% снижалась величина ДК. Максимальная активность АП окисления при этом существенно возрастала (на 56%). Гораздо слабее водный дефицит сказывался на окислении сукцината с участием комплекса II ЭТЦ (рис. 2).

По сравнению с гипокотилеями, митохондрии корней 5-суточных контрольных проростков характеризовались пониженной скоростью окисления малата и сукцината в состоянии 3 (на 16% и 25% соответственно), а также более низкой активностью ЦП (на 45 и 31%). При этом особенно значительно была снижена величина ДК при окислении малата и сукцината (на 68 и 41% соответственно), что указывало, по-видимому, на частичное разобщение процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях корней (рис. 3).

Кроме того, было обнаружено, что на дыхание митохондрии корней условия водного дефицита оказывали более сильное негативное воздействие. В частности, резко снижалась скорость окисления дыхательных субстратов в состоянии 3 (на 80 и 70% при окислении малата и сукцината соответственно). Очевидно, это происходило за счет ингибирования в этих условиях ЦП, активность которого при окислении малата падала на 86%, а при окислении сукцината – на 76%. Величина коэффициента ДК также снижалась при окислении малата и сукцината (соответственно на 29 и 26%). Этот процесс, однако, не был связан с функционированием АП транспорта электронов, поскольку активность АП также снижалась в условиях дефицита воды (рис. 3).

Влияние мелатонина на дыхание митохондрий гипокотилей и корней. Обработка контрольных проростков мелатонином не оказывала существенного влияния на дыхание митохондрий гипокотилей и корней. Однако было выявлено достоверное снижение скорости окисления НАД-зависимого субстрата митохондриями гипокотилей в состоянии 3 (на 28%) (рис. 2). Дыхание митохондрий, изолированных из гипокотилей проростков лю-

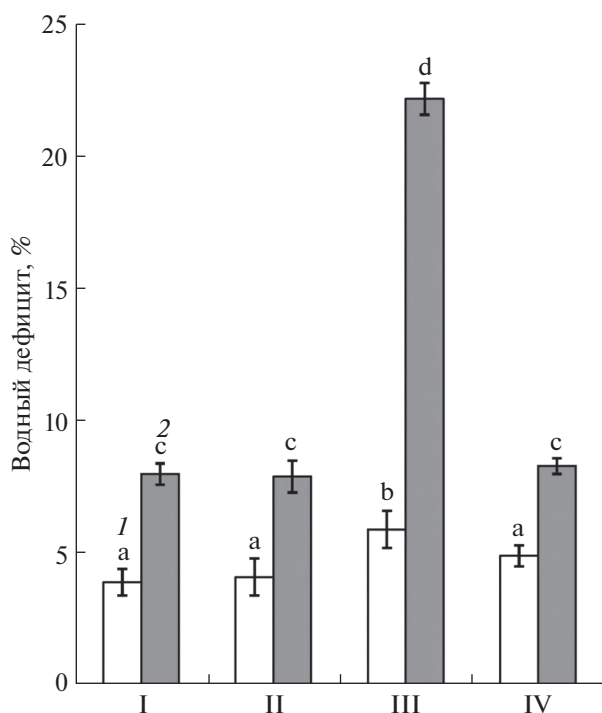


Рис. 1. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на водный дефицит тканей гипокотилей (1) и корней (2) 5-суточных проростков люпина. Варианты опытов: I – контрольные проростки, II – проростки после обработки мелатонином, III – проростки после обезвоживания, IV – проростки после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные отклонения. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey-теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

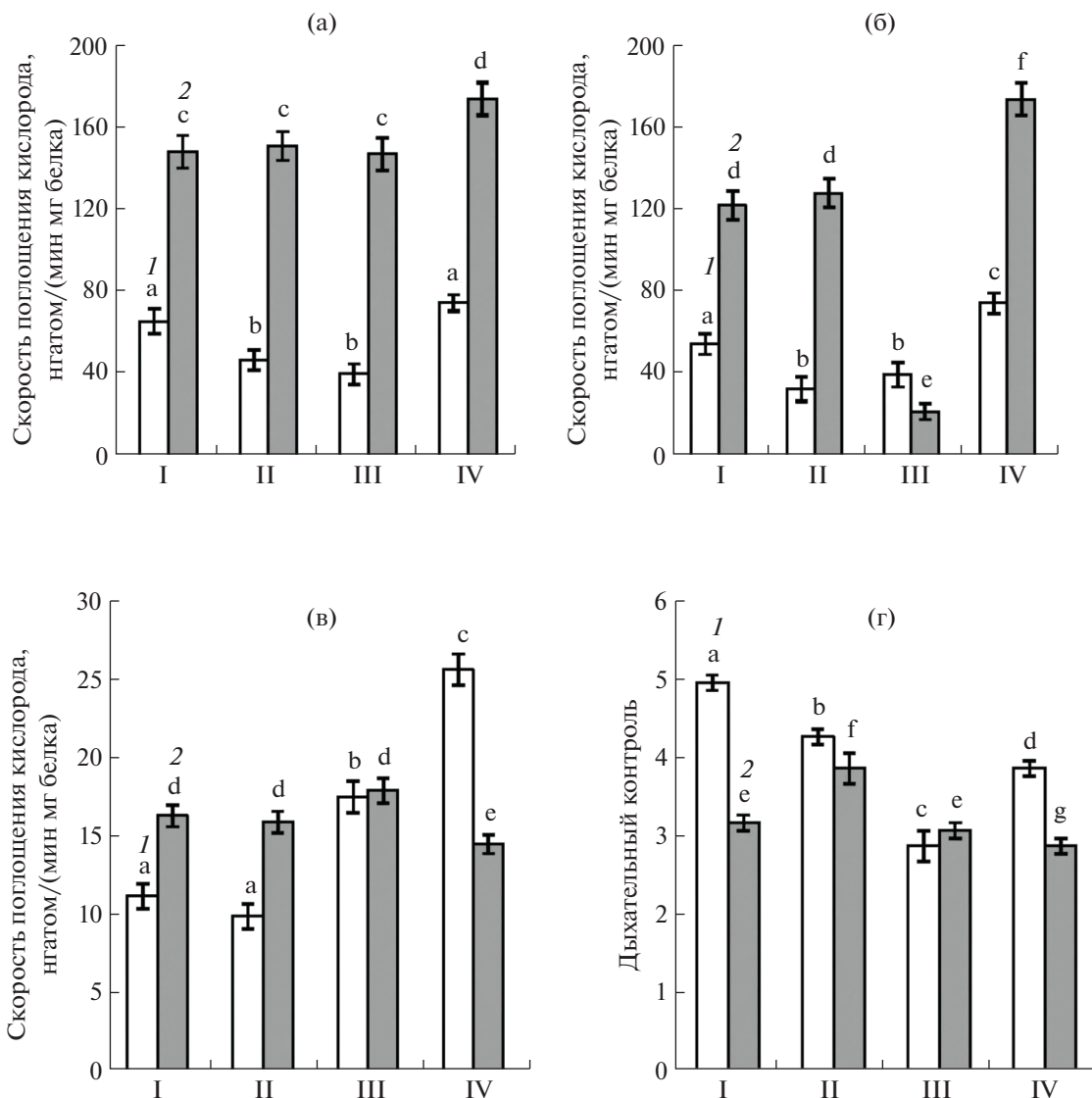


Рис. 2. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на дыхание и активность различных путей окисления малата (1) и сукцината (2) митохондриями гипокотилей 5-суточных проростков: (а) – скорость окисления субстратов в состоянии V₃; (б) – скорость окисления субстратов по цитохромному пути; (в) – скорость окисления субстратов по альтернативному пути; (г) – дыхательный контроль. Варианты опытов: I – митохондрии контрольных проростков; II – митохондрии гипокотилей после обработки проростков мелатонином; III – митохондрии гипокотилей после обезвоживания проростков; IV – митохондрии гипокотилей после обезвоживания проростков и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные отклонения. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey-теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при P ≤ 0.05.

пина, подвергнутых обезвоживанию, наоборот, стимулировалось мелатонином. Возрастала скорость окисления сукцината в состоянии 3 на 25%, а при окислении малата на 15%, примерно на уровне контроля сохранялась активность ЦП при окислении малата и почти на 35% выше, чем в контроле, увеличилась активность ЦП при окислении сукцината. Кроме того, на 33% возросла величина коэффициента ДК при окислении малата (рис. 2).

У митохондрий, изолированных из корней проростков, подвергнутых обезвоживанию, обработка мелатонином лишь частично обращала ингибирующее действие НФ на дыхание. В частности, наблюдалось повышение, по сравнению с необработанными гормоном растениями, скорости окисления субстратов (при окислении малата – в 1.5 раза, а при окислении сукцината – на 40%). Однако разобщение дыхания с фосфорилированием и низкие, по сравнению с контролем, скорости окисления субстратов в состоянии 3, свидетель-

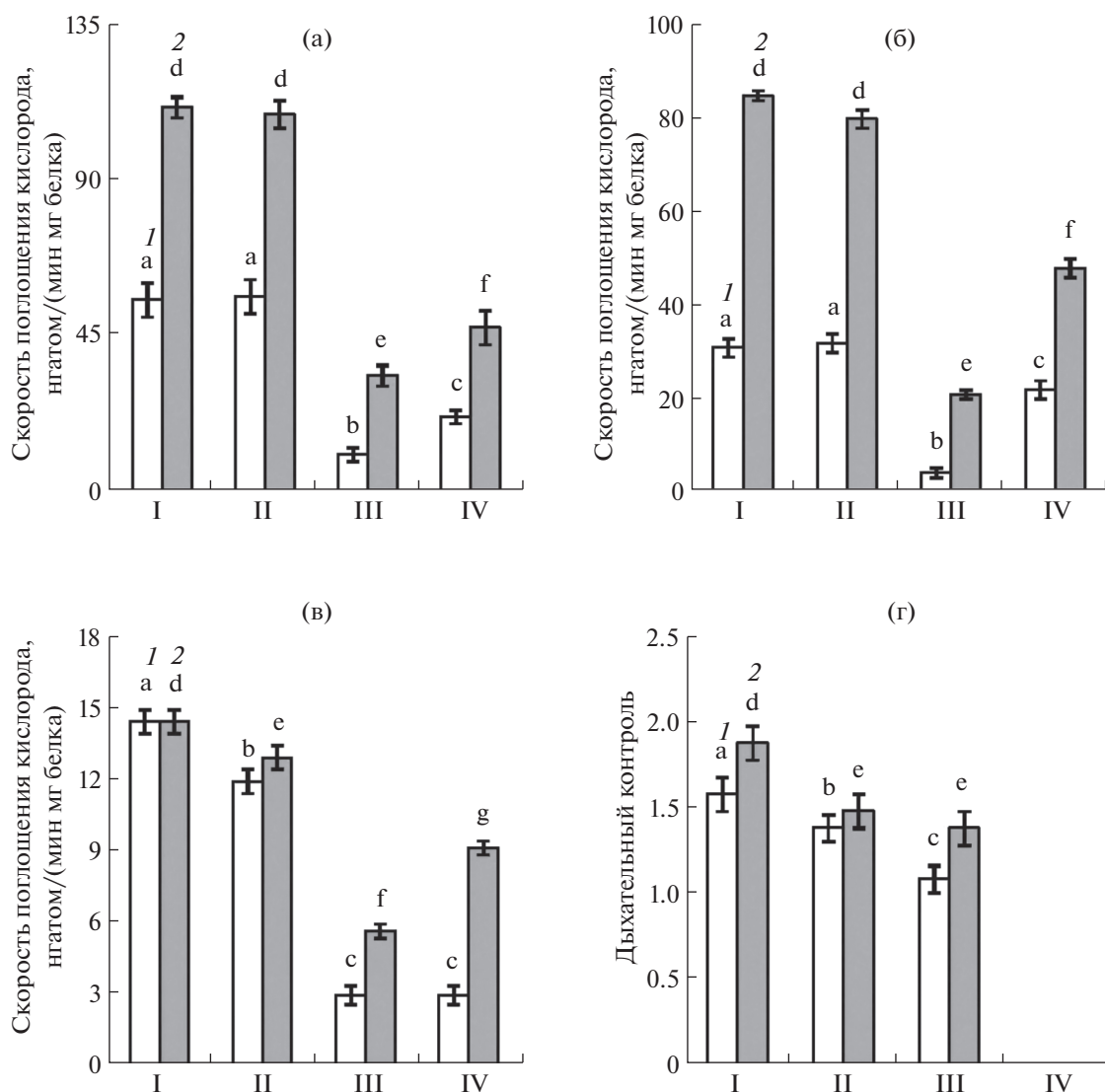


Рис. 3. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на дыхание и активность различных путей окисления малата (1) и сукцината (2) митохондриями корней 5-суточных проростков: (а) – скорость окисления субстратов в состоянии V_3 ; (б) – скорость окисления субстратов по цитохромному пути; (в) – скорость окисления субстратов по альтернативному пути; (г) – дыхательный контроль. Варианты опытов: I – митохондрии контрольных проростков; II – митохондрии после обработки проростков мелатонином; III – митохондрии после обезвоживания проростков; IV – митохондрии после обезвоживания проростков и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные отклонения. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey-теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

ствовавали о падении фосфорилирующей активности органелл (рис. 3).

Содержание МДА. Обезвоживание проростков создавало условия для возникновения окислительного стресса и нарушения структурной целостности мембран, о чем свидетельствовало повышение содержание МДА в гипокотильях 5-дневных проростков после обезвоживания на 57.2%. Обработка проростков мелатонином снижала содержание МДА в гипокотильях до контрольных значений (рис. 4).

Содержание МДА в корнях контрольных проростков более чем в 2 раза превосходило его уровень в гипокотильях. Обезвоживание стимулировало окислительный стресс, что выражалось в увеличении уровня МДА в гипокотильях и корнях на 15–17%. Обработка подвергнутых обезвоживанию проростков мелатонином повлекла за собой дополнительное увеличение содержания МДА в корнях (на 27%), и, наоборот, снижение его, почти до уровня контроля, в гипокотильях (рис. 4).

Таким образом, мелатонин оказывал различное влияние на уровень окислительного стресса в гипокотилиях и корнях проростков люпина: в гипокотилиях гормон проявлял антиоксидантное действие, в корнях – прооксидантное.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обезвоживание, как один из абиотических стрессов, вносит существенные изменения в метаболизм растений, в зависимости от продолжительности и скорости потери воды тканями проростка. Обычно стратегия растения в условиях действия НФ состоит в снижении метаболической активности и торможении процессов, не являющихся жизненно важными. К таким процессам относится рост [3, 10, 22]. Торможение роста является отражением перестройки комплекса метаболических процессов в растении. Ранее мы выявили у мембран митохондрий, выделенных из проростков гороха, после действия обезвоживания значительное падение отношения общего суммарного содержания ненасыщенных ЖК к общему суммарному содержанию насыщенных ЖК, а также снижение индекса ненасыщенности ЖК, содержащих 18 атомов углерода [23]. Важно, что изменение структуры мембран митохондрий при действии НФ коррелировало с изменением функциональной активности органелл, при этом наиболее сильно снижалась скорость окисления НАД-зависимого субстрата (малата). В настоящей работе было показано, что снижение оводненности тканей у 5-суточных проростков люпина (рис. 1) также коррелировало с торможением роста гипокотилей (табл. 1) и ингибированием окисления малата в состоянии 3 в митохондриях гипокотилей, преимущественно за счет торможения активности ЦП (рис. 2).

Ткани корней, по сравнению с гипокотилем, оказавшись в условиях воздушной среды, переживали значительно более сильный водный дефицит (рис. 1). При этом существенно снижалась функциональная активность митохондрий, включая ингибирование окисления малата и сукцината в состоянии 3, а также снижение величины ДК (рис. 3). Снижение активности цитохромного и альтернативного пути транспорта электронов в митохондриях корней могло привести к нарушению баланса АФК в сторону повышения их содержания в митохондриях и клетках, о чем свидетельствовало возросшее содержание МДА в тканях гипокотилия и корня (рис. 4).

Интересно отметить, что в условиях обезвоживания рост корней продолжался и, более того, превосходил рост у контрольных проростков (табл. 1). Этот феномен – ускоренное удлинение корней в условиях дефицита воды – отмечался и ранее [24, 25]. Он физиологически обоснован, т. к. снабжение водой растения становилось жизненно важ-

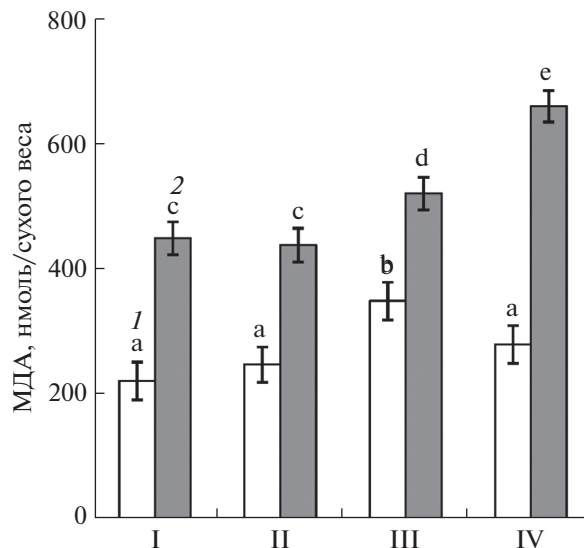


Рис. 4. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на содержание МДА в гипокотилиях (1) и корнях (2) 5-суточных проростков. Варианты опытов: I – контрольные проростки, II – проростки после обработки мелатонином, III – проростки после обезвоживания, IV – проростки после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные отклонения. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey-теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

ной проблемой, и, как показали [26], рост мог быть связан не с накоплением массы корня, а с вытягиванием клеток. Было также обнаружено, что торможение роста при обезвоживании – метаболически регулируемый процесс, причем рост побегов и корней при обезвоживании регулировался гормонами, в частности АБК и этиленом [24].

Обработка 4-суточных проростков мелатонином в сочетании с засухой способствовала росту оводненности тканей гипокотилия (рис. 1). Кроме того, она предотвращала снижение скорости окисления малата и сукцината в присутствии АДФ (состояние 3), а также препятствовала торможению активности ЦП, что положительно отражалось на функциональной активности митохондрий (рис. 2). Одновременно обработка проростков мелатонином снижала ПОЛ (рис. 4) и ускоряла рост гипокотилей, длина которых была близка к контрольным значениям (табл. 1).

Несмотря на то, что обработка проростков мелатонином несколько повышала оводненность корней (рис.1), она дополнительно стимулировала в клетках корней образование АФК, что сопровождалось повышением в них уровня ПОЛ (рис. 4). Кроме того, обработка мелатонином не способ-

ствовала поддержанию окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий при окислении малата и сукцината (рис. 3). В результате рост корней в условиях засухи после обработки мелатонином затормозился (табл. 1). Таким образом, в отличие от гипокотилей, обработка проростков мелатонином не предотвращала торможение активности митохондрий корней в условиях обезвоживания.

Пока трудно сказать, что лежит в основе такого противоположного действия мелатонина на дыхание митохондрий гипокотилей и корней люпина. В литературе также накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что обработка мелатонином способна оказывать не только различное, а иногда и противоположное действие на многие физиологические процессы в растениях, в зависимости от его концентрации, условий действия, а также специфики метаболизма растительных организмов и их органов. В этом отношении мелатонин оказался схож с другими фитогормонами.

Отмечалось, что мелатонин, проявляя ауксин-подобную активность, стимулировал рост гипокотилей люпина, колеоптилей пшеницы, овса и ячменя, причем он был активен в микромолярных концентрациях, но в более высоких — подавлял этот процесс [27–29]. В отношении корней отмечался концентрационно-зависимый эффект мелатонина на их рост [28, 29]. При этом показано, что гормон не только регулировал ростовые процессы, но и взаимодействовал с другими веществами гормональной природы [29]. Debnach с соавторами [30] отмечали общность предшественников при синтезе мелатонина и ауксина, что могло привести к общим функциональным проявлениям в условиях стрессового воздействия, в частности, обезвоживания. Тем не менее, механизм взаимного регулирования и пути передачи сигналов мелатонина и других гормонов в условиях стрессового воздействия малоизвестны.

Взаимодействие мелатонина с дыхательной системой митохондрий растений также остается малоизученной. Антиоксидантная функция мелатонина хорошо доказана, в том числе на изолированных митохондриях растений [3, 31]. Полученные нами результаты показали, что мелатонин стимулировал адаптацию клеток гипокотилей к обезвоживанию, в частности, предотвращая дисфункцию клеточных мембран через снижение ПОЛ (рис. 4). Поддержание функционального состояния митохондрий гипокотилей мелатонином выражалось не только в сохранении высокой скорости окисления субстратов по ЦП, но и в активировании альтернативной оксидазы, которая также могла выполнять антиоксидантную функцию в условиях стрессового воздействия [1, 12]. Совсем иное влияние мелатонин, по-видимому, оказывал на функционирование митохондрий в клетках кор-

ня. Обезвоживание корней сильно подавило дыхательный метаболизм митохондрий, и обработка мелатонином не снимала, а скорее усугубляла влияние НФ, вызвав полное ингибирование фосфорилирующей активности органелл. При этом некоторое ускорение окисления субстратов в состоянии 3 не сопровождалось повышением активности АП, которое могло иметь антиоксидантную функцию и которое отмечено в работе Turk, Genizel [1]. Таким образом, судя по результатам нашей работы, мелатонин не действовал на корни проростков люпина в условиях водного дефицита как антиоксидант, а, наоборот, вызывал рост ПОЛ, маркером которого было повышение уровня МДА.

Механизм возможного прооксидантного действия мелатонина был изучен на выделенных митохондриях животных [2, 6, 32]. Так, было показано, что мелатонин, как прооксидант обычно действовал в достаточно высоких концентрациях (выше 1 мкМ). Например, в микромолярных концентрациях мелатонин был способен проявлять прооксидантные свойства, стимулируя образование АФК в комплексе III (убихинон-цитохром с редуктаза) митохондрий клеток почек [32]. В работе Lee, Back [7] показано, что в отличие от животных, у растений продукты превращения мелатонина — 2-гидроксимелатонин (2-ОНМ) и 3-гидроксимелатонин (3-ОНМ) — могут осуществлять свои собственные физиологические функции. Так 2-ОНМ вызывала всплеск образования АФК вследствие стимуляции НАДФ-Н-оксидазы, что не свойственно мелатонину. Wang с соавт. [6] показали, что в системе, содержащей кверцетин и ионы Cu^{2+} , мелатонин индуцировал выделение АФК вследствие восстановления ионов Cu^{2+} . Известен и другой механизм негативного влияния мелатонина на генерацию АФК в растениях: гормон ингибировал рост яблони через подавление экспрессии генов фруктокиназы-2 [33]. Наконец, в работе Sarti с соавторами [34] показано, что мелатонин в концентрации 1 нМ способствовал повышению содержания NO, что влекло редукцию эффективности окислительного фосфорилирования, параллельно диссипацию мембранного потенциала и сдвиг клеточного метаболизма в сторону гликолиза. Можно ли переносить такой механизм воздействия мелатонина на митохондрии растений — предстоит исследовать.

Таким образом, в нашей работе впервые показано, что при обработке гормоном проростков люпина в условиях водного дефицита, мелатонин оказывал противоположное действие на рост, уровень ПОЛ и дыхание митохондрий в клетках гипокотилей и корней, в частности, действовал как антиоксидант в первом случае, и как прооксидант — во втором.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания (номер темы 121040800153-1 “Механизмы адаптации растений к факторам аридизации глобально-го климата и антропогенному загрязнению окружающей среды”).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turk H., Genisel M. Melatonin-related mitochondrial respiration responses are associated with growth promotion and cold tolerance in plants // *Cryobiology*. 2020. V. 92. P. 76. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.006>
2. Agathokleus E., Kitao M., Calabrese E. New insight into the role of melatonin in plants and animals // *Chemico-biological interactions*. 2019. V. 299. P. 163. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.12.008>
3. Tiwari R.K., Lal M.K., Kumar R., Chourasia K.N., Naga K.C., Kumar D., Das S.K., Zinta G. Mechanistic insights on melatonin-mediated drought stress mitigation in plants // *Physiol. Plant*. 2021. V. 172. P. 1212. <https://doi.org/10.1111/ppl.13307>
4. Wei J., Li D.-X., Zhang J.-R., Shan C., Rengel Z., Song Z.-B., Chen Q. Phyto-melatonin 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. Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator? // *Trends Plant Sci.* 2019. V. 24. P. 38. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.010>
6. Wang J., Wang X., He Y., Jia L., Yang C.S., Reiter R.J., Zhang J. Antioxidant and pro-oxidant activities of melatonin in the presence of copper and polyphenols *in vitro* and *in vivo* // *Cells*. 2019. V. 8. P. 903. <https://doi.org/10.3390/cells8080903>
7. Lee H.Y., Back K. 2-hydroxymelatonin, rather than melatonin, is responsible for RBOH-dependent reactive oxygen species production leading to premature senescence in plants // *Antioxidants*. 2021. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3390/antiox10111728>
8. Hernandez I.G., Gomez F.V., Cerutti S., Arana M.V., Silva M.F. Melatonin in *Arabidopsis thaliana* acts as plant growth regulator at low concentrations and preserves seed viability at high concentrations // *Plant Physiol. Biochem.* 2015. V. 94. P. 191. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.011>
9. Sharma P., Dubey R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings // *Plant Growth Regul.* 2005. V. 46. P. 209. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0002-2>
10. Atkin O.K., Macherel D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance // *Ann. Bot.* 2008. V. 103. P. 581. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn094>
11. Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Murphy A.N., Starkov A.A. Mitochondrial ROS metabolism: 10 Years later // *Biochem. (Moscow)*. 2015. V. 80. P. 517. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050028>
12. Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 6805. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
13. Sharma A., Zheng B. Melatonin mediated regulation of drought stress: physiological and molecular aspects // *Plants*. 2019. V. 8. P. 190. <https://doi.org/10.3390/plants8070190>
14. Flexas J., Bota J., Galme S.J., Medrano H., Ribas-Carbo M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress // *Phys Plant*. 2006. V. 127. P. 343. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00621.x>
15. Liu H.-S., Li F.-M., Xu H. Deficiency of water can enhance root respiration rate of drought-sensitive but not drought-tolerant spring wheat // *Agric. Water Manag.* 2004. V. 64. P. 41. [https://doi.org/10.1016/S0378-3774\(03\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0378-3774(03)00143-4)
16. Kirschbaum M.U.F. Recovery of photosynthesis from water stress in *Eucalyptus pauciflora* – a process in two stages // *Plant Cell Environ.* 1988. V. 11. P. 685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1988.tb01151.x>
17. Acuna-Castroviejo D., Escames G., Leon J., Carazo A., Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. V. 527. P. 549. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_63
18. Hardeband R. Melatonin and the electron transport chain // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. P. 3883. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2615-9>
19. Shugaev A.G., Butsanets P.A., Andreev I.M., Shugaeva N.A. Effect of salicylic acid on the metabolic activity of plant mitochondria // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 520. <https://doi.org/10.1134/S1021443714040189>
20. McDonald A.E., Sieger S.M., Vanlerberhe G.C. Methods and approaches to study plant mitochondrial oxidase // *Physiol. Plant*. 2002. V. 116. P. 135. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160201.x>
21. Schmitt N., Dizengremel P. Effect of osmotic stress on mitochondria isolated from etiolated mung bean and sorghum seedlings // *Plant Physiol. Biochem.* 1989. V. 27. P. 17.
22. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // *Planta*. 1999. V. 207. P. 604. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
23. Generozova I.P., Shugaev A.G. Respiration metabolism in mitochondria of pea seedlings of different age under water deficit and rewatering // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 235. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020021>
24. Zhigacheva I.V., Burlakova E.B., Misharina T.A., Terenina M.B., Krikunova N.I., Generozova I.P., Shugaev A.G., Fattakhov S.G. Fatty acid composition of membrane

- lipids and energy metabolism in mitochondria of pea seedlings under water deficit // *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. V. 60. P. 212.
<https://doi.org/10.1134/S1021443713010111>
25. *Sharp R.E.* Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress // *Plant, Cell Environm.* 2002. V. 25. P. 211.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x>
26. *Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A.* Plant drought stress: effects, mechanisms and management // *Agron. Sustain Dev.* 2009. V. 29. P. 185.
<https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
27. *Cui G., Sun F., Gao X., Xie K., Zhang C.S. Liu S., Xi Y.* Proteomic analysis of melatonin-mediated osmotic tolerance by improving energy metabolism and autophagy in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Planta.* 2018. V. 248. P. 69.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2881-2>
28. *Hernandez-Ruiz J., Cano A., Arnao M.B.* Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues // *Planta.* 2004. V. 220. P. 140.
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1317-3>
29. *Chen Q., Qic W., Reiter R.J., Wei W., Wan B.* Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea* // *J. Plant Physiology.* 2009. V. 166. P. 324.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.06.002>
30. *Debnath B., Islam W., Li M., Sun Y., Lu X., Mitra S., Hussain M., Liu S., Qiu D.* Melatonin mediates enhancement of stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1040.
<https://doi.org/10.3390/ijms20051040>
31. *Butsanets P.A., Baik A.S., Shugaev A.G., Kuznetsov V.I.* Melatonin inhibits peroxide production in plant mitochondria // *Doklady Biochem. Biophys.* 2019. V. 489. P. 367.
<https://doi.org/10.1134/S1607672919060036>
32. *Zhang H., Zhang H.-M., Wu L.-P., Tan D.-X., Kamat A., Li Y.-Q., Katz M.S., Abboud H.E., Reiter R.J., Zhang B.-X.* Impaired mitochondrial complex III and melatonin responsive reactive oxygen species generation in kidney mitochondria of db/db mice // *J. Pin. Res.* 2011. V. 51. P. 338.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00894.x>
33. *Yang J., Zhang C., Wang Z., Sun S., Zhan R., Zao Y., Ma B., Ma F., Li M.* Melatonin-mediated sugar accumulation and growth inhibition in apple plants involves down-regulation of fructokinase 2 expression and activity // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 19: 150.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00150>
34. *Sarti P., Magnifico M.C., Altieri F., Mastronicola D., Arese M.* New evidence for cross talk between melatonin and mitochondria mediated by a circadian-compatible interaction with nitric oxide // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 11259.
<https://doi.org/10.3390/ijms140611259>