

ISSN 0015-3303

Том 70, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



# ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

Том 70, номер 6, 2023

## ОБЗОРЫ

Пора неспецифической проницаемости (mPTR) в митохондриях растений и ее роль в гибели клеток

*П. А. Буцанец, Н. А. Шугаева, А. Г. Шугаев*

563

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Возрастные и адаптивные изменения фотосинтетического аппарата листьев зимне-зеленого травянистого растения *Ajuga reptans* L. в природных условиях таежной зоны

*О. В. Дымова, И. Г. Захожий, Т. К. Головка*

577

Влияние повышенной концентрации CO<sub>2</sub> и температуры на растения с разным типом фотосинтеза: киноа (C<sub>3</sub>) и амарант (C<sub>4</sub>)

*З. Ф. Рахманкулова, Е. В. Шуйская, М. Ю. Прокофьева,  
Л. Т. Саидова, П. Ю. Воронин*

588

Влияние мозаичного нокаутирования гена фитоиндесатуразы *NiPDS* на биосинтез каротиноидов у *Nicotiana tabacum* L.

*А. В. Нежданова, М. А. Слугина, А. В. Кулакова,  
А. М. Каминская, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова*

601

Образование колетер на листьях микроклонов батата (*Ipomoea batatas* L.) в условиях *in vitro*

*Р. Н. Киракосян, Я. Ю. Голиванов, В. И. Трухачев, С. М. Зайцева,  
М. Р. Халилуев, Е. Н. Баранова, Е. А. Калашиникова*

612

Круглосуточное освещение повышает урожайность и пищевую ценность, и снижает содержание нитратов в микрозелени семейства *Brassicaceae*

*Т. Г. Шibaева, А. А. Рубаева, Е. Г. Шерудило, А. Ф. Тимов*

623

Влияние акклимации к повышенной температуре на механизмы засухоустойчивости у видов с разным типом фотосинтеза: *Sedobassia sedoides* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) и *Bassia prostrata* (C<sub>4</sub>-НАДФ)

*Е. В. Шуйская, З. Ф. Рахманкулова, М. Ю. Прокофьева,  
В. В. Казанцева, Н. Ф. Лунькова, Л. Т. Саидова*

635

Роль ультраструктурной организации клеток в адаптации озимой пшеницы к низкой температуре

*Ю. В. Венжик, И. Е. Мошков*

648

Сравнительная оценка ионообменных свойств полимерного матрикса клеточных стенок галофита и гликофита из семейства *Amaranthaceae*-*Chenopodiaceae*

*Н. Р. Мейчик, Ю. И. Николаева, М. А. Кушунина*

659

Рост и физиологическое состояние микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) при воздействии кадмия, свинца и никеля

*Ж. В. Маркина, А. В. Огнистая*

670

Повышение устойчивости пшеницы к нефтяному загрязнению с помощью эндофитных бактерий *Bacillus subtilis*

*З. М. Курамшина, Л. Р. Саттарова, И. В. Максимов*

679

Параметры индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, и редокс-состояния ФС I – P700 листьев березы и липы в различных городских условиях

*Д. А. Тодоренко, О. В. Яковлева, А. А. Алексеев, Д. Н. Маторин*

688



УДК 581.1

## ПОРА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ (mPTP) В МИТОХОНДРИЯХ РАСТЕНИЙ И ЕЕ РОЛЬ В ГИБЕЛИ КЛЕТОК

© 2023 г. П. А. Буцанец<sup>а</sup>, \*, Н. А. Шугаева<sup>а</sup>, А. Г. Шугаев<sup>а</sup>, \*\*

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: p.corbeau@list.ru

\*\*e-mail: ag\_shugaev@ifr.moscow

Поступила в редакцию 01.05.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

В обзоре изложены современные представления о строении, механизмах регуляции и функциональной роли поры неспецифической проницаемости (mPTP) во внутренней мембране митохондрий животных и растений. Приведены некоторые особенности, характеризующие функционирование mPTP в митохондриях растений и ее регуляцию под влиянием  $Ca^{2+}$  и АФК. Суммированы имеющиеся в литературе доказательства, свидетельствующие об участии митохондрий в программируемой гибели клеток растений, в том числе благодаря индукции mPTP. Намечены направления дальнейших исследований mPTP в митохондриях растений.

**Ключевые слова:**  $Ca^{2+}$ /АФК-зависимая неспецифическая пора,  $F_0F_1$ -АТФ-синтаза, изменение проницаемости внутренней мембраны, мембранный потенциал, митохондрии, программируемая смерть клеток

DOI: 10.31857/S0015330323600341, EDN: FERPOD

### ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии являются центральными органеллами дыхания и энергетики клетки. Осуществляя превращение органических соединений и синтез АТФ, необходимый для поддержания жизнедеятельности клетки, митохондрии, вместе с тем, в неблагоприятных условиях, способны активировать ее запрограммированную гибель (PCD) [1]. Кроме того, митохондриям отводится основная роль во внутриклеточном сигналинге, в котором участвуют вторичные мессенджеры, например,  $Ca^{2+}$  или АФК [2, 3]. Важно отметить, что внутренняя митохондриальная мембрана (ИММ) в соответствии с

хемиосмотической концепцией Митчелла непроницаема не только для протонов, но практически для всех метаболитов и сигнальных молекул, а для их трансмембранного транспорта требуются специальные переносчики или каналы. При этом внешняя митохондриальная мембрана (ОММ) более проницаема для ионов и растворенных веществ, что опосредованно наличием потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) и других селективных каналов [4–6].

В ранних работах было показано, что при определенных условиях проницаемость ИММ может резко возрастать, тогда протоны и различные ионы, а также небольшие молекулы могут свободно проходить в матрикс органелл. Это явление (изменение проницаемости внутренней мембраны) получило название митохондриальной пермеабилитации (mPT). Существование mPT в митохондриях животных впервые было обнаружено и изучено Haworth и Hunter [7–9]. Вначале это открытие было воспринято как артефакт, связанный с повреждением митохондрий, однако позднее было доказано, что mPT возникает в результате открытия во внутренней мембране специального мегаканала или поры (mPTP) под действием различных факторов (например, при накоплении  $Ca^{2+}$  в матриксе) [10]. Благодаря постоянному интересу исследователей, за более чем 40-летнюю историю

**Сокращения:** СВЧ – реакция сверхчувствительности; СК – салициловая кислота; ЦСА – циклоспорин А; АИФ – апоптоз-активирующий фактор (от англ. Apoptosis Inducing Factor); АНТ – переносчик адениновых нуклеотидов (от англ. Adenine Nucleotide Transporter); ИММ – внутренняя мембрана митохондрий (от англ. Inner Mitochondrial Membrane); ОММ – внешняя мембрана митохондрий (от англ. Outer Mitochondrial Membrane); РСД – запрограммированная гибель клеток (от англ. Programmed Cell Death); mPT – пермеабилитация внутренней мембраны митохондрий (от англ. Mitochondrial Permeability Transition); mPTP – пора неспецифической проницаемости во внутренней мембране митохондрий (от англ. Mitochondrial Permeability Transition Pore); mΔΨ – электрический мембранный потенциал на внутренней мембране митохондрий; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал (от англ. Voltage-Dependent Anion Channel).

изучения этого канала было опубликовано несколько тысяч статей. Оказалось, что нарушение функционирования мРТР приводит к дисфункции митохондрий, вследствие чего возникают многие болезни человека: от болезни Альцгеймера и ишемической болезни сердца, до онкологических и нейродегенеративных заболеваний [11, 12]. Поэтому результаты изучения этого мегаканала важны не только для фундаментальной науки, но также для лучшего понимания природы многих патологий, включая, по-видимому, болезни растений (см. ниже). Поскольку наибольшего прогресса в изучении структуры, механизмов регуляции и функциональной роли мРТР удалось достичь на митохондриях животных, представляется необходимым вначале дать ее краткую характеристику в этих органеллах.

### СТРОЕНИЕ, РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИЯ мРТР В МИТОХОНДРИЯХ ЖИВОТНЫХ

У животных мРТР определяют, как  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое и циклоспорин А-чувствительное увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны для протонов и веществ с молекулярной массой меньше 1.5 кДа различной природы: низкомолекулярных ионов, сахаров, нуклеотидов и т.д. [11, 12]. Состояние мРТР регулируется различными модуляторами, которые либо ингибируют (циклоспорин А, АДФ, АТФ, НАД·Н,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  и др.) или активируют ( $\text{Ca}^{2+}$ , жирные кислоты,  $\text{P}_i$ , АФК и др.) ее открытие [10–14]. Учитывая важную роль этого канала, механизмы, регулирующие его переход из закрытого в открытое состояние, чрезвычайно сложны и не до конца изучены. В разных обзорах приводится более 40 различных эффекторов, способных оказывать прямое или опосредованное влияние на активность мРТР в митохондриях животных [10–13].

Наиболее важным регуляторным компонентом мРТР является шаперон циклофилин Д [10, 12, 13, 15]. В присутствии  $\text{P}_i$  этот белок связывается с субъединицей АТФ-синтазы OSCP, что приводит к открытию мРТР. Циклоспорин А (ЦсА), путем связывания с циклофилином Д индуцирует его отсоединение от АТФ-синтазы, блокируя образование поры [13, 15]. Чувствительность к ЦсА часто служит диагностическим тестом функционирования поры в митохондриях животных, однако в митохондриях растений такое ингибирование наблюдается не всегда (см. ниже).

Ключевую роль в регуляции мРТР в митохондриях животных играют ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе, наряду с увеличением уровня АФК, приводит к открытию поры, коллапсу мΔΨ и набуханию органелл [10, 12, 14, 16–18]. Хорошо известно, что  $\text{Ca}^{2+}$ , являясь активатором открытия мРТР в физиологических усло-

виях, способен накапливаться в митохондриях в большом количестве без увеличения проводимости внутренней мембраны. Различные эндогенные модуляторы мРТР способны изменять порог концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимой для инициации данного процесса. Адениновые нуклеотиды (АДФ, АТФ и АМФ), вероятно, являются наиболее мощными эндогенными ингибиторами мРТР, увеличивая порог концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , при котором происходит спонтанное открытие поры [7–10, 18]. В отличие от  $\text{Ca}^{2+}$  другие двухвалентные катионы  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  являются сильными ингибиторами мРТР, препятствуя притоку  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь митохондрий, а  $\text{Mg}^{2+}$  тормозит открытие поры путем конкурентного ингибирования [7–10]. Недавно было показано, что  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с АТФ-синтазой на участке близко расположенном к сайту связывания  $\text{Mg}^{2+}$  между α- и β-субъединицами [14, 18].

Другими важными эндогенными регуляторами открытия мРТР являются АФК, а также активные формы азота (АФА). Известно, что митохондрии являются, как основным источником, так и мишенью для АФК/АФА. Показано, что мРТР чрезвычайно чувствительна к изменению своего редокс-состояния. Окислительный стресс, наиболее изученный индуктор мРТР. АФК и прооксиданты способствуют  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированному открытию мРТР, вызывая изменение редокс-состояния SH-групп в молекулах белков, формирующих или регулирующих активность мРТР во внутренней мембране митохондрий животных [1, 17–19]. Обнаружена высокая чувствительность к АФК  $\text{F}_1\text{F}_0$ -АТФ-синтазе, являющейся, в соответствии с современными представлениями, основным компонентом мРТР в митохондриях животных [20, 21].

Кроме того, индукция мРТР регулируется величиной мΔΨ и ΔрН матрикса, конформацией транслокатора адениновых нуклеотидов (ANT) и другими эффекторами [10]. Как и адениновые нуклеотиды, высокий мΔΨ удерживает поры закрытыми, в то время как его снижение способствует спонтанной индукции мРТР. Подобный контроль мРТР со стороны электрохимического градиента протонов ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) создает концептуальную основу для “примирения” или согласования существования мРТР с хемосмотической теорией, главным постулатом которой, как известно, является непроницаемость внутренней мембраны митохондрий для протонов [12]. Показано, что ингибиторы ANT — атрактилозид и бонгкрековая кислота противоположным образом модулируют функционирование мРТР, соответственно, способствуя и подавляя ее открытие. Эти результаты послужили одной из предпосылок для предположения об участии ANT в формировании мРТР [10, 12].

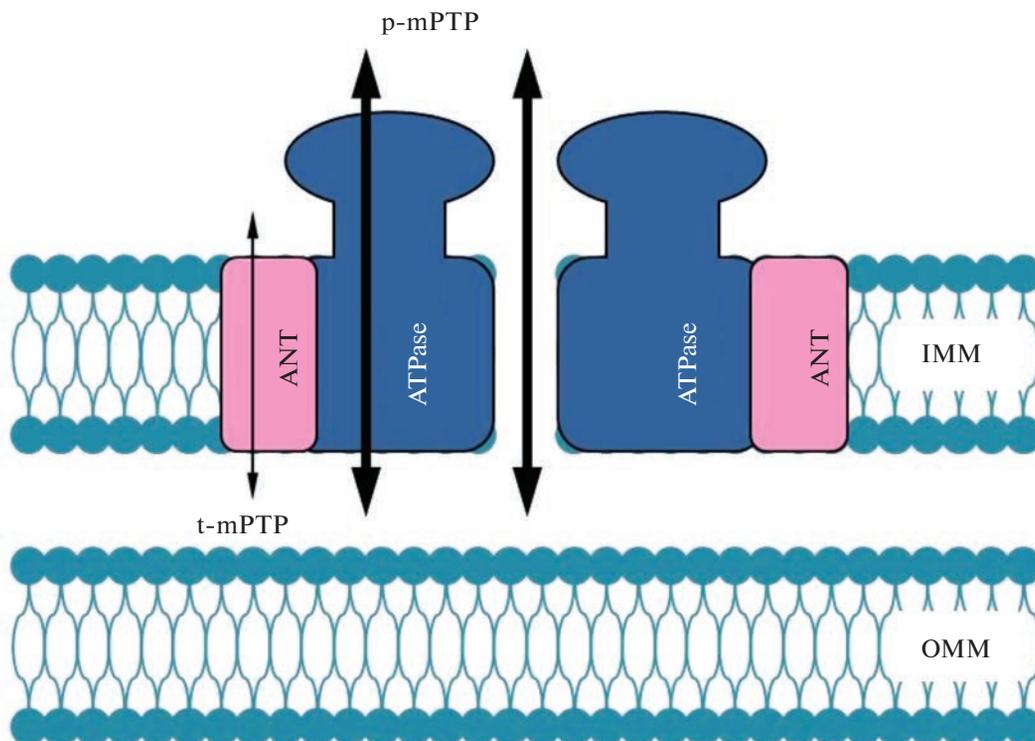
Уже в ранних работах было показано, что у животных mPTP может функционировать в двух основных состояниях: с низкой (с амплитудой 0.3–0.7 nS) и высокой (1.5 nS) проводимостью [22, 23]. Открытие mPTP в состоянии высокой проводимости или “классической” mPTP (p-mPTP), носит долговременный и, как правило, необратимый характер. Оно сопровождается полной диссипацией  $m\Delta\Psi$  на внутренней мембране, нарушением ионного и осмотического гомеостаза в матриксе, высокоамплитудным набуханием митохондрий, нарушением целостности внешней мембраны органелл и высвобождением из межмембранного пространства ряда проапоптотических белков (цитохрома *c*, белка AIF и других). Эти белки могут запускать процесс апоптоза посредством активации соответствующих протеаз (каспаз) и нуклеаз в цитозоле [1, 12, 16, 22, 24]. В состоянии высокой проводимости mPTP проявляется, как правило, в стрессовых ситуациях, когда наблюдается серьезное нарушение работы митохондрий, связанное, например, с повышенной генерацией органеллами АФК и возникновением окислительного стресса [1, 18, 20]. Если это происходит с отдельными митохондриями, коллапс  $m\Delta\Psi$  может активировать митофагию, целью которой является удаление поврежденных органелл (так называемый “механизм контроля качества митохондрий”) [12]. В том случае, когда индукция p-mPTP охватывает большую часть популяции митохондрий, которое сопровождается увеличением объема матрикса, исчезновением крист, а также пермеабиллизацией ОММ вследствие активации ОММ-порообразующих белков (BAH, BAK), запускается процесс PCD по пути апоптоза или некроза в зависимости от количества оставшихся в клетке неповрежденных митохондрий, способных поддерживать синтез АТФ [12, 18].

В состоянии низкой проводимости индукция mPTP увеличивает проницаемость IMM для протонов и, по-видимому, небольших катионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), что ведет к ее частичной или полной деполяризации, а также разобщению окислительного фосфорилирования. Показано, что отличительными особенностями этого подсостояния mPTP (или t-mPTP) являются: легкая обратимость, нечувствительность к экзогенному  $Ca^{2+}$ , слабая чувствительность к ЦсА и отсутствие набухания митохондрий [21, 23, 25, 26]. Открытие mPTP может быть как кратко-, так и долговременным [23, 24]. При этом именно долговременное открытие mPTP в любой из двух конформаций ведет к необратимым функциональным изменениям в митохондриях и фактически определяет судьбу клетки [22, 23, 27]. Индукция mPTP в состоянии низкой проводимости возникает спонтанно в процессе нормальной физиологической активности митохондрий (например, в результате накопления  $Ca^{2+}$  внутри органелл). В результате поступления

$H^+$  из цитозоля в митохондрии снижается рН матрикса, что способствует закрытию поры. В таких условиях mPTP может быстро переходить из закрытого состояния в открытое и обратно в результате перераспределения ионов между цитозолем и матриксом митохондрий [18, 25, 28]. Быстрый циклический переход из открытого в закрытое состояние t-mPTP, которое называют “мерцанием” (flickering) поры, можно регистрировать с использованием флуориметрической техники в изолированных митохондриях и интактных клетках [23, 28, 29]. Вопрос о том, может ли открытие t-mPTP катализировать пассивный выход ионов  $Ca^{2+}$  из матрикса в цитозоль по градиенту его концентрации остается дискуссионным. Тем не менее, в ряде работ показано, что в состоянии низкой проводимости mPTP проницаема не только для протонов, но и для низкомолекулярных катионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ , и, по-видимому,  $Ca^{2+}$ ). В этом состоянии функционирование mPTP может участвовать в передаче  $Ca^{2+}$ -сигнала и/или в регуляции (гомеостатировании) уровня  $Ca^{2+}$  в матриксе за счет его быстрого выхода из органелл [12, 22, 30]. Таким образом, кратковременную индукцию поры в состоянии t-mPTP, по-видимому, можно рассматривать в качестве протекторного механизма, предохраняющего митохондрии от избыточного накопления  $Ca^{2+}$  в матриксе и от  $Ca^{2+}$ -зависимых изменений метаболизма органелл, например, повышенного образования АФК [18].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в изучении факторов, регулирующих индукцию mPTP, открытым остается вопрос о ее структуре. Согласно более ранним представлениям, структурными компонентами mPTP, формируемой в месте контакта митохондриальных мембран, выступали вольт-зависимый анионный канал (VDAC) или порин (внешняя мембрана), а также ANT (внутренняя мембрана) и ассоциированный со стороны матрикса консервативный белок циклофилин Д [18, 31, 32]. Позднее было высказано предположение, что в структуру mPTP входит переносчик фосфата, который, связываясь с циклофилином Д и ANT, образует во внутренней мембране митохондрий пору, регулирующую ионами  $Ca^{2+}$  [10, 27]. Однако указанные модели строения mPTP не нашли своего подтверждения в ходе генетических исследований. Было показано, что функционирование mPTP сохранялось в митохондриях, выделенных из трансгенных растений, у которых экспрессия гена (или нескольких генов), кодирующих каждый из указанных выше структурных компонентов была подавлена [18, 33, 34].

Более современные представления о структуре mPTP связаны с предположением о формировании mPTP с участием  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы [12, 13, 18, 26]. В настоящее время предлагаются две рабочие модели высокоамплитудной поры: “гипотеза диме-



**Рис. 1.** Гипотетическое строение поры неспецифической проницаемости (mPTP) во внутренней мембране митохондрий в виде АТФ-синтасомы – комплекса, состоящего из димера АТФ-синтазы (ATPase) и аденилатного транспортера (ANT). При функционировании комплекса в состоянии высокой проводимости (p-mPTP) канал, проницаемый для растворов веществ с молекулярной массой меньше 1.5 кДа, образуется, или между двумя молекулами АТФ-синтазы, или внутри ее мономера, по-видимому, в кольце *c*-субъединиц (толстые стрелки). В состоянии низкой проводимости (t-mPTP), канал, проницаемый только для протонов и, возможно, небольших катионов, включая  $\text{Ca}^{2+}$ , формируется внутри переносчика аденилатов (тонкая стрелка).

ра” и “гипотеза *c*-кольца”. Согласно первой,  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное изменение конформации димера вызывает образование поры на границе двух мономеров АТФ-синтазы [35]. Вторая гипотеза предполагает формирование канала в результате конформационных изменений в кольце *c*-субъединиц АТФ-синтазы, индуцированных ионами  $\text{Ca}^{2+}$  [36]. Имеется несколько прямых доказательств того, что АТФ-синтаза участвует в образовании mPTP. Во-первых, изолированная АТФ-синтаза или ее *c*-субъединица (или ее димер), встроенные в искусственный бислой, генерируют  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемый поток веществ высокой проводимости, который электрофизиологически эквивалентен индукции p-mPTP [35, 36]. Кроме того, генетические изменения субъединиц АТФ-синтазы заметно влияют на чувствительность mPTP к ее регуляторам [36–39].

Недавно, с использованием генетических методов были получены доказательства того, что ANT и АТФ-синтаза могут быть независимыми каналами, ответственными за функционирование mPTP в состоянии низкой и высокой проводимости, соответственно [40–42]. Основываясь на этих данных, была предложена новая интересная

модель строения mPTP, которая синтетически соединила две другие модели, ранее привлечшие наибольшее внимание исследователей. Согласно новой модели структура mPTP формируется из двух основных функциональных элементов, ANT и АТФ-синтазы, объединенных в единый комплекс под названием АТФ-синтасома (ATP synthasome) (рис. 1) [13, 18]. Можно не сомневаться, что эта новейшая модель строения mPTP также привлечет большое внимание митохондриологов и будет подвергнута всестороннему изучению и проверке.

#### ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ mPTP В МИТОХОНДРИЯХ РАСТЕНИЙ

За более чем 25 лет прошедших после первого сообщения о присутствии mPTP в митохондриях растений (этиолированных стеблей гороха) [43], данные о присутствии и свойствах этой поры были получены при изучении митохондрий, выделенных из: листьев овса [44], клубней картофеля [45, 46], корней пшеницы [47], клеточной культуры *Arabidopsis thaliana* [48], листьев каннабиса [49], семян люпина [50] и некоторых других растительных объектов. Судя по этим данным, mPTP в митохондриях растений, как и в митохондриях

животных, может функционировать в двух метаболических состояниях (или подсостояниях) – высокой и низкой проводимости. Например, функционирование индуцируемой  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{P}_i$  типичной (или канонической) mPTP было показано в митохондриях клубней картофеля, корней пшеницы, листьев овса и некоторых других растений [44, 45, 47]. Открытие mPTP в этих органеллах сопровождалось коллапсом  $\text{m}\Delta\Psi$ , а также высокоамплитудным набуханием матрикса с последующим выходом из органелл цитохрома *c*. При этом, индукция mPTP, например, в митохондриях клубней картофеля ингибировалась ЦсА который, как уже отмечалось, служит ключевым тестом для идентификации активности mPTP в митохондриях животных [46]. Интересно, что в митохондриях клубней картофеля и корней пшеницы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая индукция mPTP и выход из митохондрий цитохрома *c* наблюдались в условиях недостатка кислорода в среде инкубации [46, 47]. При этом сама по себе аноксия была не способна индуцировать открытие mPTP и потерю митохондриями цитохрома *c* [47]. Кроме того,  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемое набухание митохондрий тормозилось при снижении pH (с 7.4 до 6.6) и активировалось в присутствии прооксидантов (диамида и фениларсен-оксида), а также линоленовой кислоты, что в целом аналогично условиям, способствующим индукции mPTP в митохондриях животных [46]. Вместе с тем, сразу же обнаружались и некоторые особенности, характеризующие mPTP в митохондриях растений.

Во-первых, для  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой индукции mPTP было необходимо присутствие в среде инкубации высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (0.5–2.5 мМ), что, по мнению авторов, могло объясняться низкой активностью переносчика этого иона ( $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера) в митохондриях, например, клубней картофеля, корней пшеницы и листьев овса [45–47]. В других случаях  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая индукция mPTP достигалась благодаря присутствию  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофоров, например, A23187, обеспечивающего транспорт и накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе митохондрий листьев овса [44]. Во-вторых, чувствительность mPTP к ЦсА в митохондриях, выделенных, например, из клубней картофеля проявлялась в присутствии мощного восстановителя – ДТТ [46]. В другой работе, индукция mPTP в состоянии высокой проводимости (p-mPTP) в митохондриях корней пшеницы оказалась не чувствительной к ЦсА [47]. Причина различной чувствительности mPTP в растительных митохондриях к ЦсА остается неизвестной, хотя белки семейства циклофилина D, а также фермент пептидилпролил *cis-trans* изомеразы (peptidylprolyl *cis-trans* isomerase), через взаимодействие с которыми реализуется регуляторное действие ЦсА на активность mPTP в митохондриях животных, обнаружены и в растениях, например, в митохондриях *Arabidopsis thali-*

*ana* и *Glycine max* [45, 51, 52]. В недавней работе сотрудников лаборатории А. Vianello [53] также было показано, что регуляция mPTP под влиянием ЦсА осуществлялась в результате его прямого взаимодействия с циклофилином D в митохондриях стеблей гороха.

Особенностью функционирования mPTP в митохондриях стеблей гороха, которая индуцировалась после накопления в матриксе (с помощью  $\text{Ca}^{2+}$  ионофора ETN129) 240–720 мкМ экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  и сопровождалась диссипацией  $\text{m}\Delta\Psi$ , является то, что она в отличие, например, от митохондрий клубней картофеля не сопровождалась набуханием матрикса и потерей цитохрома *c*. Это характерно для функционирования поры в состоянии низкой проводимости [53]. Кроме того, было показано, что кроме ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , активаторами mPTP, которые повышали ее чувствительность (“sensitized”) к основным регуляторам в этом состоянии, являлись прооксиданты, например, диамид и фениларсен-оксид, а кроме ЦсА индукция mPTP ингибировалась в присутствии субстратов АТФ-синтазы (Mg-АДФ и Mg-АТФ). По мнению авторов это означает, что механизмы, регулирующие изменение проницаемости внутренней мембраны в митохондриях гороха в результате индукции mPTP в состоянии низкой проводимости (t-mPTP), близки к таковым, модулирующим активность типичной mPTP в состоянии высокой проводимости (p-mPTP) в митохондриях животных [53]. Нами были изучены условия индукции и некоторые свойства mPTP, функционирующей в состоянии низкой проводимости в митохондриях семян люпина [50, 54]. Важно, что эти митохондрии отвечали основным критериям нативности, в частности, характеризовались интактными мембранами, а также прочным сопряжением процессов окисления и фосфорилирования. При окислении дыхательных субстратов ЦТК, в частности, сукцината, митохондрии семян люпина были способны длительное время поддерживать  $\text{m}\Delta\Psi$ , как за счет работы ЭТЦ, так и в ходе АТФ-азной реакции при ингибировании дыхательной цепи, например, в условиях гипоксии. Показано, что добавление в инкубационную среду дышащих митохондрий люпина салициловой кислоты (СК), активирующей образование АФК, или прооксиданта (фениларсен-оксида), или 50–100 мкМ  $\text{CaCl}_2$ , вызывало после непродолжительного лаг-периода (8–10 мин), полную диссипацию  $\text{m}\Delta\Psi$ , указывая на индукцию протонной проводимости внутренней мембраны, которая не сопровождалась набуханием органелл [50, 54]. Также было обнаружено, что коллапс  $\text{m}\Delta\Psi$  под действием  $\text{Ca}^{2+}$  и прооксидантов наблюдался при торможении ЭТЦ в условиях анаэробии и полностью обращался при аэрации среды инкубации. Кроме того, диссипация  $\text{m}\Delta\Psi$  не ингибировалась в присутствии ЦсА, но полностью предотвра-

шалась благодаря присутствию в среде инкубации ДТТ или хелаторов  $\text{Ca}^{2+}$  (ЭГТА и ЭДТА). На основании полученных результатов авторы пришли к заключению, что в митохондриях семядолей люпина индукция mPTP в состоянии низкой проводимости происходила при повышении в матриксе уровня АФК и  $\text{Ca}^{2+}$ , а также при торможении работы ЭТЦ в условиях гипоксии, которые, по-видимому, дополнительно повышают чувствительность (“сенсibiliзируют”) поры к ее активаторам, в частности, к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  [54]. Следует также отметить, что митохондрии семядолей люпина могут служить удобной моделью для изучения свойств mPTP, поскольку способны без использования  $\text{Ca}^{2+}$  ионофоров поглощать и накапливать экзогенный  $\text{Ca}^{2+}$ , хотя и с более низкой скоростью, чем митохондрии животных (печени крысы). Это важно, так как одной из главных трудностей в активации mPTP в митохондриях, выделенных из многих растительных объектов, является, как уже отмечалось, низкая активность механизмов, обеспечивающих транспорт в матриксе экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$ , в первую очередь, низкая активность в этих органеллах  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортера [46, 53].

Несмотря на полное отсутствие работ, специально посвященных изучению молекулярной структуры PT поры в митохондриях растений, общепринято, что она не должна существенно отличаться от таковой в митохондриях животных и дрожжей, учитывая сходство основных механизмов регуляции их активности [25, 55]. Кроме того, в митохондриях растений присутствуют все те же основные компоненты mPTP, которые в разное время были включены в ее структуру: VDAC, транслокатор адениновых нуклеотидов (ANT), циклофилин D, переносчик  $\text{P}_i$ , АТФ-синтаза и др. [55]. В этой связи следует отметить еще одно обстоятельство. Как отмечено выше, в митохондриях животных и растений функционирование mPTP в различном состоянии регулируется примерно одинаковым способом, т.е. активируется  $\text{Ca}^{2+}$ , АФК, прооксидантами, тиол-окисляющими агентами, аноксией, а тормозится в присутствии ЦсА (хотя у растений не всегда), антиоксидантов, ДТТ, аденилатов, а также при снижении pH среды инкубации органелл. Учитывая, что активность mPTP в состоянии высокой и низкой проводимости, согласно современным представлениям, катализируют два различных канала, образуемых соответственно АТФ-синтазой и ANT, подобное сходство в регуляции их активности может свидетельствовать о близком контакте указанных переносчиков в интактных митохондриях растений. Действительно, как уже было отмечено выше, имеются данные о том, что в митохондриях животных АТФ-синтаза образует стабильную связь или близкий контакт с ANT и переносчиком фосфата, формируя, таким образом, АТФ-син-

тасому [18]. Полагают, что благодаря такому строению mPTP возможна, например, механическая передача регуляторного воздействия  $\text{Ca}^{2+}$  через соответствующие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие центры АТФ-синтазы и изменение ее конформации, на изменение конформации ANT, катализирующего при наличии дополнительных условий функционирование поры в состоянии низкой проводимости [18]. Не исключено присутствие АТФ-синтасомы и в митохондриях растений, поскольку механизмы регуляции ее функционирования в состоянии низкой и высокой проводимости также имеют много общего.

Вызывает интерес участие некоторых стрессовых фитогормонов, прежде всего, СК и фитомелатонина в качестве возможных регуляторов mPTP у растений, благодаря, прежде всего, их влиянию на образование АФК органеллами и поддержание редокс-гомеостаза в различных компартментах клетки, включая митохондрии. Показано, что при накоплении эндогенной СК в клетках растений в условиях биотического и абиотического стресса, а также при действии экзогенной СК на изолированные митохондрии, она активирует образование АФК, в частности, перекиси водорода, которая является вторичным посредником передачи сигнала фитогормона и стимулирует экспрессию генов антиоксидантных ферментов и других защитных белков [56–59].

Однако если антиоксидантная защита клетки не срабатывает (например, при дальнейшем накоплении СК), в митохондриях возникает окислительный стресс. В этом случае СК способна ингибировать ЭТЦ и синтез АТФ, что ведет к дальнейшему повышению уровня АФК в митохондриях и клетке с последующей индукцией PCD [56, 60, 61]. Кроме того, было показано, что СК может индуцировать АФК-зависимую пермеабиллизацию внутренней мембраны митохондрий животных и растений вследствие открытия в ней mPTP, функционирование которой приводит к полной деполяризации внутренней мембраны, а в митохондриях печени крысы также к высокоамплитудному набуханию органелл и выходу из матрикса цитохрома c [50, 62]. Возможен и другой путь индукции пермеабиллизации внутренней мембраны под влиянием СК, не связанный с генерацией АФК. В работе Belt с соавт. [58] показано, что СК взаимодействует с ЭТЦ митохондрий растений на уровне убихинона, который является одним из регуляторов активности mPTP в митохондриях животных [12].

Фитомелатонин, присутствие которого у растений было показано немногим более 25 лет назад, будучи мощным антиоксидантом, прямо и косвенно вовлечен в процессы редокс-регуляции в митохондриях и клетках, особенно в стрессовых условиях [63, 64]. Многочисленные исследования

показали, что мелатонин во взаимодействии с другими фитогормонами, играет ключевую роль в повышении иммунитета растений и формировании неспецифической устойчивости к действию различных видов абиотического и биотического стресса [63, 65]. Однако механизмы, посредством которых этот индоламин повышает стресс-устойчивость растений, остаются не до конца выясненными. Вместе с тем, весьма вероятно, что, как и в случае с СК, мишенью (или одной из мишеней) действия мелатонина станут митохондрии, которые, наряду с хлоропластами, являются местом биосинтеза этого гормона. Показано, например, что обработка мелатонином (200 нМ) предотвращала накопление АФК, ДНК фрагментацию, выход цитохрома *c* из митохондрий и Рb-индуцируемую РСД в клеточной культуре табака линии ВУ 2 [66]. Нами было показано, что мелатонин способен существенно ингибировать образование АФК (перекиси водорода) митохондриями семян люпина при окислении сукцината [59]. Интересно, что обработка проростков *A. thaliana* мелатонином помимо индукции экспрессии генов антиоксидантных белков (аскорбатпероксидазы и каталазы), также активировала процесс аутофагии. Это рассматривается авторами как дополнительный способ защиты растений мелатонином, способствующий их выживанию в условиях окислительного стресса, когда антиоксидантная система не срабатывает и необходимо удаление из клетки поврежденных белков [67].

На митохондриях животных (скелетных мышц) показано, что мелатонин ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$  М) предотвращал индуцируемую прооксидантами деполяризацию митохондрий и открытие р-mPTR, путем снижения ее чувствительности к ионам  $Ca^{2+}$  [68]. На митохондриях мозга крысы обнаружено, что мелатонин и первичные продукты его метаболизации, в частности циклический 3-гидроксимелатонин, не ингибировали открытие mPTR, а стабилизировали ее в состоянии низкой проводимости (t-mPTR), что, по мнению авторов, может играть важную протекторную роль в условиях окислительного стресса, предотвращая избыточное накопление в матриксе  $Ca^{2+}$ , открытие mPTR в состоянии высокой проводимости и индукцию апоптоза [69]. К сожалению, в литературе пока практически нет данных о влиянии фитомелатонина на функционирование mPTR в митохондриях растений.

#### ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ МИТОХОНДРИЙ И ИНДУКЦИИ mPTR В ПРОЦЕССЕ ПРОГРАММИРУЕМОЙ СМЕРТИ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ (PCD)

Если присутствие mPTR в митохондриях растений не вызывает сомнений, выяснение ее функциональной роли, например, в процессе РСД у этих организмов, в настоящее время, сопровождается

оживленными дискуссиями. Известно, что у животных и растений функционируют различные пути, ведущие к смерти клеток, как в процессе нормального развития организма, так и в результате действия на него различных стрессовых факторов. По аналогии с основными типами РСД у животных (апоптоз, некроз и аутофагия), выделяют три пути (или типа) РСД у растений: апоптозо-подобный (AL-PCD), некрозо-подобный (NL-PCD) или не лизосомный РСД, и аутофагию (Autophagy) [70, 71]. Постулируется, что у растений отсутствует ряд отличительных морфологических признаков, характеризующих апоптоз в клетках животных, таких как формирование апоптозных телец и их поглощение (engulfment) в ходе фагоцитоза лизосомами соседних клеток [70]. Кроме того, у растений отсутствуют некоторые биохимические механизмы, обеспечивающие индукцию и прохождение “классического” апоптоза с участием митохондрий животных. В частности, у них не были найдены гены белков семейства Bcl-2, регулирующих проницаемость внешней мембраны митохондрий животных, а также гены специфических протеаз – каспаз, активируемых проапоптозными белками (цит. *c* и AIF), выходящими из митохондрий при пермеабилзации внешней мембраны [70, 72]. Поэтому, в классическом варианте этого понятия апоптоз у растений пока не обнаружен, а процесс AL-PCD по некоторым параметрам более близок к mPTR-индуцируемому некроптозу у животных, разновидности mPCD, в которой важную роль играет повышение в матриксе уровня  $Ca^{2+}$ , а также генерация АФК митохондриями и пермеабилзация внутренней мембраны органелл в результате открытия ЦсА-чувствительной mPTR [73]. Тем не менее, термин AL-PCD традиционно используются применительно к растениям, подчеркивая, в том числе, консервативность начальных этапов этого типа РСД, проходящих с участием митохондрий (образование пор в мембранах органелл, диссипация  $m\Delta\Psi$ , выход в цитозоль цитохрома *c* и активация протеаз), которые были обнаружены в клетках животных, растений и дрожжей. Кстати, по мнению некоторых авторов, у растений нет и типичной аутофагии, если строго придерживаться определения этого процесса РСД для животных [70].

В последнее время высказываются сомнения относительно корректности использования термина AL-PCD для обозначения одного из путей РСД у растений. Например, исходя из отсутствия влияния ЦсА и ЭГТА на индукцию mPCD высокой температурой в протопластах клеток табака линии ВУ-2, а также следя за изменениями их морфологии, высказывается мнение, что у растений апоптозный путь смерти клеток не сохранился, а основным способом их утилизации является процесс аутофагии, т.е. “самопереваривания” клеточного содержимого, протекающий внутри вакуолей

[74]. Несомненно, приведенные выше факты говорят о том, что процесс апоптоза в клетках растений существенно модифицирован. Однако представление о том, что в растениях полностью отсутствует AL-PCD, включая его начальную стадию, в которой ключевую регуляторную роль играют митохондрии, на наш взгляд, недостаточно обосновано. Во-первых, в растениях обнаружены апоптозо-подобные тельца, кроме того, появляются доказательства, что вакуоль может быть ключевым звеном на пути удаления поврежденных растительных клеток и клеточных структур, т.е. выполнять функции, аналогичные фагоцитозу у животных в ходе апоптоза [75]. Во-вторых, это представление противоречит большому количеству других экспериментальных данных, полученных при изучении процесса mPCD, идущего по пути AL-PCD во многих растительных объектах и индуцируемого различными стресс-факторами [75].

Следует сразу отметить, что, в отличие от животных, роль митохондрий растений в процессах PCD остается недостаточно изученной. Тем не менее, этому вопросу, уделялось и уделяется довольно много внимания. Наиболее часто в таких публикациях, которые суммированы в нижеприведенных обзорах, находила подтверждение важная или даже определяющая роль митохондрий, включая индукцию mPTP, в процессе гибели клеток растений, идущему по пути AL-PCD [75–80]. В указанных обзорах приведены и проанализированы характерные морфологические и биохимические признаки AL-PCD в клетках растений, которые аналогичны процессу апоптоза: уменьшение (конденсация) объема клетки (протопласта), при сохранении целостности плазмалеммы, конденсация хроматина с последующей олигомеризацией молекул ДНК вследствие активации эндонуклеаз и появление “ДНК-лестницы” (DNA-laddering) в гелях при электрофорезе, повышенная генерация АФК митохондриями, индукция р-PTP и диссипация  $m\Delta\Psi$ , нарушение целостности мембран, выход в цитозоль цитохрома *c*, AIF и других белков, локализованных в межмембранном пространстве, а также активация каспазо-подобных протеаз (метакаспаз). Важно, что во многих случаях была продемонстрирована чувствительность процесса PCD к ЦсА и другим известным ингибиторам mPTP.

Во многих исследованиях на различных модельных растительных объектах и клеточных культурах в условиях *in vivo* были продемонстрированы диссипация  $m\Delta\Psi$ , выход цитохрома *c*, AIF, ДНК нуклеазы из межмембранного пространства митохондрий, с последующей фрагментацией ядерной ДНК и индукцией гибели клеток в ходе развития растений (формирование ксилемы и трахеид) [81], при действии на растения: абиотического стресса (высокой температуры, засоления, ультрафиолета) [80–84], различных метаболитов (маннозы, протопорфирина IX) [85, 86], фитогормонов (напри-

мер, СК) [87], а также вирусных токсинов и индукторов реакции сверхчувствительности (викторина, гарпина) [2, 88]. Кроме того, о роли mPTP в увеличении проницаемости мембран митохондрий и индукции PCD у растений свидетельствовало предотвращение или замедление по времени начала диссипации  $m\Delta\Psi$ , выхода цитохрома *c* и набухания митохондрий после обработки растений ее ингибитором – ЦсА [44, 48, 83–85, 87, 89]. В частности, было показано, что избыток ультрафиолета индуцировал PCD в протопластах *A. thaliana* [84]. В этом процессе участвовали каспазо-подобные протеазы, он сопровождался конденсацией и фрагментацией ядер, межнуклеосомной деградацией ДНК, появлением “ДНК-лестницы” и диссипацией  $m\Delta\Psi$  митохондрий. С использованием методов микроскопии и флуоресцентных индикаторов было обнаружено, что обработка растений UV-C индуцировала резкую активацию образования АФК митохондриями и хлоропластами. А прединкубация растений с аскорбиновой кислотой и ЦсА существенно замедляла развитие PCD и снижала процент протопластов подверженных гибели после облучения UV-C [84]. В другой работе, с использованием проточной цитометрии было изучено участие митохондрий в индукции PCD в протопластах табака при действии солевого стресса. Показано, что обработка протопластов 200 мМ NaCl приводила к резкому увеличению образования АФК митохондриями и диссипации  $m\Delta\Psi$ , которые регистрировались до появления признаков PCD (“ДНК-лестницы”), и которые ингибировались предобработкой растений ЦсА [83].

Имеются многочисленные данные о важной роли митохондрий в защите растений от болезней, вызванных патогенами, вирусными токсинами и элиситорами [88–91]. Биотический стресс, вызванный атакой биотрофных патогенов или их токсинов индуцирует резкую ответную реакцию организма – реакцию сверхчувствительности (СВЧ), которая сопровождается созданием в пораженной ткани (например, листа) локальной защитной зоны, состоящей из мертвых клеток. Судя по имеющейся литературе можно заключить, что в ходе СВЧ митохондрии играют ключевую роль в регуляции PCD, суммируя и интегрируя многие сигналы, поступающие в клетку различными путями [89, 90]. Среди таких сигналов могут быть, стресс-индуцируемое повышение в цитозоле уровня  $Ca^{2+}$ , а также АФК,  $NO^{\cdot}$  и других АФА, накопление стрессовых фитогормонов, например, СК, действие которых на митохондрии определяет дальнейшую судьбу клетки. Неоднократно было показано, что в зоне поражения ткани гибель клеток происходит также по пути AL-PCD, поскольку она сопровождается конденсацией ядер, фрагментацией ДНК, потерей  $m\Delta\Psi$  митохондрий, выходом из них цитохрома *c* и активацией каспазо-подобных протеаз, которая частично обращается обра-

боткой растений ЦсА [44, 75, 88–90]. Учитывая, что в литературе до недавнего времени отсутствовали данные о способности цитохрома *c* или других белков, выходящих из митохондрий, активировать протеазы в цитозоле растительных клеток, высказывалось мнение, что СВЧ-индуцируемый выход цитохрома *c* из митохондрий может отражать конечную стадию дисфункции органелл, быть причиной повышенной генерации ими АФК, но не являться непосредственным триггером PCD [90].

Однако не исключено, что положение дел с возможностью прямого взаимодействия (и активации?) цитохрома *c* и протеаз или других белков, участвующих в процессе PCD у растений, может серьезно измениться. Во-первых, было показано, что, хотя канонические каспазы отсутствуют у растений, тем не менее, протеазы, действительно, вовлечены в процесс PCD у растений, демонстрируя при этом каспазо-подобную специфичность [92, 93]. Во-вторых, с использованием методов протеомики было обнаружено, что цитохром *c* *A. thaliana* в условиях *in vitro* может специфически контактировать в цитозоле растительных и животных клеток с десятком различными белками, участвующими в различных биохимических процессах (белкового фолдинга, регуляции трансляции и т.д.), в том числе, с протеазами, играющими ключевую роль в процессе PCD [94]. Наконец, недавно была обнаружена еще одна интересная мишень цитохрома *c* – это изоформа белка 14-3-3i *A. thaliana*, являющаяся аналогом соответствующего белка человека (14-3-3e), который является ингибитором AIF и играет ключевую роль на начальном этапе PCD у животных [95]. В условиях *in vivo* и *in vitro* показано, что цитохром *c* способен блокировать 14-3-3i и, таким образом, регулировать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцируемый процесс PCD в протопластах *A. thaliana* [95].

Следует также отметить, что появление цитохрома *c* в цитозоле клеток растений (и участие в процессе PCD), по-видимому, возможно без открытия p-mPTP и набухания митохондрий. В литературе есть данные, указывающие на возможность индукции поры во внешней мембране митохондрий растений с участием порообразующих белков типа BAX [77]. В частности, показано, что гетерологическая экспрессия животного белка BAX индуцировала PCD в растениях *A. thaliana*, которая подавлялась суперэкспрессией его ингибитора – BI-1 (BAX Inhibitor 1) [96]. Постулируется, что BI-1 является эволюционно консервативным белком и участвует в регуляции процесса PCD у животных и растений [77, 97]. С учетом вышеприведенных данных о множественности мишеней цитохрома *c*, эти результаты, на наш взгляд, подтверждают возможность существования у растений механизма PCD, являющегося близким аналогом классического апоптоза. Этот механизм включает образование поры во внешней

мембране органелл с участием Bcl-2-подобных белков, а также формирование апоптосома-подобного комплекса после выхода цитохрома *c* и других проапоптотических белков из митохондрий в цитозоль [75, 77, 98].

Как уже отмечалось выше, индукция mPTP в состоянии низкой проводимости в митохондриях животных может использоваться в качестве механизма, обеспечивающего быстрый выход из матрикса ионов Ca<sup>2+</sup>, благодаря чему они способны играть ключевую роль в гомеостатировании уровня этого катиона в цитозоле клеток, принимать активное участие в Ca<sup>2+</sup>-сигналинге, а также защищать органеллы от критического повышения уровня Ca<sup>2+</sup> и АФК в матриксе [22, 30, 99]. К сожалению, для митохондрий растений этот вопрос остается малоизученным, хотя нами было показано, что пермеабиллизация внутренней мембраны митохондрий семян люпина, вследствие открытия t-mPTP, сопровождалась довольно быстрым выходом из матрикса накопленного Ca<sup>2+</sup> [54]. Тем не менее, эта скорость была существенно ниже, чем в присутствии Ca<sup>2+</sup>-ионофора (A23), а, кроме того, выход Ca<sup>2+</sup> мог быть связан с активацией или демаскированием (в результате ингибирования энергозависимого импорта Ca<sup>2+</sup>) других транспортных механизмов, например, Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup>- или Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортеров, катализирующих экспорт этого катиона из митохондрий животных и растений [96, 100]. Поэтому, для выяснения возможной функции t-mPTP в митохондриях растений в качестве Ca<sup>2+</sup>-канала, или разобщающего канала, в случае транспорта небольших катионов, необходимы дополнительные исследования.

Суммируя изложенные в обзоре материалы следует отметить, что, несмотря на существенный прогресс, достигнутый к настоящему времени в изучении mPTP в митохондриях животных, “белые пятна” все еще остаются, как в отношении ее структуры, так и механизмов регуляции активности. Однако гораздо более загадочными в настоящее время представляется регуляция функционирования и физиологическая роль mPTP в митохондриях растений, если априори признать ее строение тождественным с аналогом у животных [55]. Действительно, в литературе не стихают споры относительно существования AL-PCD у растений, даже с учетом его специфики, что создает проблему с определением функции mPTP. Как уже отмечалось, в последнее время в качестве основного пути PCD у растений рассматриваются и наиболее активно исследуются процессы аутофагии, а также ее селективной формы – митофагии [101, 102]. Однако следует отметить, что приведенные выше примеры не противоречат тому, что различные типы PCD, включая аутофагию, имеют место у растений в ходе их нормального развития и в стрессовых условиях. Значение аутофагии

(митофагии) у растений, как и у животных или дрожжей заключается, либо в поддержании жизнедеятельности клетки путем удаления поврежденных молекул и митохондрий, путем заключения их в ограниченные двойной мембраной везикулы — аутофагосомы, препятствуя выходу из них белков иницирующих РСД, либо в индукции ее гибели, в том случае, если повреждение указанных клеточных структур достигло критического масштаба [102–104]. Другими словами, аутофагия может быть как ингибитором, так и активатором процесса РСД у растений. Более того, не исключено, что различные типы РСД протекают в клетках растений последовательно или параллельно и, например, митофагия может быть первичным ответом клетки на появление поврежденных митохондрий, характеризующихся повышенным образованием АФК и потерей мΔΨ вследствие индукции мРТР [102, 105]. Показано, например, что при образовании перфораций в листьях *Aponogeton madagascariensis* в ходе РСД, идущего по пути мегга-аутофагии, на раннем этапе в клетках были обнаружены многочисленные везикулы, содержащие агрегаты поврежденных, лишенных мΔΨ митохондрий, которые мигрировали в вакуоли на позднем этапе РСД. При этом процесс перфорации листьев существенно замедлялся при обработке растений ЦсА [98, 106, 107].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализируя имеющиеся в литературе данные, можно заключить, что в ходе роста и развития растений в нормальных и стрессовых условиях митохондрии, будучи центром энергетического и пластического обмена, играют ключевую роль в процессах восприятия, интеграции и амплификации сигналов, поступающих в клетку различными путями и выступают в качестве основного регулятора процесса РСД независимо от его типа. На это указывает сходство многих регуляторов и сигналов, индуцирующих различные пути РСД: увеличение уровня АФК, АФА и концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле и матриксе митохондрий, деполяризация внутренней мембраны митохондрий, увеличение концентрации стрессовых фитогормонов и т.д. Об этом свидетельствует и неоднократно доказанная экспериментально консервативность первичных этапов индукции РСД в клетках животных и растений, включая диссипацию мΔΨ, вследствие индукции мРТР, выход из органелл цитохрома *c*, а также обращение этого процесса под влиянием ЦсА. Было бы удивительно, если бы митохондрии, способные адекватно и системно реагировать на изменения метаболизма в ходе нормального развития растений, а также на действие различных неблагоприятных факторов среды, поддерживая жизнедеятельность клетки, были исключены из участия в программах,

направленных на упорядоченный разбор клеточных структур в ходе ее естественной или стресс-индуцируемой гибели. Конечно, для выяснения конкретных механизмов, обеспечивающих взаимосвязь между нарушением функционирования митохондрий под влиянием внешних и внутренних факторов, и индукцией разных типов РСД у растений необходимы дополнительные исследования.

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 глобального климата и антропогенному загрязнению окружающей среды”).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных как качество объектов исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death // *Apoptosis*. 2007. V. 12. P. 913.  
<https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
2. Giorgi C., Marchi S., Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. P. 713.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
3. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 363.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
4. Hansen K.G., Herrmann J.M. Transport of proteins into mitochondria // *Protein J.* 2019. V. 38. P. 330.  
<https://doi.org/10.1007/s10930-019-09819-6>
5. Giacomello M., Pyakurel A., Glytsou C., Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 204.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
6. Rosencrans W.M., Rajendran M., Bezrukov S.M., Ros-tovtseva T.K. VDAC regulation of mitochondrial calcium flux: from channel biophysics to disease // *Cell Calcium*. 2021. V. 94:102356.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102356>
7. Hunter D.R., Haworth R.A. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms // *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 195. P. 453.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90371-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90371-0)
8. Haworth R.A., Hunter D.R. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the  $\text{Ca}^{2+}$  trigger site // *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 195. P. 460.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2)
9. Hunter D.R., Haworth R.A. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional  $\text{Ca}^{2+}$  release // *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 195. P. 468.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90373-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90373-4)

10. *Halestrap A.P.* What is the mitochondrial permeability transition pore // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2009. V. 46. P. 821.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>
11. *Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blalchy-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A.* The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 2077.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x>
12. *Bernardi P., Rassola A., Forte M., Lippe G.* The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, interaction in signal transduction, and role in pathophysiology // *Physiol. Rev.* 2015. V. 95. P. 1111.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>
13. *Bernardi P., Carraro M., Lippe G.* The mitochondrial permeability transition: recent progress and open questions // *FEBS J.* 2022. V. 289. P. 7051.  
<https://doi.org/10.1111/febs.162554>
14. *Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P.* Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition // *Cell Calcium.* 2018. V. 70. P. 56.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>
15. *Baines C.P.* Loss of the cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death // *Nature.* 2005. V. 434. P. 658.  
<https://doi.org/10.1038/nature03434>
16. *Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.* Mitochondrial membrane permeabilization in cell death // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 99.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
17. *Tajeddine N.* How do reactive oxygen species and calcium trigger mitochondrial membrane permeabilization? // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1860 P. 1079.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.013>
18. *Bonora M., Giorgi C., Pinton P.* Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. P. 266.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00433-y>
19. *Kanno T., Sato E.E., Muranaka S., Fujita H., Fujiwara T., Utsumi T., Inoue M., Utsumi K.* Oxidative stress underlies the mechanism for Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition of mitochondria // *Free Radic. Res.* 2004. V. 38. P. 27.  
<https://doi.org/10.1080/10715760310001626266>
20. *Martinez-Reyes I., Cuezva J.M.* The H<sup>+</sup>-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or survival // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1837. P. 1099.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.03.10>
21. *Bernardi P.* The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? // *Front. Physiol.* 2013. V. 4. P. 95.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00095>
22. *Ichas F., Mazat J.P.* From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1366 P. 33.  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00119-4)
23. *Petronilli V., Miotto G., Canton M., Brini M., Colonna R., Bernardi P., Di Lisa F.* Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 725.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77239-5)
24. *Newmeyer D.D., Ferguson-Miller S.* Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death // *Cell.* 2003. V. 112 P. 481.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00116-8)
25. *Vianello A., Casolo V., Petrusa E., Peresson C., Patui S., Bertolini A., Passamonti S., Braidot E., Zancani M.* The mitochondrial permeability transition pore (PTP) — an example of multiple molecular exaptation? // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1817. P. 2072.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.06.620>
26. *Yoon Y., Lee H., Federico M., Sheu S.-S.* Non-conventional mitochondrial permeability transition: its regulation by mitochondrial dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.* 2023. V. 1864:148914.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148914>
27. *Leung A.W.C., Halestrap A.P.* Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2008. V. 1777. P. 946.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.009>
28. *Boyman L., Coleman A.K., Zhao G., Wescott A.P., Joca H.C., Greiser B.M., Karbowski M., Ward C.W., Lederer W.G.* Dynamics of the mitochondrial permeability transition pore: transient and permanent opening events // *Arch. Biochem. Biophys.* 2019. V. 666. P. 31.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.016>
29. *Hüser J., Blatter L.A.* Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore // *Biochem J.* 1999. V. 343. P. 311.  
<https://doi.org/10.1042/bj3430311>
30. *Bernardi P., Von Stockum S.* The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup>-release channel: new answers to an old question // *Cell Calcium.* 2012. V. 52. P. 22.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.004>
31. *Crompton M.* The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *J. Biochem.* 1999. V. 341. P. 233.  
<https://doi.org/10.1042/bj3410233>
32. *Woodfield K., Rück A., Brdiczka D., Halestrap A.P.* Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition // *Biochem. J.* 1998. V. 336. P. 287.  
<https://doi.org/10.1042/bj3360287>
33. *Kokoszka J.E.* The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore // *Nature.* 2004. V. 427. P. 461.  
<https://doi.org/10.1038/nature02229>
34. *Gutiérrez-Aguilar M.* Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014. V. 72. P. 316.  
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>
35. *Giorgio V., Von Stockum S., Antoniel M., Fabbro A., Fogolari F., Forte M., Glick G.D., Petronilli V., Zoratti M., Szabó I., Lippe G., Bernardi P.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore //

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 5887.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>
36. *Alavian K.N., Beutner G., Lazrove E., Sacchetti S., Park H.A., Licznarski P., Li H., Nabili P., Hockensmith K., Graham M., Potter G.A. Jr., Jonas E.A.* An uncoupling channel with the c-subunit ring of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111 P. 10580.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1401591111>
  37. *Bonora M., Morganti C., Morciano G., Pedriali G., Lebedzinska-Arciszewska M., Aquila G., Giorgi C., Rizzo P., Campo G., Ferrari R., Kroemer G., Wieckowski M.R., Galluzzi L., Pinton P.* Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase dimers and C-ring conformation // EMBO Rep. 2017. V. 18. P. 1077.  
<https://doi.org/10.15252/embr.201643602>
  38. *Galber C., Minervini G., Cannino G., Boldrin F., Petronilli V., Tosatto S., Lippe G., Giorgio V.* The f subunit of human ATP synthase is essential for normal mitochondrial morphology and permeability transition // Cell Rep. 2021. V. 35. P. 109.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109111>
  39. *Giorgio V., Burchel V., Schiavone M., Bassot C., Minervini G., Petronilli V., Argenton F., Forte M., Tosatto S., Lippe G., Bernardi P.* Ca<sup>2+</sup> binding to F<sub>1</sub>-ATP synthase beta subunit triggers the mitochondrial permeability transition // EMBO Rep. 2017. V. 18. P. 1065.  
<https://doi.org/10.15252/embr.201643354>
  40. *Karch J., Bround M.J., Khalil H., Sargent M.A., Latchman N., Terada N., Peixoto P.M., Molkentin J.D.* Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD // Sci. Adv. 2019. V. 5. eaaw4597.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4597>
  41. *Neginskaya M.A., Solesio M.E., Berezhnaya E.V., Amodeo G.F., Mnatsakanyan N., Jonas E.A., Pavlov E.V.* ATP synthase c-subunit-deficient mitochondria have a small cyclosporine a-sensitive channel, but lack the permeability transition pore // Cell Rep. 2019. V. 26. P. 11.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.033>
  42. *Carrer A., Tommasin L., Šileikytė J., Ciscato F., Filadi R., Urbani A., Forte M., Rasola A., Szabó I., Carraro M., Bernardi P.* Defining the molecular mechanisms of the mitochondrial permeability transition through genetic manipulation of F-ATP synthase // Nat. Commun. 2019. V. 12:4835.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25161-x>
  43. *Vianello A., Macri F., Braidot E., Mokhova E.N.* Effect of cyclosporin A on energy coupling in pea stem mitochondria // FEBS Lett. 1995. V. 371. P. 258.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00897-i](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00897-i)
  44. *Curtis M.J., Wolpert T.J.* The victorine induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without of membrane integrity // Plant J. 2004. V. 38. P. 244.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02040.x>
  45. *Fortes F., Castilho R.F., Catisti R., Carnieri E.G.S., Vercesi A.E.* Ca<sup>2+</sup> -induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore in isolated potato tuber mitochondria mediated by reactive oxygen species // J. Bioenerg. Biomembr. 2001. V. 33. P. 43.  
<https://doi.org/10.1023/a:1005672623709>
  46. *Arpagaus S., Rawyler A., Braendle R.* Occurrence and characteristics of the mitochondrial permeability transition in plants // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 1780.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109416200>
  47. *Virolainen E., Blokhina O., Fagerstedt K.* Ca<sup>2+</sup>-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress // Ann. Bot. 2002. V. 90. P. 509.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf221>
  48. *Tiwari B.S., Belenghi B., Levine A.* Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 1271.  
<https://doi.org/10.1104/pp.010999>
  49. *Morimoto S., Tanaka Y., Sasaki K., Tanaka H., Fukamizu T., Shoyama Y., Shoyama Sh., Taura F.* Identification and characterization of cannabinoids that induce cell death through mitochondrial permeability transition in *Cannabis* leaf cells // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 20739.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700133200>
  50. *Shugaev A.G., Butsanets P.A., Shugaeva N.A.* Salicylic acid induces the proton conductance in the inner mitochondrial membrane of lupine cotyledons // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 727.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443716060091>
  51. *Romano P.G.N., Horton P., Gray J.* The *Arabidopsis* cyclophilin gene family // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 1268.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103022160>
  52. *Mainali H.R., Chapman P., Dhaubhadel S.* Genome-wide analysis of cyclophilin gen family in soybean (*Glycine max*) // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. P. 282.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0282-7>
  53. *De Coll V., Petruzza E., Casolo U., Braidot E., Filippi A., Peresson C., Patui S., Bertolini A., Giorgio V., Checchetto V., Vianello A., Bernardi P., Zancani M.* Properties of the permeability transition of pea stem mitochondria // Front. Physiol. 2018. V. 9:1626. .  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01626>
  54. *Shugaev A.G., Butsanets P.A., Shugaeva N.A.* Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of proton permeability of the inner membrane in the mitochondria of lupine cotyledons // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70: 73.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443723700127>
  55. *Zancani M., Casolo V., Petruzza E., Peresson C., Patui S., Bertolini A., De Coll V., Braidot E., Boscutti., Vianello A.* The permeability transition in plant mitochondria: the missing link // Front. Plant. Sci. 2015. V. 6. P. 1120.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01120>
  56. *Vlot C.A., Depsey D.A., Klessig D.F.* Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease // Annu. Rev. Phytopathol. 2009. V. 47. P. 177.  
<https://doi.org/10.1146/annualrev.phyto.050908.135202>
  57. *Nie S., Yue H., Zhou J., Xing D.* Mitochondrial-derived reactive oxygen species play a pivotal role in the salicylic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* // Plos

- One. 2015. V. 10. e0119853.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119853>
58. *Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H.* Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase // *Plant Physiol.* 2017. V. 173. P. 2029.  
<https://doi.org/10.1104/pp.1600060>
  59. *Butsanets P.A., Shugaeva N.A., Shugaev A.G.* Effect of melatonin and salicylic acid on ROS generation by mitochondria of lupine seedlings // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 745.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443721040038>
  60. *Alvares M.E.* Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 44. P. 499.  
<https://doi.org/10.1023/a:1026561029533>
  61. *Poore P.* Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 341.  
<https://doi.org/10.3390/biom10020341>
  62. *Battaglia V., Salvi M., Toninello A.* Oxidative stress is responsible for mitochondrial permeability transition induction by salicylate in liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 33864.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M502391200>
  63. *Arnao M.B., Hernandez-Ruis J.* Functions of melatonin in plants: a review // *J. Pineal. Res.* 2015. V. 59. P. 133.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12253>
  64. *Khanna K., Bhardwaj R., Ahmad P., Reiter R.* Phyto-melatonin: a master regulator for plant oxidative stress management // *Plant Physiol. Biochem.* 2023. V. 196. P. 260.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.01.035>
  65. *Hu C.-H., Zheng Y., Tong C.-L., Zhang D.-J.* Effects of exogenous melatonin on plant growth, root hormones and photosynthetic characteristics of trifoliolate orange subjected to salt stress // *Plant Growth Regul.* 2022. V. 97. P. 551.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-022-00814-z>
  66. *Kobylnska A., Reiter R., Postmyk M.* Melatonin protects cultured tobacco cells against lead-induced cell death via inhibition of cytochrome c translocation // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 14: 1560.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01560>
  67. *Wang P., Sun X., Wang N., Tan D.-X., Ma F.* Melatonin enhances the occurrence of autophagy induced by oxidative stress in *Arabidopsis* seedlings // *J. Pineal. Res.* 2015. V. 58. P. 479.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12233>
  68. *Hibaoui Y., Roulet E., Ruegg U.T.* Melatonin prevents oxidative stress-mediated mitochondrial permeability transition and death in skeletal muscle cells // *J. Pineal. Res.* 2009. V. 47. P. 238.  
<https://doi.org/j.1600-079X.2009.00707>
  69. *Jou M.-J., Peng T.-I., Reiter R.J.* Protective stabilization of mitochondrial permeability transition and mitochondrial oxidation during mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  stress by melatonin's cascade metabolites C3-OHM and AFMK in RBA1 astrocytes // *J. Pineal. Res.* 2018. V. 66. e12538.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12538>
  70. *Van Doorn W.G., Woltering E.* Many ways to exit? Cell death categories in plants // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 117.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.01.006>
  71. *Wang P., Mugume Y., Bassman D.C.* New advances in autophagy in plants: regulation, selectivity and function // *Sem. Cell Develop. Biol.* 2018. V. 80. P. 133.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.018>
  72. *Bock F.J., Tait S.W.* Mitochondria as multifaceted regulator of cell death // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 85.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
  73. *Chu Q., Gu X., Zheng Q., Wang J., Zhu H.* Mitochondrial mechanisms of apoptosis and necrosis in liver diseases // *Anal. Cell. Pathol.* 2021. V. 2021: 8900122.  
<https://doi.org/10.1155/2021/8900122>
  74. *Minina E.A., Dauphinee A.N., Ballhaus F., Gogvadze V., Stemenko A.P., Bozhkov P.V.* Apoptosis is not conserved in plants as revealed by critical examination of model for plant apoptosis-like cell death // *BMC Biology.* 2021. V. 19: 100.  
<https://doi.org/10.1185/s12915-021-01018-z>
  75. *Dickman M., Williams B., Li Y., Figueiredo P., Wolpert T.* Reassessing apoptosis in plant // *Nat. Plants.* 2017. V. 3. P. 773.  
<https://doi.org/10.1038/s4147-017-0020-x>
  76. *Jones A.* Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? // *Trends Plant Sci.* 2000. V. 5. P. 225.  
[https://doi.org/10.1016/s1360-1380\(00\)01605-8](https://doi.org/10.1016/s1360-1380(00)01605-8)
  77. *Vianello A., Zancani M., Peresson C., Petrusa E., Casolo V., Krajnakova J., Patui S., Braidot E., Macri F.* Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. P. 242.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00767.x>
  78. *Reape T.J., McCabe P.F.* Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants // *Apoptosis.* 2010. V. 15. P. 249.  
<https://doi.org/10.1007/s10495-009-0447-2>
  79. *Van Aken O., Van Breusegem F.* Licensed to kill: mitochondria, chloroplasts, and cell death // *Trends Plant Sci.* 2015. V. 20. P. 754.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.002>
  80. *Gutierrez-Aguilar M.* Mitochondrial calcium transport and permeability transition as rational targets for plant protection // *Biochim. Biophys. Acta.* 2020. V. 1861. P. 148.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148288>
  81. *Yu X.H., Perdue T.D., Heimer Y.M., Jones A.M.* Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death // *Cell Death Differ.* 2002. V. 9. P. 189.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400940>
  82. *Vacca R.A., Valenti D., Bobba A., Merafina R.S., Pas-sarella S., Marra E.* Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 208.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.078683>
  83. *Lin J., Wang Y., Wang G.* Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated

- by reactive by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status // *J. Plant Physiol.* 2006. V. 163. P. 731.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.06.016>
84. Gao C., Xing D., Li L., Zang L. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure // *Planta.* 2008. V. 227. P. 755.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-007-0654-4>
  85. Stein J.C., Hansen G.M. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cells // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P. 71.  
<https://doi.org/1104/pp.121.1.71>
  86. Yao N., Eisfelder B.J., Marvin J., Greenberg J.T. The mitochondria: an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2004. V. 40. P. 1803.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02239.x>
  87. Garcia-Heredia L.M., Hervas M., De la Rosa M.A., Navaro J.A. Acetylsalicylic acid induced programmed death in *Arabidopsis* cell cultures // *Planta.* 2008. V. 228. P. 89.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-008-0721-5>
  88. Krause M., Durner J. Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2004. V. 17. P. 131.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.2.131>
  89. Amirsadeghi S., Robson C., Vanlerberghe G.C. The role of the mitochondria in plant responses to biotic stress // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. P. 253.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00775.x>
  90. Mur L.A., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E. The hypersensitive response: the centenary is upon us but much do we know? // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 501.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm239>
  91. Colombatti F., Gonzales D.H., Welchen E. Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath? // *Mitochondrion.* 2014. V. 19. P. 238.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.006>
  92. Salvesen G.S., Hempel A., Coll N.S. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death // *FEBS J.* 2016. V. 238. P. 2577.  
<https://doi.org/10.1111/febs.13616>
  93. Buono A.R., Hudecek R., Nowack M.K. The roles of proteases during developmental programmed cell death in plant // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 2097.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz072>
  94. Martinez-Fabregas J., Diaz-Moreno I., Gonzales-Arzola K., Janocha S., Navarro J.A., Hervás M., Bernhardt R., Diaz-Quintana A., De la Rosa M.A. New *Arabidopsis thaliana* cytochrome *c* partners: a look into the elusive role of cytochrome *c* in Programmed Cell Death in plants // *Mol. Cell Proteomics.* 2013. V. 12. P. 3666.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M113.030692>
  95. Elena-Real C.A., Gonzalez-Arzola K., Peres-Mejias G., Diaz-Quintana A., Velazquez-Campoy A., Desvoyes B., Gutierrez C., De la Rosa M.A., Diaz-Moreno I. Proposed mechanism for regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced programmed cell death in plants by binding cytochrome *c* to 14-3-3 proteins // *Plant J.* 2021. V. 106. P. 74.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.15146>
  96. Kawai-Yamada M., Ohori Y., Uchimiya H. Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor -1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 21.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.014613>
  97. Watanabe N., Lam E. Recent advance in the study of caspase- like proteases and Bax inhibitor 1 in plants: their possible role as regulator of programmed cell death // *Mol. Plant Patol.* 2004. V. 5. P. 65.  
<https://doi.org/10.1111/1364-3703-2004-00206>
  98. Lord C.E.N., Gunawardena A.H.L.A.N. Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants // *Eur. J. Cell Biol.* 2012. V. 91. P. 603.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.02.002>
  99. De Marchi E., Bonora M., Giorgi C., Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux // *Cell Calcium.* 2014. V. 56. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.03.004>
  100. Carraretto L., Checchetto V., De Bortoli S., Formentin E., Costa A., Szabo I., Teardo E. Calcium flux across plant mitochondrial membranes: possible molecular players // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: 354.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00354>
  101. Bozhkov P.V. Plant autophagy mechanisms and function // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 1281.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery070>
  102. Broda M., Millar A. H., Van Aken O. Mitophagy: a mechanism for plant growth and survival // *Trend Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 434.  
<https://doi.org/10.1016/j.plants.2018.02.010>
  103. Ren K., Feng L., Sun S., Zhuang X. Plant mitophagy in comparison to mammals: what is still missing? // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 1236.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22031236>
  104. Kumar R., Reichert A.S. Common principles and specific mechanisms of mitophagy from yeast to humans // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 4363.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22094363>
  105. Ye C., Zheng S., Jiang D., Lu J., Huang Z., Liu Z., Zhou H., Zhuang H., Li J. Initiation and execution of programmed cell death and regulation of reactive oxygen species in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 12942.  
<https://doi.org/10.3390/ijms.222312942>
  106. Lord C.E.N., Weitman J.N., Lane S., Gunawardena A.H. Do mitochondria play a role in remodeling lace plant leaves during programmed cell death? // *BMC Plant Biol.* 2011. V. 11. P. 102.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-102>
  107. Weitman J., Lord E.N., Dauphinee, Gunawardena A.H. The pathway of cell dismantling during programmed cell death in lace plant (*Aponogeton madagascariensis*) leaves // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. P. 115.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-115>

## ВОЗРАСТНЫЕ И АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИСТЬЕВ ЗИМНЕ-ЗЕЛЕННОГО ТРАВЯНИСТОГО РАСТЕНИЯ *AJUGA REPTANS* L. В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ ТАЕЖНОЙ ЗОНЫ

© 2023 г. О. В. Дымова<sup>а</sup>, \*, И. Г. Захожий<sup>а</sup>, Т. К. Головко<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

\*e-mail: [dymovao@ib.komisc.ru](mailto:dymovao@ib.komisc.ru)

Поступила в редакцию 07.03.2023 г.

После доработки 16.03.2023 г.

Принята к публикации 16.03.2023 г.

Формирование и функционирование фотосинтетического аппарата (ФСА) находится под общим контролем растительного организма и постоянно меняющихся условий среды. Исследовали возрастные и адаптивные изменения пигментного комплекса, спектральных свойств и состояния фотосистемы II (ФС II) листьев парциальных побегов летне-зимне-зеленого травянистого многолетника *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая) в связи с перезимовкой. Появляющиеся в мае–июне розеточные листья новой генерации быстро накапливали фотосинтетические пигменты и формировали ФСА с высокой потенциальной ( $F_v/F_m$ ) и реальной квантовой эффективностью ФС II ( $\Phi_{PSII}$ ). Осенью (сентябрь–октябрь) содержание хлорофиллов составляло 10 мг/г сухой массы, величина  $F_v/F_m$  равнялась 0.8 отн. ед., а уровень  $\Phi_{PSII}$  при ФАР 130 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с) составлял около 0.7 отн. ед. Перезимовавшие листья содержали вдвое меньше фотосинтетических пигментов, накапливали значительное количество антоцианов, характеризовались низкой фотохимической активностью и высоким уровнем дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла. С возобновлением активной вегетации растений (май) отмечали частичное восстановление пигментного фонда и репарацию ФСА перезимовавших листьев, о чем свидетельствует увеличение показателей квантового выхода ФС II. Завершение жизненного цикла листьев сопровождалось снижением  $\Phi_{PSII}$  до 0.5 отн. ед. и резким увеличением тепловой диссипации энергии возбуждения (NPQ) до 0.9 отн. ед. Сезонные изменения спектральных свойств листьев и индексов фотохимического отражения в целом соответствовали динамике содержания пигментов и эффективности использования света при фотосинтезе. Полученные результаты указывают на существенную трансформацию структурно-функциональной организации ФСА в онтогенезе зимующих листьев. Генетически закрепленное свойство зимне-зеленых растений сохранять листья основано на способности их ФСА к восстановлению функциональной активности после шокового воздействия перезимовки, чему способствует комплекс адаптивных и защитных механизмов.

**Ключевые слова:** *Ajuga reptans*, зимне-зеленые листья, фотосинтетический аппарат, фотосинтетические пигменты, антоцианы, спектральные индексы, фотосистема II

DOI: 10.31857/S0015330323600237, EDN: WJNZQE

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших свойств фотосинтетического аппарата (ФСА) является способность к динамическому изменению функциональной активности в онтогенезе растений и под воздействием условий среды. Основной компонент ФСА —

встроенные в тилакоидные мембраны хлоропластов пигмент-белковые комплексы (ПБК) фотосистем, осуществляющие процессы поглощения, передачи и преобразования световой энергии. От их состояния в значительной степени зависит устойчивость растений, особенно зимующих с зелеными листьями [1–3]. Сохранение листьев позволяет растениям не тратить ресурсы и время на формирование ассимилирующей поверхности, чтобы более эффективно использовать благоприятный для фотосинтеза период. Важно отметить, что в сезонном климате такие растения подвергаются сильному воздействию неблагоприятных

**Сокращения:** АЦ — антоцианы, ВКЦ — виолаксантиновый цикл, Кар — каротиноиды, ФСА — фотосинтетический аппарат, ФС II — фотосистема II, Хл — хлорофиллы, DEPS — уровень дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла,  $F_v/F_m$  — максимальный квантовый выход ФС II,  $\Phi_{PSII}$  — реальный квантовый выход ФС II, NPQ — коэффициент нефотохимического тушения.

факторов среды, способных вызвать фотоокислительный стресс и фотоповреждение ФСА. Чтобы адаптироваться к условиям низкой температуры и избыточного света, зимующие с зелеными листьями растения выработали ряд защитных механизмов, активация которых проходит на фоне холодового закалывания [3–6]. Снижению поглощения световой энергии способствует частичная потеря хлорофилла (Хл), накопление каротиноидов (Кар) и устойчивое дезоксидирование виолаксантина до зеаксантина [6–10]. Многие виды растений накапливают нефотосинтетические пигменты фенольной природы – антоцианы (АЦ) в количествах, достаточных для изменения зеленого цвета листьев на красно-фиолетовый. Предполагается, что АЦ проявляют фотопротекторную и/или антиоксидантную функции, снижая риски повреждений ФСА [2, 11, 12]. Изменение пигментного фонда влияет на спектральные свойства листьев. Это позволяет использовать спектральный анализ для разработки неструктивных методов определения содержания пигментов и оценки состояния ФСА [13, 14].

Большинство имеющихся в литературе сведений о защитных механизмах, обеспечивающих перезимовку с зелеными листьями, получено в исследованиях на вечнозеленых древесных растениях [1, 7, 10, 15]. Данные для травянистых растений касаются в основном видов, обитающих в регионах с мягкой зимой. Так, например, в условиях Колорадо листья двулетних мезофитов *Malva neglecta* и *Verbascum thapsus* в зимний период проявляли более высокую фотосинтетическую активность, чем летом [6, 7]. Такой тип реакции обеспечивался повышением содержания фотосинтетических ферментов и тепловой диссипацией избыточно поглощенной энергии, обеспечиваемой быстро обратимым дезоксидированием виолаксантина в зеаксантин. Однако листья вечнозеленого кустарника *Pseudotsuga menziesii* в тех же условиях наиболее интенсивно фотосинтезировали весной, а зимой их ассимиляционная активность была близка к нулю. Согласно нашим данным, в период зимнего покоя у листьев хвойных деревьев на Европейском Севере наблюдалось значительное ингибирование фотохимической активности, скорости транспорта электронов через ФС II и способности ассимилировать CO<sub>2</sub> [15]. У травянистого многолетника *Ajuga reptans*, зимующего с зелеными листьями под толстым слоем снега, отмечали распад крупных ПБК фотосистем (мегакомплекса ФС I–ФС II и суперкомплекса ФС II–ССК II) и увеличение фонда свободных хлорофиллов [16]. Весной перезимовавшие листья были способны фотосинтезировать с интенсивностью 40–60% от наблюдаемой у зрелых, здоровых листьев до перезимовки [17].

Для получения более полной картины изменения состояния ФСА летне-зимне-зеленого травя-

нистого растения *Ajuga reptans* мы исследовали динамику пигментного комплекса, уровня дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла, показатели флуоресценции хлорофилла *a* ФС II и оптические свойства в онтогенезе зимующих листьев.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая) – травянистый многолетник семейства Lamiaceae со сложным онтогенезом, включающим смену вегетативных поколений. На северной границе ареала большинство растений являются побегами вегетативного происхождения (раметами) [17]. Раметы представляют собой розеточный укороченный побег с двумя-тремя парами листьев. В пазухах нижних листьев находятся почки, формирующие столоны. Их развитие происходит весной, но чаще в течение всего вегетационного периода. Цветение рамет наступает на третий-четвертый год жизни. Генеративные растения одновременно со столонами формируют удлиненный генеративный побег из цветочной почки, которая закладывалась осенью. В подзоне средней тайги европейского северо-востока России растения зимуют под опавшей листвой и толстым слоем снега. Активная жизнедеятельность *A. reptans* начинается в середине мая после схода снежного покрова. Растения появляются с перезимовавшими розеточными листьями, которые отмирают в июне. Заменяющие их листья новой генерации формируются в мае-июне, активно функционируют до поздней осени (с сентября до начала октября) и сохраняют способность к фотосинтезу после перезимовки. Таким образом, продолжительность жизни этих листьев составляет немногим более года.

Исследования проводили в 2016–2018 гг. Растения *A. reptans* произрастали в смешанном елово-осиновом лесу в окрестностях г. Сыктывкара (61°34' с.ш., 50°33' в.д.). По данным [18] среднегодовая температура воздуха в районе исследований составляет +1°C, среднесуточная температура самого теплого месяца (июля) – +17°C, самого холодного (января) – –16°C. Годовое количество осадков – 600–700 мм. Выпадение атмосферных осадков в виде снега начинается в середине октября, устойчивый снежный покров формируется в первой декаде ноября, к январю его толщина достигает 60 см. Сход снега отмечается в первой, редко второй декадах мая. Переход средней суточной температуры через 0°C весной происходит во второй декаде апреля, осенью – в первой декаде октября. Длительность безморозного периода составляет 180–190 дней, а продолжительность периода со среднесуточной температурой >5°C – около 160 дней. Наибольшее поступление солнечной радиации на открытую поверхность, 610 МДж/м<sup>2</sup>, приходится на июнь. Плотность по-

тока ФАР в летнее время под лесным пологом составляет в среднем 120–150 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с) [17, 19].

Образцы листьев (25–30 штук) отбирали в первой половине дня в разные сезоны года. Для анализов использовали листья со средней части двух-трехлетних розеточных побегов. После отчуждения листья немедленно доставляли в лабораторию. Часть растительного материала фиксировали в жидком азоте. Остальные листья акклиматизировали в течение 16 ч при температуре 22°C и ФАР 25 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), после чего измеряли спектры отражения и показатели флуоресценции хлорофилла *a* ФС II.

**Определение содержания фотосинтетических пигментов** проводили спектрофотометрически на приборе UV-1700 (“Shimadzu”, Япония) в ацетоновой вытяжке при длинах волн 662, 644 нм (хлорофиллы *a* и *b*) и 478 нм (каротиноиды) в 4–5-кратной биологической повторности. Разделение индивидуальных каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (“Knauer”, Германия) как описано в работе [16] после экстрагирования элюентом (ацетонитрил : метанол : вода в соотношении 75 : 12 : 4). Для построения градуировочных зависимостей использовали стандарты каротиноидов (“Sigma” и “Fluka”, США). Уровень деэпоксидации пигментов виолаксантинового цикла (DEPS) рассчитывали согласно уравнению:

$$DEPS = (3\text{еа} + 0.5\text{Ант}) / (\text{Вио} + \text{Ант} + 3\text{еа}), \quad (1)$$

где 3еа – зеаксантин, Ант – антераксантин, Вио – виолаксантин.

**Определение содержания антоцианов (АЦ)** проводили спектрофотометрически. Использовали рН-дифференциальный метод, основанный на способности АЦ изменять свой цвет в зависимости от значения рН среды [20]. Содержание АЦ выражали в эквивалентах цианидин-3,5-дигликозида.

Определение качественного и количественного состава индивидуальных каротиноидов и содержания АЦ проводили в 4–6-кратной биологической повторности.

**Спектры отражения листьев.** Отражающую способность адаксиальной поверхности листьев измеряли с помощью портативного спектрометра “FieldSpec HH” (ASD Inc., США) у 5–7 листьев. В качестве источника света использовали лампу накаливания с эффективным непрерывным спектром излучения в диапазоне 400–1000 нм. Перед измерениями выполняли калибровку спектрометра по эталону белого цвета, отражательная способность которого в спектральном диапазоне от 400 до 1000 нм принималась за единицу, нулевой показатель при этом соответствовал 100%-ому поглощению света. Для фокусировки фоточувствительного элемента спектрометра на растительном объекте небольшой площади ис-

пользовали фокусирующую линзу. Чувствительный элемент спектрометра и лампу накаливания располагали под углом 60° к плоскости листа. Величины спектральных индексов рассчитывали по формулам, приведенным в работах [21–23]:

$$\text{Chl NDI} = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705}), \quad (2)$$

$$\text{CRI} = 1/R_{510} - 1/R_{550}, \quad (3)$$

$$\text{ARI} = 1/R_{550} - 1/R_{700}, \quad (4)$$

$$\text{PRI} = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570}), \quad (5)$$

где Chl NDI – нормализованный по хлорофиллу индекс отражения (Chlorophyll Normalized Difference Vegetation Index), CRI – индекс отражения каротиноидов (Carotenoid Reflectance Index), ARI – индекс отражения антоцианов (Anthocyanin Reflectance Index) и PRI – индекс фотохимического отражения (Photochemical Reflectance Index); *R* – отражательная способность, подстрочный индекс указывает на длину волны, при которой она была измерена.

**Флуоресценция хлорофилла *a* ФС II.** Оценку параметров ФС II проводили с помощью портативного флуориметра PAM-2100 (“Walz”, Германия). Фоновый (*F*<sub>0</sub>) и максимальный (*F*<sub>м</sub>) уровни флуоресценции измеряли у листьев, предварительно выдержанных 30 мин в темноте. Величины стационарного (*F*<sub>t</sub>), фонового (*F*<sub>0</sub>) и максимального (*F*<sub>м</sub>) уровней флуоресценции измеряли у листьев, адаптированных к действующему свету. Длительность экспозиции на свету составляла 15 мин, плотность потока ФАР – 130 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с). Расчет показателей, характеризующих функциональное состояние ФС II, и их интерпретацию осуществляли согласно [24]. Потенциальный (*F*<sub>v</sub>/*F*<sub>м</sub>) и реальный ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) квантовый выход ФС II, коэффициент нефотохимического тушения (NPQ) рассчитывали по формулам:

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m, \quad (6)$$

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_t) / F'_m, \quad (7)$$

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m. \quad (8)$$

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Statistica 10 (“StatSoft Inc.”, США). Значимость различий между средними величинами измеряемых показателей оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (критерий Дункана). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости *P* ≤ 0.05. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

**Таблица 1.** Сезонная динамика содержания и соотношения пигментов в розеточных листьях *Ajuga reptans*

Месяц	Содержание пигментов, мг/г сухой массы			Соотношение пигментов		
	Хл ( <i>a + b</i> )	Каротиноиды	Антоцианы	Хл <i>a/b</i>	Кар/Хл	АЦ/Хл
VI	6.80 ± 1.10 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.05 <sup>abc</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>c</sup>	3.38	0.16	0.01
VII	10.30 ± 0.20 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.10 <sup>f</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>ac</sup>	2.55	0.20	0.02
IX	10.17 ± 0.49 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.27 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.80	0.17	0.03
XI	9.70 ± 0.54 <sup>b</sup>	2.08 ± 0.12 <sup>f</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.66	0.21	0.04
XII	5.57 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.09 <sup>abc</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.25	0.17	0.06
IV*	5.08 ± 0.57 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.15 <sup>e</sup>	7.80	0.23	0.17
V*	4.18 ± 0.37 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.05 <sup>d</sup>	2.92	0.19	0.16
VI*	5.55 ± 0.58 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.07 <sup>bc</sup>	0.29 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.85	0.16	0.05

Примечание: Хл – хлорофиллы; Кар – каротиноиды; АЦ – антоцианы. Символом \* обозначены данные для перезимовавших листьев; представлены среднеарифметические величины и их стандартные ошибки ( $n = 5-6$ ). Разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра по месяцам (ANOVA, тест Дункана,  $P \leq 0.05$ ).

**Таблица 2.** Сезонная динамика содержания каротиноидов в розеточных листьях *Ajuga reptans* (ммоль/моль хлорофилла)

Месяц	Нео	Вио	Ант	Лют	Зеа	β-кар	сумма
VII	107.0 ± 18.2 <sup>d</sup>	143.1 ± 22.9 <sup>d</sup>	3.1 ± 1.18 <sup>d</sup>	224.0 ± 117.4 <sup>b</sup>	6.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	82.0 ± 18.5 <sup>c</sup>	565.4 ± 86.1 <sup>c</sup>
IX	37.0 ± 4.2 <sup>ab</sup>	48.1 ± 5.0 <sup>ac</sup>	2.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	111.9 ± 13.9 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	32.3 ± 4.2 <sup>b</sup>	234.8 ± 20.1 <sup>a</sup>
XI	26.1 ± 6.0 <sup>a</sup>	31.8 ± 3.9 <sup>a</sup>	7.4 ± 2.8 <sup>a</sup>	82.1 ± 20.1 <sup>a</sup>	5.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	61.2 ± 12.8 <sup>d</sup>	214.3 ± 40.9 <sup>a</sup>
XII	24.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	11.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	7.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	79.3 ± 9.8 <sup>a</sup>	18.9 ± 1.7 <sup>b</sup>	62.1 ± 8.0 <sup>d</sup>	203.4 ± 24.0 <sup>a</sup>
IV*	45.8 ± 3.8 <sup>b</sup>	60.1 ± 10.1 <sup>c</sup>	13.5 ± 1.2 <sup>bc</sup>	150.9 ± 11.3 <sup>ab</sup>	29.7 ± 4.7 <sup>b</sup>	106.0 ± 5.7 <sup>a</sup>	405.9 ± 25.3 <sup>b</sup>
V*	68.2 ± 13.4 <sup>c</sup>	127.3 ± 22.2 <sup>d</sup>	6.2 ± 2.2 <sup>cd</sup>	218.9 ± 38.5 <sup>b</sup>	12.2 ± 0.7 <sup>b</sup>	119.4 ± 7.4 <sup>a</sup>	552.2 ± 83.6 <sup>c</sup>

Примечание: Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Ант – антраксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; β-кар – β-каротин. Символом \* обозначены перезимовавшие листья. Представлены среднеарифметические величины и их стандартные ошибки ( $n = 6$ ). Разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра по месяцам (ANOVA, тест Дункана,  $P \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Фотосинтетические пигменты

Изучение состава и содержания фотосинтетических пигментов показало, что количество Хл (*a + b*) и каротиноидов (Кар) в молодых розеточных листьях новой генерации было заметно ниже, чем у зрелых (табл. 1). У зрелых листьев фонд зеленых и желтых пигментов сохранялся на довольно высоком уровне вплоть до начала зимы (ноябрь). Содержание Хл (*a + b*) в листьях зимой (декабрь) и весной после перезимовки было почти вдвое меньше, чем осенью. Листья вышедших из-под снега растений (конец апреля) характеризовались повышенным соотношением Хл *a/Хл b*. Динамика изменения содержания Кар в листьях была сходна с таковой для Хл. У зрелых листьев до перезимовки их количество было в 2–2.5 раза больше. Соотношение Кар/Хл варьировало в пределах от 0.16 до 0.23. Низкие значения данного показателя были отмечены у молодых и стареющих листьев, максимальные – у перезимовавших листьев после выхода растений из-под снега.

Концентрация Кар в расчете на моль Хл варьировала от 200 до 560 ммоль, более высокие значения были отмечены у хорошо сформировавшихся листьев (июль) и перезимовавших листьев (май) (табл. 2). В пуле каротиноидов доминировали ксантофиллы. У зрелых листьев в летний период на долю β-каротина (β-Кар) приходилось 13–15% суммы всех Кар. Перед перезимовкой и после выхода из-под снега вклад β-Кар увеличивался до 30%, а у стареющих листьев снижался до 20%. Ксантофиллы были представлены преимущественно лютеином, на долю которого приходилось в среднем 40%, доля неоксантина была в 2–3 раза меньше.

Содержание и уровень конверсии пигментов виолаксантинового цикла сильно изменялись (рис. 1). В сумме на долю виолаксантина (Вио), антраксантина (Ант) и зеаксантина (Зеа) приходилось 20–27% пула Кар. Концентрация пигментов ВКЦ в расчете на моль Хл варьировала от 45 до 150 ммоль, из них 60–95% приходилось на Вио. Наибольшим содержанием Вио отличались зрелые, функционально активные листья в июле, а

также перезимовавшие листья (апрель-май). Уровень дезоксидации Вио у зрелых листьев в летний период был низким и составлял 5–7%, к зиме величина DEPS возрастала на порядок. После перезимовки отмечали существенное снижение этого показателя. В мае у начинающих стареть перезимовавших листьев величина DEPS не превышала 10%.

#### Антоцианы

Антоцианы – соединения фенольной природы, являются внепластидными пигментами. В онтогенезе розеточных листьев *A. reptans* содержание АЦ изменялось в широких пределах, от 0.06 до 0.86 мг/г сухой массы (табл. 1), а в пересчете на Хл варьировало от 9 до 170 мкг/мг Хл. Молодые и зрелые листья розетки летом были зелеными, так как содержали много Хл и мало АЦ. К осени концентрация АЦ заметно возрастала, и листья становились красно-фиолетовыми. Максимум содержания АЦ в листьях отмечен после перезимовки растений, но накопление этого пигмента наблюдали уже к осени. На фоне потери части Хл и высокого содержания АЦ величина соотношения АЦ/Хл у перезимовавших листьев была в 3–5 раз выше, чем до перезимовки. В период завершения жизненного цикла и отмирания (вторая половина июня) количество АЦ в листьях существенно уменьшалось, и величина соотношения АЦ/Хл снижалась в 3 раза.

#### Спектры отражения листьев и спектральные индексы

Оптические свойства листьев *A. reptans* претерпевали существенные изменения (рис. 2). Молодые листья новой генерации (июнь), характеризующиеся сравнительно низким содержанием фотосинтетических пигментов и антоцианов, имели довольно высокую отражательную способность в синей части диапазона видимого излучения (область поглощения Хл и Кар) и в красной области спектра (область поглощения Хл). Характерной чертой спектра отражения этих листьев является выраженный пик в зеленой области с максимумом около 550 нм (рис. 2). В конце лета (август) и осенью (октябрь) наблюдали уменьшение отражения в синей и красной областях спектра, обусловленное высоким содержанием фотосинтетических пигментов. В конце апреля, сразу после схода снежного покрова, у перезимовавших листьев отмечено резкое снижение отражательной способности в зеленой части спектра, что может быть связано с накоплением АЦ. В мае у перезимовавших листьев на фоне роста отражения в области преимущественного поглощения света Хл и Кар сохранялись сравнительно низкие показатели коэффициента отражения в зеленой части спектра.

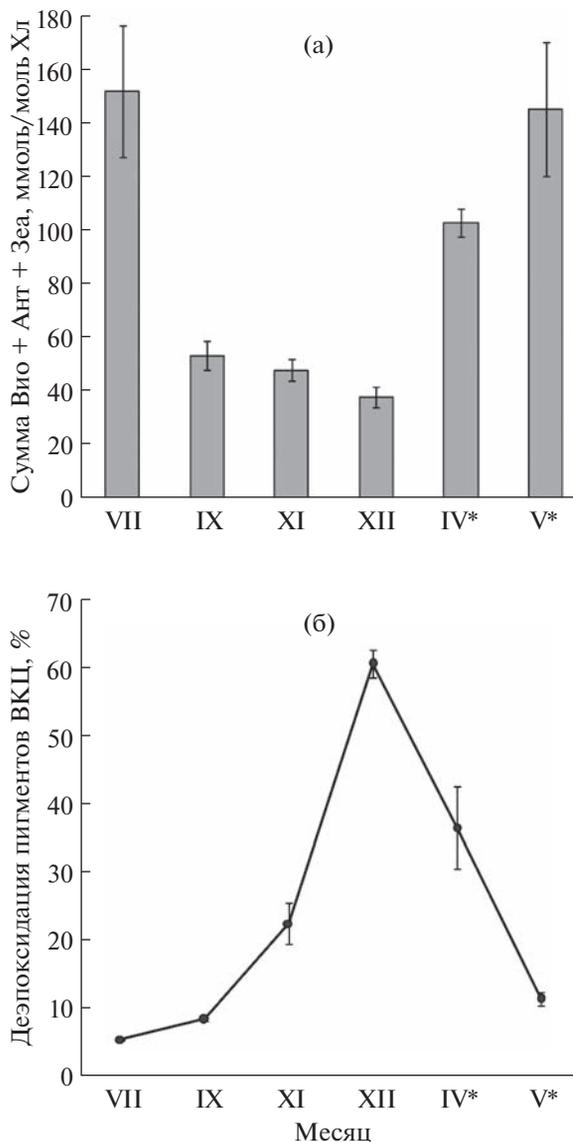
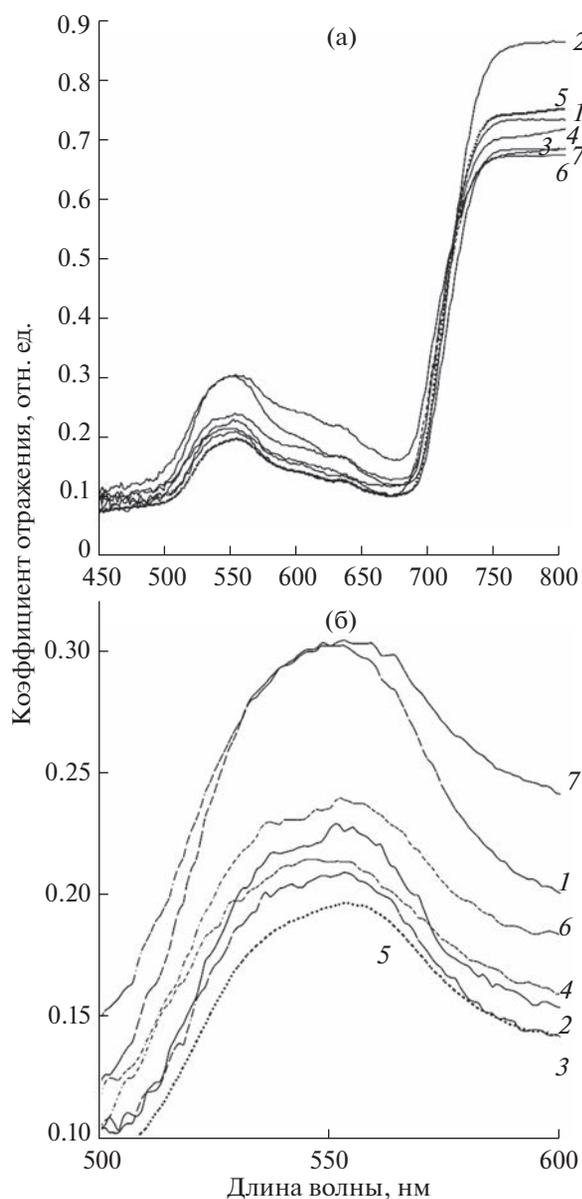


Рис. 1. Сезонная динамика содержания пигментов виолаксантинового цикла (виолаксантин + антраксантин + зеаксантин) (а) и степени их дезоксидации (б) в розеточных листьях *Ajuga reptans*. Символом \* отмечены перезимовавшие листья.

Резкий рост отражательной способности в широком диапазоне длин волн видимой области спектра отмечен в июне у стареющих и отмирающих листьев.

Величина нормализованного индекса отражения Хл (Chl NDI) варьировала в диапазоне от 0.25 до 0.45 отн. ед. (рис. 3а). Наибольшие значения Chl NDI были зарегистрированы для молодых листьев в конце лета, минимальные – у перезимовавших листьев в июне. Следует отметить, что величина Chl NDI у перезимовавших листьев сразу после выхода из-под снега (апрель) была сходна с таковой до перезимовки (октябрь). Величина ин-



**Рис. 2.** Спектры отражения розеточных листьев *Ajuga reptans* (а) и фрагмент спектров в диапазоне от 500 до 600 нм (б). Цифрами обозначены сроки отбора листьев: 1 – июнь, 2 – август, 3 – октябрь, 4 – декабрь, 5 – апрель (перезимовавшие листья), 6 – май (перезимовавшие листья), 7 – июнь (перезимовавшие листья).

декса отражения Кар (CRI) изменялась в пределах 2.9–4.3 отн. ед (рис. 3б), и динамика его изменений в годичном цикле мало отличалась от таковой для Chl NDI.

Индекс отражения антоцианов (ARI) изменялся более значительно, чем это наблюдалось для индексов фотосинтетических пигментов, и его динамика описывалась зависимостью с выраженным максимумом (рис. 3в). Наибольшие величины ARI (до 1.5 отн. ед.) были отмечены в

зимний период и после схода снега (декабрь–апрель). На рис. 3в видно, что минимальные величины ARI были характерны для молодых формирующихся листьев.

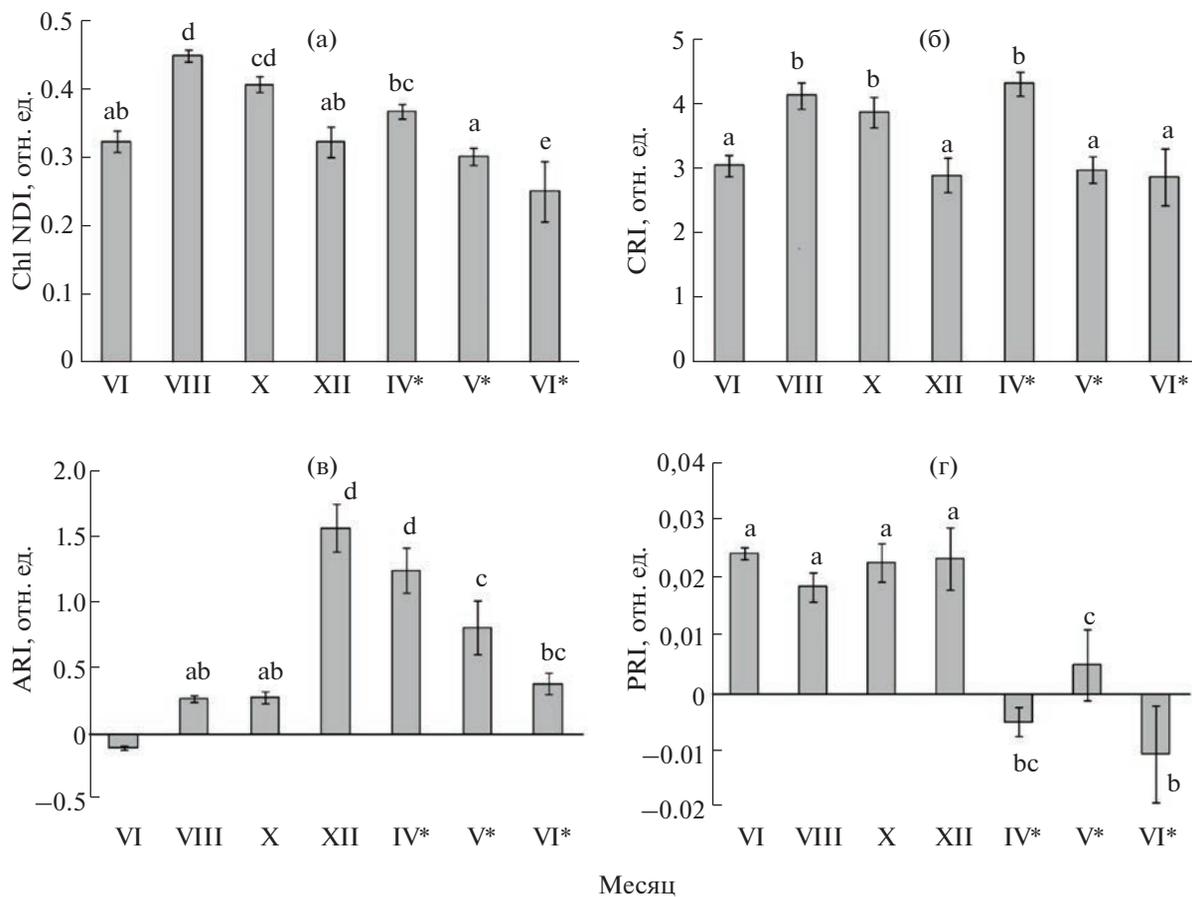
Индекс фотохимического отражения PRI (Photochemical Reflectance Index), характеризующий эффективность использования света при фотосинтезе, был выше до перезимовки, чем после нее. Судя по величине данного показателя, фотохимическая активность перезимовавших листьев была существенно подавлена (рис. 3г).

#### Показатели флуоресценции хлорофилла а ФС II

Величины исследованных показателей ФС II розеточных листьев *A. reptans* значительно изменялись в годичном цикле. Фоновый уровень флуоресценции Хл а ( $F_0$ ) заметно повышался уже осенью и оставался более высоким у перезимовавших листьев. График изменений показателя максимальной флуоресценции ( $F_m$ ) имел два максимума, характеризующие повышение  $F_m$  у сформировавшихся листьев до перезимовки и в начале активной вегетации после перезимовки. В зимний период у извлеченных из-под снега и акклиматизированных в лабораторных условиях листьев величина  $F_m$  была почти вдвое ниже. Показатель максимального квантового выхода ФС II ( $F_v/F_m$ ) варьировал в пределах от 0.55 до 0.82 отн. ед. (рис. 4а). Его изменения в сезоне были идентичны таковым для  $F_m$ . Наибольшие значения данного показателя были зарегистрированы у зрелых листьев в летний период (0.82 отн. ед.) и перезимовавших листьев в мае (0.77 отн. ед.). Зимой отмечали снижение  $F_v/F_m$  на 30%. Величина  $F_v/F_m$  оставалась довольно низкой после выхода растений из-под снега (апрель).

Динамика изменения показателя  $\Phi_{PSII}$ , характеризующего соотношение доли квантов, используемых в фотохимических превращениях к общему числу поглощенных квантов, в целом была сходна с таковой для показателя  $F_v/F_m$  (рис. 4). Сравнительно высокие значения  $\Phi_{PSII}$ , 0.6–0.7 отн. ед., были характерны для листьев до перезимовки. Зимой реальный квантовый выход ФС II акклиматизированных в лабораторных условиях листьев был на 30% ниже и оставался на этом же уровне после выхода растений из-под снега. С началом активной вегетации растений наблюдалось восстановление уровня фотохимической активности ФС II перезимовавших листьев, но по мере их старения и отмирания величина  $\Phi_{PSII}$  вновь снижалась.

Наиболее значительные изменения в онтогенезе розеточных листьев претерпевал показатель, характеризующий интенсивность тепловой диссипации энергии возбуждения в ФС II. Величина NPQ, очень низкая (0.22 отн. ед.) у формирую-



**Рис. 3.** Спектральные индексы розеточных листьев *Ajuga reptans*. (а) – Chl NDI – Chlorophyll Normalized Difference Vegetation Index; (б) CRI – Carotenoid Reflectance Index; (в) ARI – Anthocyanin Reflectance Index; (г) PRI – Photochemical Reflectance Index. Символом \* отмечены перезимовавшие листья.

щихся листьев новой генерации, возростала у зрелых листьев в 2–3 раза и перед перезимовкой достигала 0.62 отн. ед. Во время перезимовки и сразу после нее значения NPQ варьировали около 0.45 отн. ед., то есть были ниже, чем до перезимовки. Затем, по мере старения перезимовавших листьев, величина NPQ сильно возростала и достигала 0.90 отн. ед.

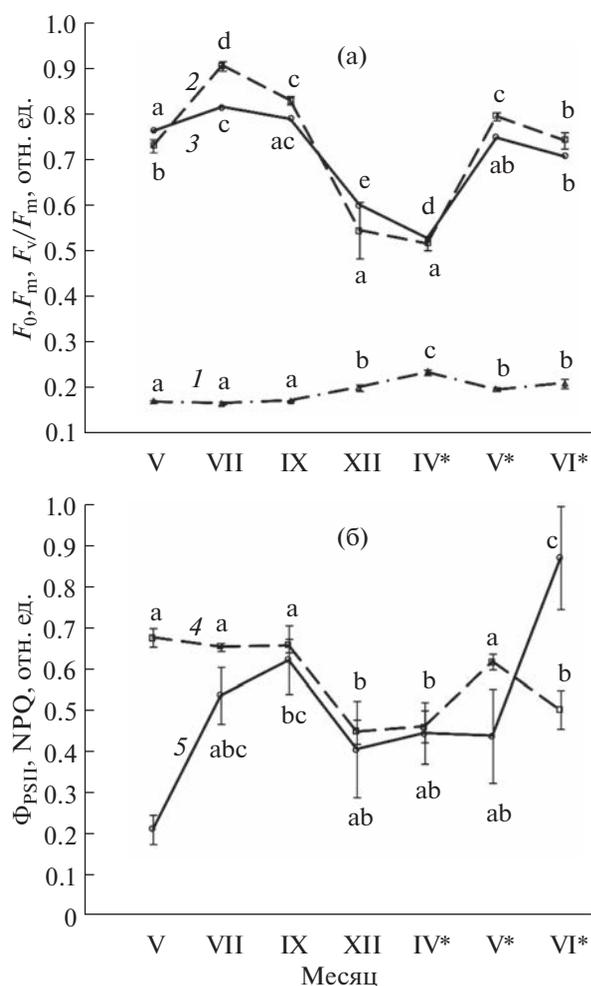
## ОБСУЖДЕНИЕ

У длительно вегетирующего летне-зимне-зеленого растения *A. reptans* укороченные побеги перезимовывают с зелеными розеточными листьями, которые отмирают в июне и заменяются новой генерацией листьев. Эта генерация активно функционирующая в июле-сентябре листьев зимует под толстым снежным покровом. Перезимовавшие листья поставляют продукты текущего фотосинтеза формирующимся им на смену листьям следующей генерации. Кроме того, они служат источником органических веществ и ми-

неральных элементов, реутилизуемых при старении и отмирании [25].

На возрастную трансформацию ФСА розеточных листьев с неизбежностью накладываются изменения, вызванные сезонной динамикой факторов среды. Свет в сочетании с пониженными температурами оказывает стрессовое воздействие и может вызвать значительные повреждения ФСА, сохранение которого жизненно важно для реализации экологической стратегии летне-зимнезеленых растений.

Фотосинтетический аппарат розеточных листьев *A. reptans* новой генерации формируется в начале лета (май-июнь) при сравнительно благоприятном температурном и световом режиме. Молодые, интенсивно растущие листья содержали меньше Хл и Кар (табл. 1), чем зрелые, что обуславливало более высокое отражение их поверхностью излучения в синем и красном диапазоне видимого излучения (рис. 2). Функционирование ФСА листьев *A. reptans* в период развития полога смешанного древостоя с участием листопадных видов, снижающего поступление света к травя-



**Рис. 4.** Сезонные изменения показателей флуоресценции Хл *a* ФС II розеточных листьев *Ajuga reptans*. (а) 1 – фоновый ( $F_0$ ), 2 – максимальный ( $F_m$ ) уровни флуоресценции хлорофилла и 3 – потенциальный квантовый выход ФС II ( $F_v/F_m$ ); (б) 4 – реальный квантовый выход ФС II ( $\Phi_{PSII}$ ) и 5 – коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла ФС II (NPQ). Символом \* отмечены перезимовавшие листья.

нистым растениям, способствует накоплению пигментов и увеличению светособирающих комплексов (ССК) фотосистем, о чем косвенно свидетельствуют данные о снижении соотношения Хл *a*/Хл *b* (табл. 1) Накопление фотосинтетических пигментов приводит к усилению поглощения листьями светового потока, что отражается на величине индексов Chl NDI и CRI (рис. 3а, б). Сравнительно высокие содержание Хл, и значения Chl NDI и CRI отмечались и осенью при снижении температуры среды. Зимой под снежным покровом температура верхнего слоя почвы, как правило, варьирует в пределах от 0 до  $-3^{\circ}\text{C}$  [26]. В этот период содержание пигментов и величины спектральных индексов Chl NDI и CRI листьев *A. reptans*

заметно снижались, что было связано с катаболизмом части фонда фотосинтетических пигментов. Сходные изменения пигментного комплекса были ранее отмечены для листьев вечнозеленых древесных растений [15, 27, 28]. Деградация части пигментного фонда в листьях *A. reptans* является следствием распада крупных ПБК фотосистем (мегакомплекса ФС I–ФС II и суперкомплекса ФС II–ССК II) и увеличения пула свободных хлорофиллов, легче поддающихся окислению [16]. На деградацию ССК указывает также значительное увеличение соотношения Хл *a*/Хл *b*, связанное с большей утерей перезимовавшими листьями Хл *b*, чем Хл *a* (табл. 1), и увеличение параметра фоновой флуоресценции Хл ФС II ( $F_0$ ), являющегося индикатором энергетических потерь при передаче энергии возбуждения от антенны к РЦ ФС II. Следует отметить, что практически весь Хл *b* находится в ССК ФС II, тогда как ССК ФС I и РЦ обеих фотосистем содержит Хл *a* [29]. Уменьшение пигментного фонда можно рассматривать как защитную реакцию растений, направленную на снижение поглощения энергии и, следовательно, предотвращение перевосстановления ЭТЦ хлоропластов в период, когда ассимиляция  $\text{CO}_2$  подавлена низкой температурой.

В апреле у вышедших из-под снега растений *A. reptans* содержание хлорофиллов оставалось низким (табл. 1), но величина индекса Chl NDI не изменялась (рис. 3а). По-видимому, причиной таких, не связанных с содержанием пигментов, изменений оптических свойств могут быть изменения анатомо-морфологических характеристик листьев при воздействии низких температур, наличие очагов повреждения, изменение содержания и состояния воды в тканях, а также накопление антоцианов.

В литературе имеются сведения о влиянии антоцианов на взаимосвязь спектральных индексов отражения с содержанием фотосинтетических пигментов. Так, например, снижение содержания хлорофиллов и накопление антоцианов осенью в листьях *Acer saccharum* накладывали определенные ограничения на интерпретацию динамики изменения нормализованного дифференциального вегетационного индекса (NDVI) и PRI [30]. В антоциановых листьях на фоне распада Хл поглощение при 550 нм и в области 500–600 нм может достигать 95%, причем существенный вклад в поглощение был отмечен также в диапазоне 600–650 нм [31]. АЦ способны конкурировать с Хл *a* за поглощение света в зеленом диапазоне, а с Хл *b* и Кар – за поглощение света в области более коротких длин волн. Поэтому накопление АЦ и снижение содержания фотосинтетических пигментов может увеличивать относительный вклад АЦ в поглощение ФАР.

Биосинтез АЦ находится под генетическим контролем, зависит от биологических особенно-

стей и стадии развития растений, экологических параметров местообитания. Многие авторы рассматривают накопление АЦ как защитный механизм при воздействии на растения неблагоприятных факторов, в том числе, высокой инсоляции [32] и пониженной температуры [33]. Считается, что антоцианы могут экранировать ФСА от воздействия избыточного светового потока и выполнять функцию низкомолекулярных антиоксидантов, снижающих уровень накопления АФК при фотоокислительном стрессе (ФОС) [11, 34, 35]. У некоторых видов растений синтез АЦ усиливается в стареющих листьях [30, 36]. Показано, что накопление АЦ в палисадных клетках мезофилла стареющих листьев листопадного кустарника *Cornus stolonifera* предотвращало развитие ФОС путем экранирования несвязанного хлорофилла и его производных, проявляющих фототоксичность за счет генерации синглетного кислорода [37].

Нами выявлено повышение содержания антоцианов в онтогенезе розеточных листьев *A. reptans* (табл. 1, рис. 3в). Максимум их содержания был отмечен у перезимовавших листьев на фоне уменьшения количества фотосинтетических пигментов, дезорганизации части ПБК и накопления несвязанного хлорофилла [16]. Величина соотношения АЦ/Хл у перезимовавших листьев в апреле была в 3–5 раз выше, чем до перезимовки. Параллельно с увеличением соотношения АЦ/Хл наблюдали существенное повышение относительного содержания пигментов ВКЦ (рис. 1а). При этом уровень их дезоксидации был близок к значению, наблюдаемому для данного параметра в предшествующий перезимовке период (рис. 1б). Функция ВКЦ состоит в предотвращении развития ФОС путем тепловой диссипации избыточно поглощенной световой энергии [38]. Видимо, при низкой температуре воздуха и высокой освещенности ВКЦ и АЦ аддитивно обеспечивают защиту ФСА перезимовавших листьев *A. reptans* от фотодинамического повреждения, а индекс ARI можно рассматривать как один из индикаторов физиологического стресса.

Считается, что индекс фотохимического отражения PRI является информативным показателем фотохимической активности ФСА, характеризует эффективность использования света в процессе фотосинтеза и зависит от содержания и соотношения пигментов ВКЦ [39]. Исходя из полученных данных (рис. 3г), можно предположить, что молодые розеточные листья *A. reptans* в летний период имеют наибольший уровень фотохимической активности, а у перезимовавших листьев эффективность использования света значительно снижается. Судя по динамике сезонных изменений PRI, это снижение имеет немонотонный характер с тенденцией к появлению локального максимума для перезимовавших листьев в мае. В целом изменения PRI соответствовали таковым

для  $\Phi_{PSII}$  (рис. 4б). Вместе с тем, вопреки ожиданиям, сезонные изменения PRI не имели четкой взаимосвязи с интенсивностью нефотохимического тушения флуоресценции ФС II (NPQ). Вероятно, что для разработки модели, связывающей величину NPQ и изменения оптических характеристик листьев летне-зимне-зеленых растений, будет возможно применение параметра  $\Delta PRI$  (величины изменения PRI у адаптированного к актиничному свету образца относительно начального (темнового) уровня этого показателя) [40].

Снижение  $\Phi_{PSII}$  в зимний и ранневесенний периоды не сопровождалось повышением NPQ (при этом величина DEPS увеличивалась), а значительное увеличение NPQ (рис. 4б) на фоне снижения DEPS (рис. 1б) после перезимовки не сопровождалось столь же существенным подавлением  $\Phi_{PSII}$  у стареющих листьев. Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимосвязь PRI, DEPS, NPQ и  $\Phi_{PSII}$  на протяжении всего онтогенеза листьев летне-зимне-зеленого растения *A. reptans* не столь очевидна и однозначна. Вероятно, частичная деструкция компонентов ФСА в период перезимовки и низкая скорость репарации ПБК фотосистем после нее нарушают эффективное функционирование и взаимодействие систем запасаения и диссипации поглощенной энергии. Это согласуется с мнением других авторов, что тесная связь между  $\Phi_{PSII}$ , PRI и эффективностью использования света при фотосинтезе может существовать в оптимальных условиях у нестрессированных растений и, как правило, в определенном интервале интенсивности освещения [40]. В пользу этого мнения может свидетельствовать также тот факт, что после перезимовки листья *A. reptans* даже в оптимальных светотемпературных условиях ассимилировали  $CO_2$  с интенсивностью вдвое ниже потенциально возможной для данного теневыносливого вида [17].

Таким образом, результаты изучения пигментного комплекса, спектров отражения и показателей флуоресценции ФС II в онтогенезе розеточных листьев *Ajuga reptans* свидетельствуют о значительной структурно-функциональной трансформации ФСА под воздействием сезонных изменений условий среды. Показано, что перезимовка приводила к необратимой потере фотосинтетических пигментов, накоплению антоцианов, изменению спектральных свойств листьев. В целом, изменения спектральных свойств листьев соответствовали динамике содержания хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов. Индекс отражения антоцианов (ARI) может быть использован в качестве показателя стрессированности растений. В совокупности полученные данные позволяют полагать, что антоцианы могут служить дополнительным механизмом в оптимизации баланса между поступлением световой энергии и потребностями фотосинтеза.

Активация защитных механизмов и генетически закрепленная способность к частичному восстановлению ФСА после перезимовки позволяет летне-зимне-зеленым растениям адаптироваться к неблагоприятным воздействиям и эффективно использовать ресурсы среды для реализации их жизненной стратегии.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ “Фотосинтез, дыхание и биоэнергетика растений и фототрофных организмов (физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и экологические аспекты)” (рег. № 122040600021-4).

Авторы выражают благодарность инженеру М.Ю. Сивкову (отдел флоры и растительности Севера) за помощь в измерении спектров отражения листьев *A. reptans*.

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. Öquist G., Huner N.P.A. Photosynthesis of overwintering evergreen plants // *Annu. Rev. Plant Biology*. 2003. V. 54. P. 329.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.072402.115741>
2. Solanki T., Aphalo P.J., Neimane S., Hartikainen S.M., Pieriste M., Shapiguzov A., Porsar-Castell A., Atherton J., Heikilla A., Robson T.M. UV-screening and spring-time recovery of photosynthetic capacity in leaves of *Vaccinium vitis-idaea* above and below the snow pack // *Plant Physiol. Biochem*. 2019. V. 134. P. 40.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.003>
3. Verhoeven A.S., Adams lii W.W., Demmig-Adams B. The xanthophyll cycle and acclimation of *Pinus ponderosa* and *Malva neglecta* to winter stress // *Oecologia*. 1999. V. 118. P. 277.  
<https://doi.org/10.1007/s004420050728>
4. Verhoeven A.S., Adams lii W.W., Demmig-Adams B. Two forms of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation in overwintering *Euonymus kiautschovicus* // *Plant, Cell Environ*. 1998. V. 21. P. 893.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00338.x>
5. Logan B.A., Grace S.C., Adams lii W.W., Demmig-Adams B. Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments // *Oecologia*. 1998. V. 116. P. 9.  
<https://doi.org/10.1007/PL00013823>
6. Adams lii W.W., Demmig-Adams B., Rosenstiel T.N., Brightwell A.K., Ebbert V. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants // *Plant Biology*. 2002. V. 4. P. 545.
7. Adams W.W., Zarter C.R., Ebbert V., Demmig-Adams B. Photoprotective strategies of overwintering evergreens // *Bioscience*. 2004. V. 54. P. 41.
8. Yatsco Y.N., Dymova O.V., Golovko T.K. Violaxanthin cycle pigment de-epoxidation and thermal dissipation of light energy in three boreal species of evergreen conifer plants // *Russ. J. Plant Physiol*. 2011. V. 58. P. 169.
9. Sofronova V.E., Chepalov V.A., Dymova O.V., Golovko T.K. The role of pigment system of an evergreen dwarf shrub *Ephedra monosperma* in adaptation to the climate of Central Yakutia // *Russ. J. Plant Physiol*. 2014. V. 61. P. 246.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443714010142>
10. Sofronova V.E., Dymova O.V., Golovko T.K., Chepalov V.A., Petrov K.A. Adaptive changes in pigment complex of *Pinus sylvestris* needles upon cold acclimation // *Russ. J. Plant Physiol*. 2016. V. 63. P. 433.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443716040142>
11. Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection // *New Phytologist*. 2002. V. 155. P. 349.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x>
12. Hughes N.M., Smith W.K. Seasonal photosynthesis and antocyanin production in ten broadleaf evergreen species // *Funct. Plant Biol*. 2007. V. 34. P. 1072.  
<https://doi.org/10.1071/FP07205>
13. Merzlyak M., Gitelson A., Chivkunova O., Solovchenko A., Pogosyan S. Application of reflectance spectroscopy for analysis of higher plant pigments // *Russ. J. Plant Physiol*. 2003. V. 50. P. 704.  
<https://doi.org/10.1021-4437/03/5005>
14. Gitelson A.A., Keydan G.P., Merzlyak M.N. Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophysical research letters*. 2006. V. 33. P. L11402.  
<https://doi.org/10.1029/2006GL026457>
15. Головки Т.К., Яцко Я.Н., Дымова О.В. Сезонные изменения состояния фотосинтетического аппарата трех бореальных видов хвойных растений в подзоне средней тайги на европейском северо-востоке // *Хвойные бореальной зоны*. 2013. Т. 30. С. 73.
16. Dymova O., Khrystin M., Miszalski Z., Kornas A., Strzalka K., Golovko T. Seasonal variations of leaf chlorophyll-protein complexes in the wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L. // *Funct. Plant Biol*. 2018. V. 45. P. 519.  
<https://doi.org/10.1071/FP17199>
17. Дымова О.В., Тетерюк Л.В. Физиологическая и популяционная экология неморальных травянистых растений на Севере. Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук, 2000. 144 с.
18. Атлас Республики Коми по климату и гидрологии / Отв. ред. Таскаев А.И. Москва: Издательский дом “Дрофа”, Изд-во “ДиК”, 1997. 115 с.
19. Dymova O.V., Golovko T.K. Light adaptation of photosynthetic apparatus in *Ajuga reptans* L., a shade-tolerant plant as an example // *Russ. J. Plant Physiol*. 1998. V. 45. P. 440.
20. Lee J., Durst R.W., Wrolsrad R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study // *Journal of AOAC International*. 2005. V. 88. P. 1269.

21. Gitelson A., Merzlyak M.N. Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves. Spectral features and relation to chlorophyll estimation // *J. Plant Physiol.* 1994. T. 143. P. 286.
22. Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels // *Oecologia.* 1997. V. 112. P. 492. <https://www.jstor.org/stable/i391072>
23. Gitelson A.A., Zur Y., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N. Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy // *Photochemistry and photobiology.* 2002. V. 75. P. 272. <https://doi.org/10.1562/0031-8655>
24. Goltsev V.N., Kalaji H.M., Paunov M., Baba W., Horalzek T., Mojski J., Kociel H., Allakverdiev S.I. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 869. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050058>
25. Дымова О.В., Головки Т.К. Морфофизиологические аспекты вегетативного размножения *Ajuga reptans* L. // *Репродуктивная биология растений на европейском Северо-Востоке. Сыктывкар, 1998. С. 72.*
26. Далькэ И.В., Чадин И.Ф., Малышев Р.В., Захожий И.Г., Тишин Д.В., Харевский А.А., Солюд Е.Г., Шайкина М.Н., Попова М.Ю., Полюдченко И.П., Тагунова И.И., Лязев П.А., Беляева А.В. Морозоустойчивость борщевика Сосновского по результатам лабораторных и полевых экспериментов // *Российский журнал биологических инвазий.* 2019. № 4. С. 12. [http://proboreshevnik.ru/wp-content/uploads/2019/11/Dalke-idr.-RZHBI\\_4\\_2019.pdf](http://proboreshevnik.ru/wp-content/uploads/2019/11/Dalke-idr.-RZHBI_4_2019.pdf)
27. Ottander C., Campbell D., Qquist G. Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris* // *Planta.* 1995. V. 197. P. 176.
28. Martz F., Sutinen M.-L., Derome K., Wingsle G., Julkunen-Tiitto R., Turunen M. Effects of ultraviolet (UV) exclusion on the seasonal concentration of photosynthetic and UV-screening pigments in Scots Pine needles // *Global Change Biology.* 2007. V. 13. P. 252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01275.x>
29. Rochaix J.D. Regulation and dynamics of the light-harvesting system // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. P. 287. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040226>
30. Junker L.V., Ensminger I. Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing *Acer saccharum* leaves // *Tree Physiology.* 2016. V. 36. P. 694. <http://doi.org/10.1093/treephys/tpv148>
31. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Solovchenko A.E., Naqvi K.R. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves // *J. Exp. Botany.* 2008. V. 59. P. 3903. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern230>
32. Hughes N.M., Burkey K.O., Cavender-Bares J., Smith W.K. Xanthophyll cycle pigment and antioxidant profiles of winter-red (anthocyanic) and winter-green (acyanic) angiosperm evergreen species // *J. Exp. Bot.* 2012 V. 63. P. 1895. <https://doi.org/10.1093/jxb/err362>
33. Pietrini F., Iannelli M.A., Massacci A. Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis // *Plant, Cell Environ.* 2002. V. 25. P. 1251. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00917.x>
34. Manetas Y., Drinia A., Petropoulou Y. High contents of anthocyanins in young leaves are correlated with low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition // *Photosynthetica.* 2002. V. 40. P. 349.
35. Neill S.O., Gould K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? // *Funct. Plant Biol.* 2003. V. 30. P. 865. <https://doi.org/10.1071/FP03118>
36. Hoch W.A., Zeldin E.L., McCown B.H. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence // *Tree physiology.* 2001. V. 21. P. 1. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.1.1>
37. Feild T.S., Lee D.W., Holbrook N.M. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. P. 566.
38. Latowski D., Dymova O., Maslova T., Strzałka K. The xanthophyll cycle and its physiological functions // *Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology.* Syktvykar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. P. 183.
39. Gamon J.A., Serrano L., Surfus R. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels // *Oecologia.* 1997. V. 112. P. 492. <https://doi.org/10.1007/s004420050337>
40. Kováč D., Veselovská P., Klem K., Večeřová K., Ač A., Pañuelas J., Urban O. Potential of photochemical reflectance index for indicating photochemistry and light use efficiency in leaves of european beech and Norway Spruce trees // *Remote Sensing.* 2018. V. 10. P. 1202. <https://doi.org/10.3390/rs10081202>

## ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ CO<sub>2</sub> И ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАСТЕНИЯ С РАЗНЫМ ТИПОМ ФОТОСИНТЕЗА: КИНОА (C<sub>3</sub>) И АМАРАНТ (C<sub>4</sub>)

© 2023 г. З. Ф. Рахманкулова<sup>а</sup>\*, Е. В. Шуйская<sup>а</sup>, М. Ю. Прокофьева<sup>а</sup>,  
Л. Т. Саидова<sup>а</sup>, П. Ю. Воронин<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: zulfirar@mail.ru

Поступила в редакцию 02.05.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

Исследовали термоустойчивость растений с разным типом фотосинтеза *Chenopodium quinoa* Willd. (C<sub>3</sub>) и *Amaranthus retroflexus* L. (C<sub>4</sub>-НАД) к кратковременной повышенной температуре (35°C, eT) при естественной (400 ppm, aCO<sub>2</sub>) и повышенной (800 ppm, eCO<sub>2</sub>) концентрации CO<sub>2</sub>. Анализировали ростовые параметры, содержание воды, пролина, МДА, параметры CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O газообмена, функционирование ФС I и ФС II, содержание ключевых фотосинтетических (РБФК/О, ФЕПк) и фотодыхательных (ГДК) ферментов. В контрольных условиях у растений C<sub>4</sub>-вида, по сравнению с C<sub>3</sub>-видом, показаны более высокие значения прироста сухой биомассы, интенсивности видимого фотосинтеза, транспирации, активности ФС I и более низкое содержание пролина. Фотосинтетический и устьичный аппарат обоих видов был чувствителен к eT, что проявлялось в снижении интенсивности видимого фотосинтеза и транспирации. Кроме того, у C<sub>3</sub>-вида наблюдалось подавление световых реакций (ФС II) и интенсивности фотодыхания (по ГДК), а у C<sub>4</sub>-вида – увеличение содержания пролина. В условиях eCO<sub>2</sub> у C<sub>3</sub>-вида наблюдалось снижение интенсивности фотодыхания, а у C<sub>4</sub>-вида окислительный стресс (2-кратное увеличение содержания МДА) сопровождался снижением интенсивности видимого фотосинтеза, транспирации и возрастом интенсивности темнового митохондриального дыхания. Смягчающий эффект eCO<sub>2</sub> на термоустойчивость данных C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-растений не установлен. При совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT у обоих видов имели место окислительный стресс, снижение эффективности ФС II и видимого фотосинтеза, а также активация темнового дыхания. Однако наблюдались и отличия: у C<sub>3</sub>-вида окислительный стресс сопровождался снижением прироста сухой биомассы и содержания воды в тканях, а также подавлением фотодыхания, а у C<sub>4</sub>-вида – снижением интенсивности транспирации и возрастом содержания ФЕПк. Снижение WUE при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT у растений C<sub>4</sub>-вида было менее значительным, чем у C<sub>3</sub>-вида. Обсуждается разная реакция растений киноа (C<sub>3</sub>) и амаранта (C<sub>4</sub>) на совместное действие климатических факторов: повышенной температуры и концентрации CO<sub>2</sub>.

**Ключевые слова:** *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium quinoa*, амарант, киноа, окислительный и тепловой стресс, РБФК/О, ФЕПк, ГДК, фотосистемы I и II, WUE (water use efficiency)

DOI: 10.31857/S0015330323600353, EDN: ICAOVY

### ВВЕДЕНИЕ

В ближайшие годы прогнозируется возрастание частоты экстремальных явлений и климатических колебаний, что окажет серьезное влияние на стабильность и безопасность производства продуктов питания [1]. Увеличение атмосферной концентрации CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>, elevated CO<sub>2</sub>) и потепление (eT, elevated temperature) являются значимыми проявлениями изменения климата и факторами, определяющими продуктивность ценных пищевых и кормовых культур [2, 3].

Наблюдаемый стремительный рост атмосферной концентрации CO<sub>2</sub> по-разному влияет на интенсивность фотосинтеза, биопродуктивность и устойчивость C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-растений [4, 5]. Долгое время считалось, что C<sub>3</sub>-фотосинтез более чувствителен к изменениям концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере и что ее увеличение оказывает положительное влияние на интенсивность фотосинтеза и продуктивность C<sub>3</sub>-видов посредством активации карбоксилирования в цикле Кальвина и повышения эффективности использования воды благодаря снижению устьичной проводимости в

растениях [6]. Однако позже было показано, что увеличение биомассы C<sub>3</sub>-растений может быть лишь кратковременным эффектом, который теряется в течение более длительного периода времени [4, 7] и может сопровождаться снижением пищевой ценности кормовых культур из-за подавления фотодыхания высоким уровнем CO<sub>2</sub> за счет снижения оксигеназной функции рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О), что может отрицательно сказываться на азотном обмене растений [8, 9]. C<sub>4</sub>-растения, благодаря наличию углерод-концентрирующего механизма (УКМ), ранее рассматривались как менее зависимые от концентрации CO<sub>2</sub> в окружающей среде, чем C<sub>3</sub>-виды, и предполагалось, что они будут меньше реагировать на eCO<sub>2</sub> [6, 7]. Эта концепция глубоко укоренилась в климатических и экологических моделях воздействия меняющегося климата на растения [7]. Однако за последние годы появилось много противоречивой информации по этому вопросу [2, 3]. Было показано, что у C<sub>4</sub>-видов eCO<sub>2</sub> более эффективно стимулирует фотосинтетический метаболизм [10] и накопление биомассы, связанное с повышением эффективности использования воды (WUE) [11]. В то же время есть информация, что высокие и сверхвысокие концентрации CO<sub>2</sub> приводят к снижению интенсивности фотосинтеза как у C<sub>3</sub>-, так и у C<sub>4</sub>-видов [9, 12]. Таким образом, вопрос о влиянии eCO<sub>2</sub> на растения с разным типом фотосинтеза в настоящее время остается открытым.

Известно, что условия, которые сопровождаются повышением концентрации CO<sub>2</sub> в атмосфере, в частности повышенные температуры, могут стать лимитирующими факторами для роста растений [13]. Исследования совместного комплексного воздействия нескольких климатических факторов представляют особый интерес, поскольку они вызывают более сложные ответные реакции растений, по сравнению с действием одиночных стрессов [14]. Было установлено, что способность к температурной акклимации фотосинтеза у C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-видов различается [15]. На C<sub>3</sub>-виде киноа показано, что реакция растений на высокие температуры разнообразна и зависит от генотипа и фенологической стадии [16]. На C<sub>3</sub>-видах, пшенице и рисе, высокие температуры снижали урожай зерна, причем eCO<sub>2</sub> не компенсировал это негативное воздействие, что в результате приводило к снижению урожая до 35% [17]. У C<sub>3</sub>-видов основными причинами снижения фотосинтеза при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT являются тепловая лабильность РБФК/О-активазы и снижение фотосинтетического электронного транспорта [18]. В то же время установлено, что eCO<sub>2</sub> может положительно влиять на термоустойчивость некоторых C<sub>3</sub>-видов, и у них наблюдается активация

чувствительных к повышенной температуре фотосинтетических параметров (видимый фотосинтез, устьичная проводимость и эффективность ФС II) [19]. Предполагается, что смягчающий эффект eCO<sub>2</sub> при комплексном воздействии климатических факторов у C<sub>3</sub>-растений связан с активацией антиоксидантной защитной системы, снижением фотодыхания [20], уменьшением отрицательного влияния стрессовых факторов на метаболизм сахаров и аминокислот [21], а также с положительным влиянием eCO<sub>2</sub> на интенсивность карбоксилирования и водный баланс растений [2, 22]. Таким образом, в настоящее время однозначно сказать о влиянии eCO<sub>2</sub> на термоустойчивость ростовых и фотосинтетических параметров C<sub>3</sub>-растений нельзя [22].

C<sub>4</sub>-растения демонстрируют другую, по сравнению с C<sub>3</sub>-видами, и достаточно противоречивую картину биохимических ограничений при действии повышенных температур. Это объясняется сложностью биохимической модели C<sub>4</sub>-фотосинтеза. Можно сказать, что фотосинтетической C<sub>4</sub>-УКМ, является адаптацией C<sub>3</sub>-пути к низкой концентрации CO<sub>2</sub>, которая за счет снижения оксигеназной функции РБФК/О ограничивает фотодыхание, способствуя повышению эффективности фотосинтеза и минимизируя потери воды в жарких и засушливых условиях [23]. На примере C<sub>4</sub>-трав установлено, что активация биосинтеза белков и метаболитов в результате усиления метаболических процессов при eCO<sub>2</sub> может способствовать улучшению термостойкости растений, связанной с усилением дыхательных метаболических путей в условиях теплового стресса [24]. Действие eCO<sub>2</sub> на C<sub>4</sub>-НАД-растения способствует повышению клеточной устойчивости к тепловому шоку, стимулирует рост растений [25]. С другой стороны, показано, что при eCO<sub>2</sub> у C<sub>4</sub>-растений наблюдается снижение чувствительных к повышенной температуре фотосинтетических параметров (видимый фотосинтез, устьичная проводимость и эффективность ФС II) [19]. Предполагается, что неоднозначность ответов на совместное действие eCO<sub>2</sub> и eT у C<sub>4</sub>-видов связана с видоспецифичностью [26] и с противоположным действием этих факторов на транспирацию [27]. Итак, на сегодняшний день данные о влиянии eCO<sub>2</sub> на механизмы термоустойчивости растений с разным типом фотосинтетического метаболизма противоречивы и фрагментарны [3, 10, 11, 22]. В то же время исследования комбинированного действия eCO<sub>2</sub> и eT на отдельные этапы C<sub>3</sub>- и C<sub>4</sub>-фотосинтеза важны для создания реалистичной картины влияния изменяющегося климата на растения, необходимой для прогнозирования продуктивности растений [4, 10, 11, 22].

В данной работе исследовали однолетние окультуренные растения одного семейства Ама-

рантовые с разным типом фотосинтеза – киноа ( $C_3$ , подсем. Chenopodiaceae) и амарант ( $C_4$ , Amaranthaceae). Они относятся к группе культур, известных как псевдозерновые. Киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.) – стрессоустойчивое растение, из-за высокой питательной ценности и адаптируемости было предложено в качестве культуры, используемой для повышения продовольственной безопасности в условиях климатических изменений [1, 16]. Амарант запрокинутый (*Amaranthus retroflexus* L.) – теплолюбивый, устойчивый к засухе вид, произрастающий почти во всех районах России. В настоящее время амарант используется повсеместно: выведены кормовые, декоративные и овощные сорта растения [28, 29].

Целью данной работы являлось исследование влияния повышенной концентрации  $CO_2$  (800 ppm) на термоустойчивость растений с разным типом фотосинтеза: *Chenopodium quinoa* ( $C_3$ ) и *Amaranthus retroflexus* ( $C_4$ -НАД) к кратковременной повышенной температуре (35°C).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования и условия выращивания.** Семена *Chenopodium quinoa* Willd., сорт “Vakhdat”, и *Amaranthus retroflexus* L. (интродуцированный вид) получены из Центра генетических ресурсов Таджикской академии сельскохозяйственных наук (CGR TAAS).

Семена киноа проращивали в дистиллированной воде и 3–4-дневные проростки высаживали на перлит, пропитанный 50% раствором Хогланда. Семена *Amaranthus retroflexus* проращивали в перлите без предварительного замачивания. Растения выращивали в течение 30 дней под люминесцентными лампами (плотность потоков квантов ФАР 200 мкмоль/(м<sup>2</sup> с)), при 16-часовом фотопериоде, в двух отдельных камерах при естественной (400 ppm, а $CO_2$ ) и повышенной (800 ppm, е $CO_2$ ) концентрации  $CO_2$  при температуре 25°C. Затем растения в обеих камерах подвергали 4-дневному воздействию повышенной температуры (35°C, еТ).

**Определение сухой биомассы, содержания воды, пролина и МДА.** Для определения сухой биомассы листья высушивали при 80°C до постоянной массы. Содержание воды (W) рассчитывали по формуле и выражали в г  $H_2O$ /г сухой массы:

$$W = (FW - DW)/DW, \quad (1)$$

где FW – сырая биомасса, DW – сухая биомасса.

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates [30] с модификациями. В качестве анализируемых экстрактов использовали водные вытяжки высушенных и растертых листьев. Результаты рассчитывали на 1 г сухой массы.

Скорость перекисного окисления липидов оценивали спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основанной на взаимодействии ТБК с малоновым диальдегидом (МДА). Содержание МДА определяли по Heath и Packer [31]. Навеску листьев (0.5 г) растирали в ступке с 2 мл 0.5% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин и к 0.3 мл супернатанта добавляли 1.2 мл 0.5% ТБК в 20% ТХУ. Смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем быстро охлаждали во льду и центрифугировали при 10000 г в течение 10 мин. После этого измеряли оптическую плотность проб при 532 и 600 нм (Multiskan Sky Spectrophotometer, “Thermo Scientific”, США). Концентрацию МДА рассчитывали после вычитания неспецифического поглощения при 600 нм ( $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) и выражали в нмоль/г сырой массы.

**Измерение  $CO_2/H_2O$  газообмена.** Для определения интенсивности видимого фотосинтеза (A) и транспирации (E) лист помещали в термостатируемую при комнатной температуре листовую камеру и освещали оптоволоконным световодом от осветителя (KL 1500 LCD, “Shott”, Германия) с галогеновой лампой (150 Вт, “Philips”, Нидерланды) с интенсивностью ФАР в поле объекта 2000 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Стационарный  $CO_2/H_2O$  газообмен листа измеряли с помощью одноканального ИК-газоанализатора (LI-820, “LICOR”, США) в открытой схеме. Транспирацию листа рассчитывали на основании разности влажности газа на входе и выходе из листовой камеры. В данной установке в опорном газовом потоке на входе в листовую камеру поддерживали известную постоянную влажность с помощью увлажнителя LI-610 (“LICOR”, США). Для определения влажности на выходе из листовой камеры использовали психрометрический датчик HMP50 (“Vaisala INTERCAP”, Финляндия). Эффективность использования воды (WUE) рассчитывали, как отношение скорости видимого фотосинтеза к транспирации (A/E). Интенсивность темнового дыхания (Rd) оценивали через 20 мин после включения света.

**Измерение функционирования фотосистем I и II.** Изменение окислительно-восстановительного потенциала P700 измеряли путем мониторинга оптической плотности листьев при 820 нм с использованием двухволновой системы импульсной модуляции ED-P700DW (“Heinz-Walz, Effeltrich”, Германия) в сочетании с PAM-101 (“Heinz-Walz”, Германия). Кинетика окисления P700 измерялась при освещении дальним красным светом (720 нм, 17.2 Вт/м<sup>2</sup>). Максимальное окисление P700 определяли с использованием ксеноновой газоразрядной лампы (50 мс, 1500 Вт/м<sup>2</sup>, “Heinz-Walz”, Германия) в присутствии дальнего красного света.

Определение квантового выхода флуоресценции ФС II адаптированного к темноте (20 мин) фрагмента листа осуществляли с помощью РАМ-флуориметра (РАМ-101, "Heinz-Walz", Германия). Измеряли темновой максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II ( $F_v/F_m$ ). Измерение проводили с досветкой образца слабым модулированным потоком красного света, которое осуществлялось АЦП (PDA-100, "Walz", Германия), преобразующим первичный сигнал от РАМ-101 на компьютер со стандартным программным интерфейсом. Расчет показателей проводили на основании текущих значений минимальной ( $F_0$ ) и максимальной ( $F_m$ ) флуоресценции адаптированного к темноте листа по формуле:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m. \quad (2)$$

Максимальную квантовую эффективность ( $F'_v/F'_m$ ) и эффективный квантовый выход ( $\Phi_{\text{ФСII}}$ ) фотохимии ФС II при заданной интенсивности света рассчитывали по формулам:

$$F'_v/F'_m = (F'_m - F'_0)/F'_m, \quad (3)$$

$$\Phi_{\text{ФСII}} = F'_q/F'_m, \quad (4)$$

где  $F'_q$  – фотохимическое тушение флуоресценции открытым реакционным центром ФС II, а  $F'_0$  и  $F'_m$  – минимальная и максимальная флуоресценция хлорофилла после световой адаптации.

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (NPQ) рассчитывали по формуле:

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m. \quad (5)$$

Определение содержания белков рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О), фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк) и глициндекарбоксилазы (ГДК) проводили с помощью вестерн-блоттинга. Тотальный белок выделяли из листьев (0.5 г) экстракционным буфером (50 мМ Трис-НСI (рН 8.0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.3 мМ ЭДТА, 2% поливинилпирролидон и 5 мМ дитиотреитол). Содержание белка определяли по методу Бредфорд, используя бычий сывороточный альбумин ("Sigma-Aldrich", США) в качестве стандарта.

**Вестерн блоттинг.** Анализ содержания белков РБФК/О, ФЕПк и ГДК проводили с помощью иммуноферментного анализа, как было описано ранее [32] с использованием коммерческих поликлональных антител против белков большой субъединицы (L) (БС) РБФК/О (RbcL, AS03037, "Agrisera", Швеция), ФЕПк (PEPC, AS09458, "Agrisera", Швеция) и ГДК (GLDP, AS204370, "Agrisera", Швеция). Разделение суммарных белков (5–15 мкг тотального белка в слоте) проводили с помощью 10% денатурирующего гель-электрофореза (SDS-PAGE). После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную

мембрану ("Amersham, GE Healthcare", Великобритания), используя прибор для мокрого блоттинга ("BioRad", США) согласно стандартному протоколу. Анализ взаимодействия антител с антигеном проводили обработкой вторичными антителами (anti-rabbit IgG horse radish antibodies (Agrisera, AS09 602)) с помощью смеси люминола и кумаровой кислоты в присутствии перекиси водорода. Хемилюминесцентный сигнал на мембранах регистрировали с помощью пленки Retina XBE (Германия). Интенсивность полос в вестерн-блоттинге оценивали с помощью программы ImageJ 1.37v (США) и выражали относительно среднего уровня ( $n = 3$ ) для контрольных растений, который был взят за 100%. Анализ проводили не менее 3 раз.

**Статистический анализ.** Во всех экспериментах было пять биологических повторностей. Для корреляционного и факторного (ANOVA) анализа использовали программу SigmaPlot 12.0. На графиках приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Различия считались достоверными при  $P < 0.05$  (тест Тьюки). Для многофакторного анализа методом главных компонент (PCA) было использовано программное обеспечение R (версия 3.6.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

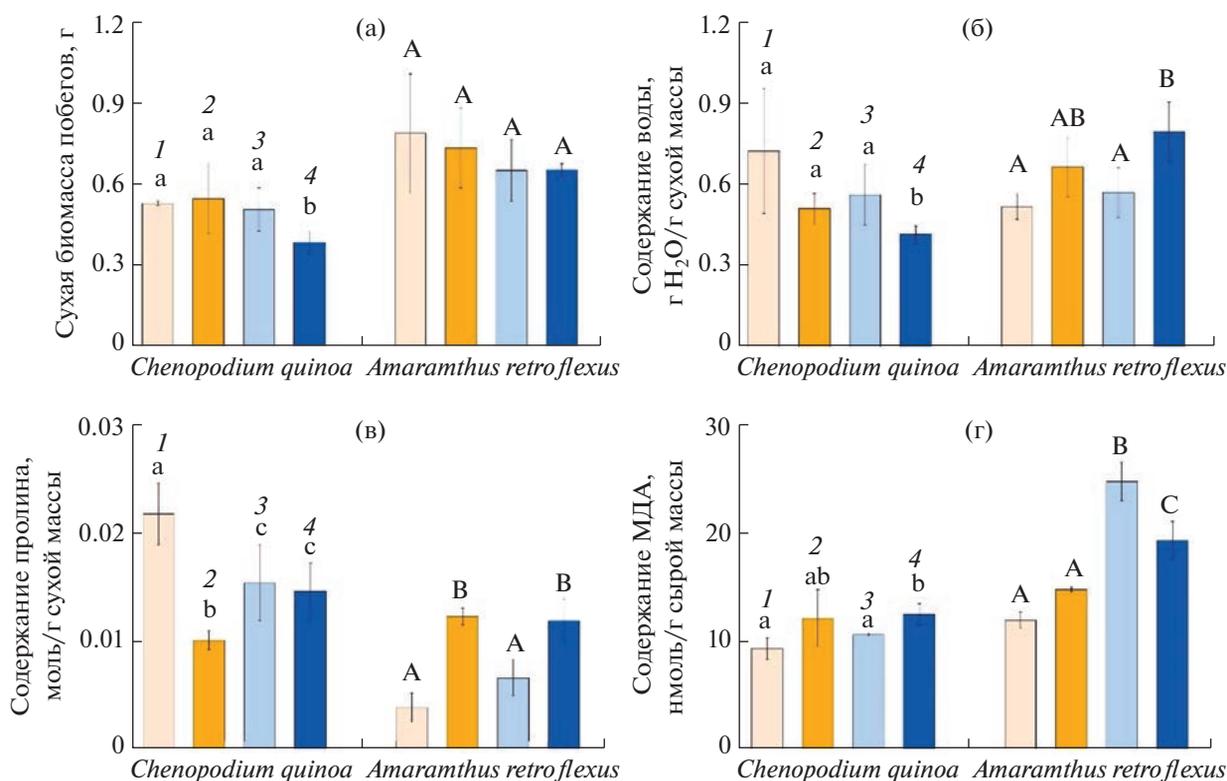
### *Ростовые параметры, содержание воды, пролина и малонового диальдегида*

34-дневные растения *C. quinoa* (C<sub>3</sub>) и *A. retroflexus* (C<sub>4</sub>-НАД) отличались по продуктивности и устойчивости. Сухая биомасса растений *A. retroflexus*, выращенных в контрольном варианте, была в 1.5 раза больше контрольных растений *C. quinoa*. Отдельное воздействие eT и eCO<sub>2</sub> не вызывало изменений в росте растений обоих видов, а совместное действие eCO<sub>2</sub> и eT снижало биомассу только у *C. quinoa* на 28% (рис. 1а).

При совместном действии факторов (eCO<sub>2</sub> и eT) исследуемые растения отличались также по содержанию воды: у *C. quinoa* наблюдалось его снижение на 42%, а у *A. retroflexus* возрастание на 52%, по сравнению с контролем (рис. 1б).

Содержание пролина при всех видах воздействия у *C. quinoa* снижалось на 30–50%, а у *A. retroflexus* повышалось при температурном воздействии и совместном действии факторов (eCO<sub>2</sub> и eT) в 3 раза, по сравнению с контролем (рис. 1в).

Содержание МДА, которое является показателем окислительного стресса, у *C. quinoa* возрастало при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT на 34%, а у *A. retroflexus* – в 2 раза при действии eCO<sub>2</sub> и на 61% при совместном действии факторов (eCO<sub>2</sub> и eT) (рис. 1г).



**Рис. 1.** Накопление сухой биомассы (а), содержание воды (б), пролина (в) и МДА (г) у растений *Chenopodium quinoa* и *Amaranthus retroflexus*, выращенных при разных концентрациях CO<sub>2</sub> и кратковременном действии повышенной температуры (35°C, eT). (1) Контрольные растения, выращенные при естественной (400 ppm) концентрации CO<sub>2</sub> (aCO<sub>2</sub>); (2) растения, выращенные при aCO<sub>2</sub> и 4-дневном воздействии eT; (3) растения, выращенные при повышенной (800 ppm) концентрации CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>); (4) растения, выращенные при eCO<sub>2</sub> и 4-дневном воздействии eT (eCO<sub>2</sub> и eT). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$ .

#### Интенсивность параметров CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O газообмена

Интенсивность видимого фотосинтеза (A) в контроле была более значительной у растений *A. retroflexus* (на 28%) по сравнению с растениями *C. quinoa*. Интенсивность видимого фотосинтеза *C. quinoa* снижалась при действии повышенной температуры как при обычном, так и при повышенном уровне CO<sub>2</sub> на 28 и 18%, соответственно, а у *A. retroflexus* при всех видах воздействий в среднем на 33% по сравнению с контролем (рис. 2а).

У обоих видов *C. quinoa* и *A. retroflexus* значения интенсивности транспирации (E) при повышении температуры снижались на 23 и 45% соответственно. Кроме того, снижение E на 20%, по сравнению с контролем, происходило у растений *A. retroflexus* при действии eCO<sub>2</sub> и совместном действии факторов (eCO<sub>2</sub> и eT) (рис. 2б).

Интенсивность темнового митохондриального дыхания (Rd) у обоих видов возрастала при действии повышенной температуры и повышенной концентрации CO<sub>2</sub>: на 36% у *C. quinoa* и на 83% у *A. retroflexus*. У *A. retroflexus* Rd также увеличивалась на 39% при действии повышенной темпера-

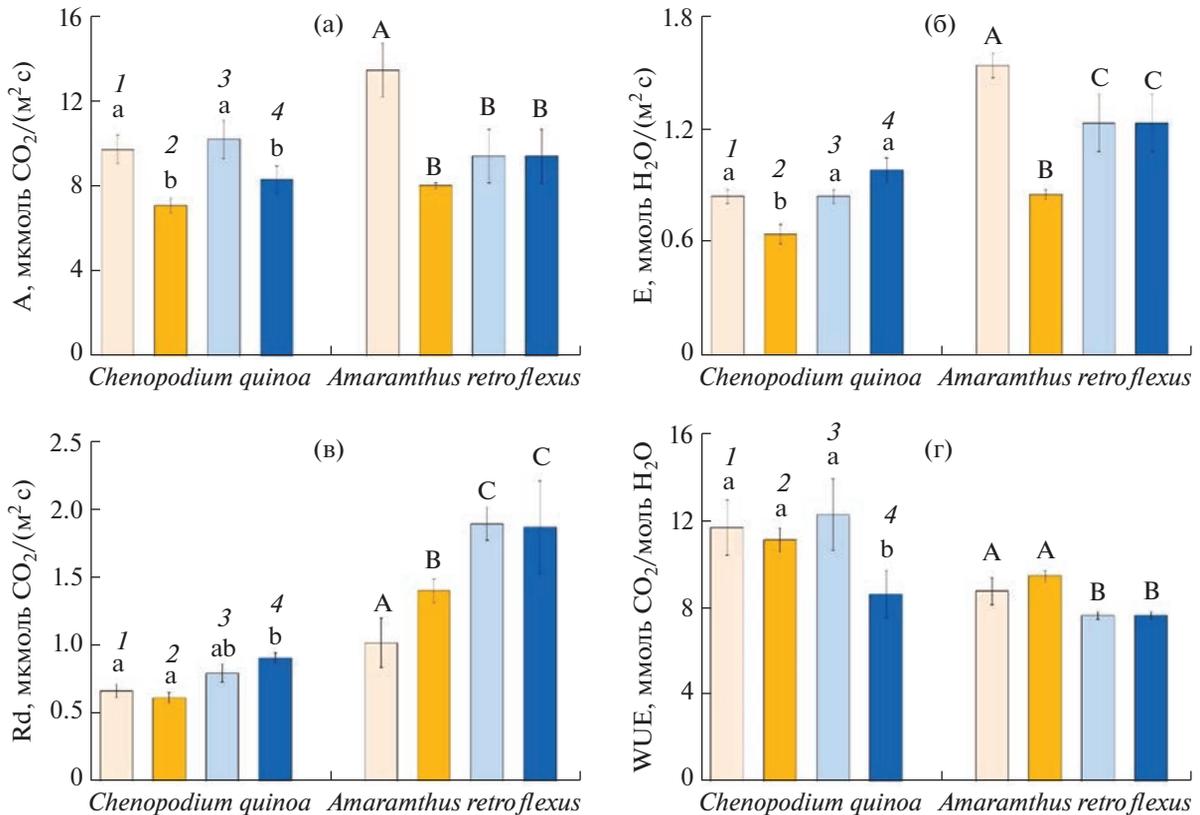
туры и на 86% в условиях повышенной концентрации CO<sub>2</sub> по сравнению с контролем (рис. 2в).

Эффективность использования воды (WUE) у обоих видов снижалась при совместном действии факторов (eCO<sub>2</sub> и eT): на 26% у *C. quinoa* и на 13% у *A. retroflexus* по сравнению с контролем. У *A. retroflexus* происходило снижение WUE и при действии повышенного уровня CO<sub>2</sub> при обычной температуре на 13% по сравнению с контролем (рис. 2г).

#### Активность ФС I и эффективность функционирования ФС II

Эффективность функционирования ФС I и циклического транспорта электронов была более значительной у растений *A. retroflexus*. При всех вариантах воздействий данный параметр достоверно не изменялся у обоих видов (рис. 3а).

Эффективность максимального квантового выхода фотосинтеза ФС II ( $F_v/F_m$ ) у растений обоих видов снижалась при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT в среднем на 20%. У *C. quinoa* она также снижалась на 20% при действии только eT (рис. 3б).



**Рис. 2.** Интенсивность видимого фотосинтеза (а), транспирации (б), темнового дыхания (в) и эффективность использования воды (г) у растений *Chenopodium quinoa* и *Amaranthus retroflexus*, выращенных при разных концентрациях CO<sub>2</sub> и кратковременном действии повышенной температуры (35°C, eT). (1) Контрольные растения, выращенные при естественной (400 ppm) концентрации CO<sub>2</sub> (aCO<sub>2</sub>); (2) растения, выращенные при aCO<sub>2</sub> и 4-дневном воздействии eT; (3) растения, выращенные при повышенной (800 ppm) концентрации CO<sub>2</sub> (eCO<sub>2</sub>); (4) растения, выращенные при eCO<sub>2</sub> и 4-дневном воздействии eT (eCO<sub>2</sub> и eT). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$ .

Снижение  $F_v/F_m$  у обоих видов при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT и у *C. quinoa* при eT сопровождалось аналогичным снижением на ~20% максимальной квантовой эффективности фотохимии ФС II при заданной интенсивности света ( $Y' = F'_v/F'_m$ ) и на ~14% эффективного квантового выхода фотохимии ФС II при заданной интенсивности света ( $\Phi_{ФСII} (F'_q/F'_m)$ ) (рис. 3в, г). В контрольных условиях нефотохимическое тушение (NPQ) было более значительным (почти в 3 раза) у растений *A. retroflexus* по сравнению с растениями *C. quinoa*, у которых при действии eT и при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT NPQ снижалось на 38% (рис. 3д).

#### Содержание фотосинтетических ферментов

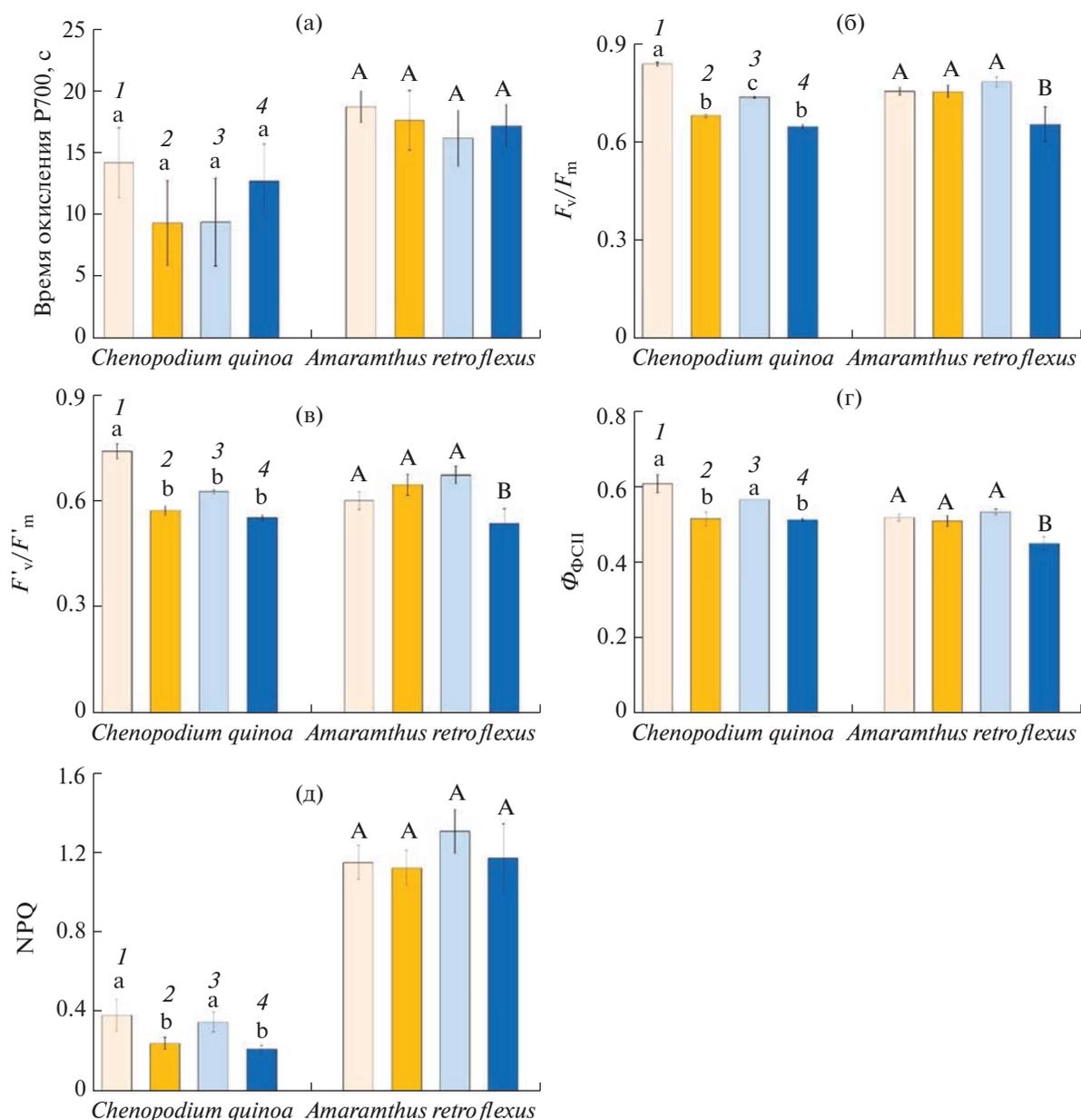
Содержание фермента РБФК/О достоверно не изменялось в результате воздействия всех вариантов факторов ни у растений *C. quinoa*, ни у *A. retroflexus* (рис. 4а).

Содержание фермента ФЕПк было снижено только у растений *C. quinoa*, выращенных при действии eCO<sub>2</sub> и при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT на 44 и 51% по сравнению с контролем соответственно. У растений *A. retroflexus*, выращенных при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT, наблюдалось возрастание содержания ФЕПк на 20% (рис. 4в).

Содержание ГДК снижалось в среднем в 2 раза только у растений *C. quinoa* при всех исследованных вариантах воздействия (рис. 4г).

#### Многофакторный анализ физиологических и биохимических параметров

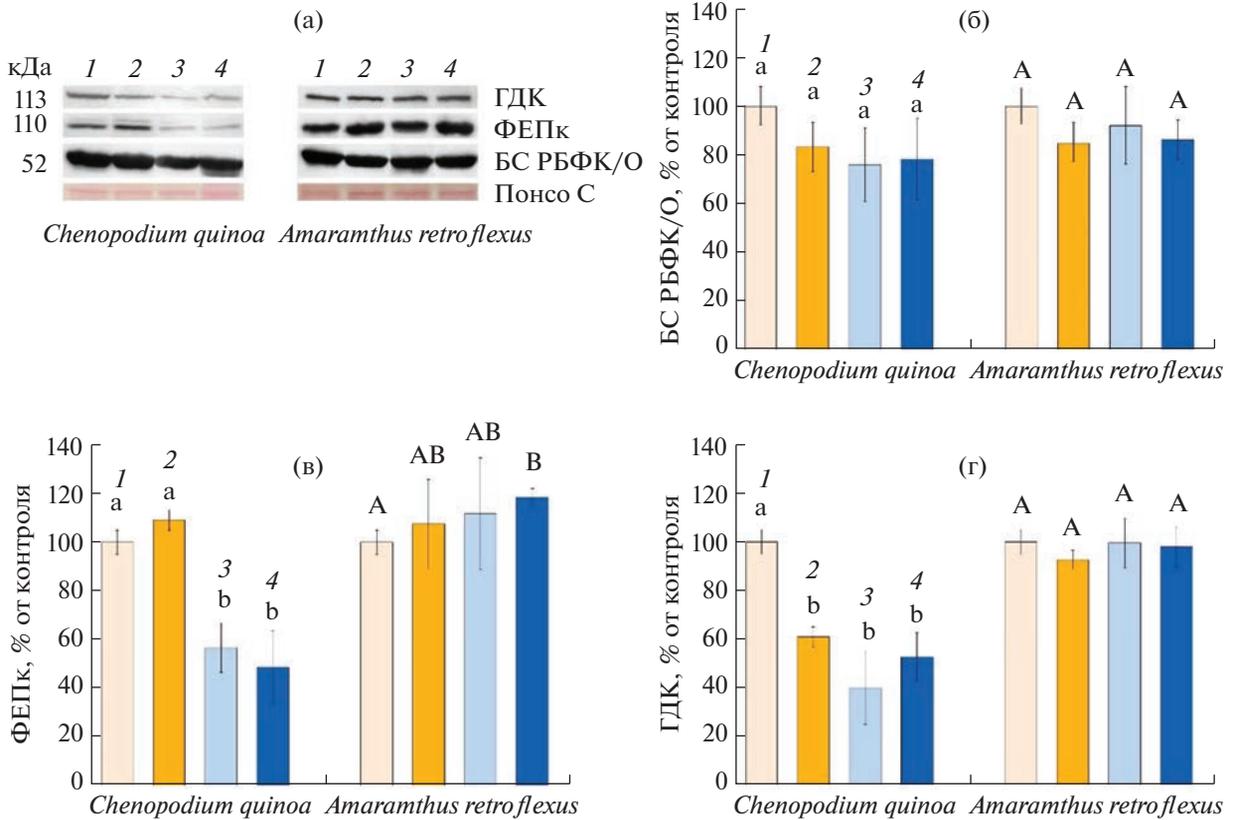
Для оценки степени изменений характеристик фотосинтетического аппарата и механизмов устойчивости в условиях повышенной температуры и концентрации CO<sub>2</sub> был проведен многофакторный анализ методом главных компонент (PCA) биохимических и физиологических параметров *C. quinoa* (C<sub>3</sub>) и *A. retroflexus* (C<sub>4</sub>). На рис. 5а видно, что у растений *C. quinoa* первой основной компо-



**Рис. 3.** Фотосинтетические параметры у растений *Chenopodium quinoa* и *Amaranthus retroflexus*, выращенных при разных концентрациях  $\text{CO}_2$  и кратковременном действии повышенной температуры ( $35^\circ\text{C}$ , еТ). (а) Активность циклического транспорта электронов ФС I; (б) максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II ( $F_v/F_m$ ); (в) максимальная квантовая эффективность фотохимии ФС II при заданной интенсивности света ( $F'_v/F'_m$ ); (г) эффективный квантовый выход фотохимии ФС II при заданной интенсивности света ( $\Phi_{ФФII}$ ); (д) нефотохимическое тушение флуоресценции ФС II (NPQ). (1) Контрольные растения, выращенные при естественной (400 ppm) концентрации  $\text{CO}_2$  (а $\text{CO}_2$ ); (2) растения, выращенные при а $\text{CO}_2$  и 4-дневном воздействии еТ; (3) растения, выращенные при повышенной (800 ppm) концентрации  $\text{CO}_2$  (е $\text{CO}_2$ ); (4) растения, выращенные при е $\text{CO}_2$  и 4-дневном воздействии еТ (е $\text{CO}_2$  и еТ). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$ .

нентой (PC1) четко отделяются от контроля два варианта с повышенной температурой: еТ и совместным действием е $\text{CO}_2$  и еТ. Разделение составляет 41.15% от общей вариации. Основными элементами PC1 были характеристики функционирования ФС II (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о значительном воздействии

повышенной температуры на данный  $\text{C}_3$ -вид. Вторая главная компонента (PC2) разделила контроль и вариант е $\text{CO}_2$  (рис. 5а). Разделение составило 18.63% от общей вариации. В данном случае основными значимыми параметрами явились содержание ферментов ГДК и ФЕПк (ключевых ферментов фотодыхательного гликолатного цик-



**Рис. 4.** Результаты вестерн-блоттинга белков БС РБФК/О (большая субъединица) (а, б), ФЕПк (а, в) и ГДК (а, г) в листьях растений *Chenopodium quinoa* и *Amaranthus retroflexus*, выращенных при разных концентрациях CO<sub>2</sub> и кратковременном действии повышенной температуры (35°C, еТ). (1) Контрольные растения, выращенные при естественной (400 ppm) концентрации CO<sub>2</sub> (аCO<sub>2</sub>); (2) растения, выращенные при аCO<sub>2</sub> и 4-дневном воздействии еТ; (3) растения, выращенные при повышенной (800 ppm) концентрации CO<sub>2</sub> (еCO<sub>2</sub>); (4) растения, выращенные при еCO<sub>2</sub> и 4-дневном воздействии еТ (еCO<sub>2</sub> и еТ). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$ .

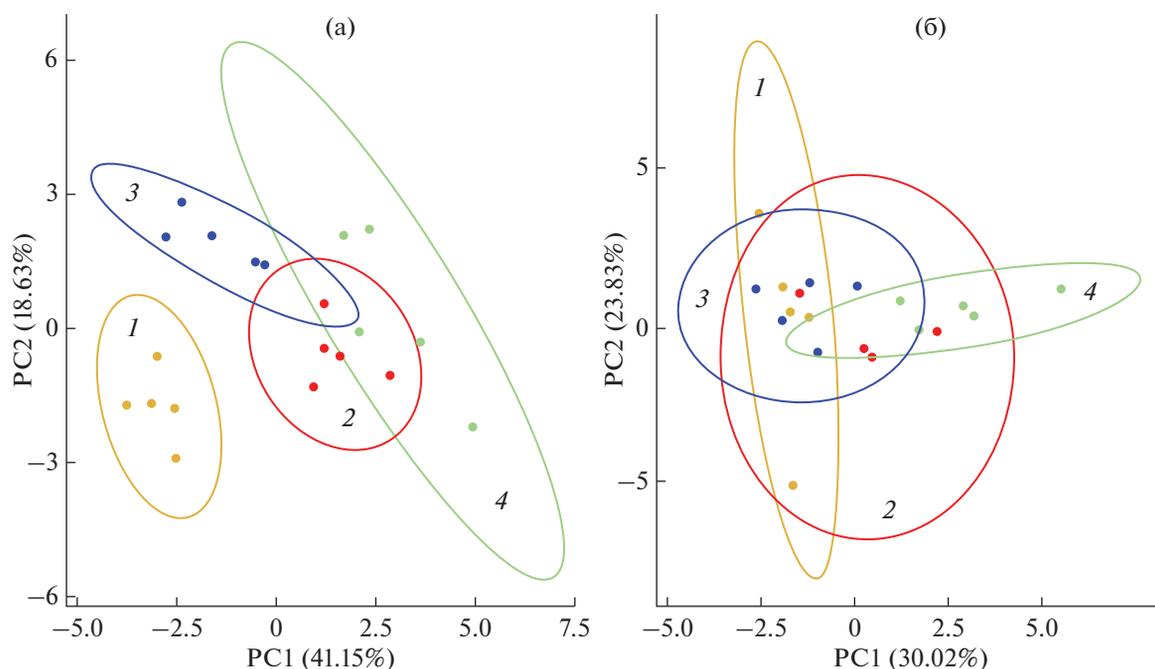
ла и УМК), а также интенсивность транспирации (табл. 1). Первых двух РС компонент достаточно для объяснения 59.78% изменений от общей вариации. На рисунке 5б приведены результаты РСА-анализа данных C<sub>4</sub>-вида *A. retroflexus*. У данного вида первой основной компонентой (PC1) разделяются только варианты контроль и совместное действие факторов (еCO<sub>2</sub> и еТ). Разделение составляет 30.02% от общей вариации. Основными элементами PC1 были характеристики функционирования ФС II и содержание ФЕПк (табл. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных условиях исследуемые растения *C. quinoa* (C<sub>3</sub>) и *A. retroflexus* (C<sub>4</sub>) отличались по ряду биохимических и физиологических параметров: у C<sub>4</sub>-вида, по сравнению с C<sub>3</sub>-видом, были более высокие значения прироста сухой биомассы, интенсивности видимого фотосинтеза (A) и транспирации (E), активности ФС I и содержания пролина (рис. 1–3). Эти данные свидетельствуют о более эффективном функционировании фото-

синтетического аппарата и УМК у *A. retroflexus*, которые обеспечили более значительный прирост биомассы, по сравнению с C<sub>3</sub>-видом. Низкие значения WUE в контрольных условиях у *A. retroflexus* можно объяснить видоспецифичностью данного параметра [3]. Более высокие значения активности ФС I у C<sub>4</sub>-вида свидетельствуют о более интенсивном циклическом транспорте электронов ФС I. Как известно, две дополнительные молекулы АТФ требуются для каждой молекулы CO<sub>2</sub>, фиксированной в результате действия C<sub>4</sub>-цикла [33, 34]. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов [3].

Увеличение температуры влияет почти на все биологические процессы в растениях, включая морфогенез, текучесть мембранных липидов и их состав, камбиальную активность [4]. Одним из наиболее термочувствительных процессов растений считается фотосинтез. На C<sub>3</sub>-видах показано, что термолабильными лимитирующими этапами фотосинтеза являются световые реакции (компоненты ФС II) и темновые реакции (на уровне РБФК/О-активазы) [35, 36]. При высокой темпе-



**Рис. 5.** Многофакторный анализ методом главных компонент (PCA) биохимических и физиологических параметров, участвующих в процессе адаптации растений *Chenopodium quinoa* и *Amaranthus retroflexus*, выращенных при разных концентрациях  $\text{CO}_2$  и кратковременном действии повышенной температуры ( $35^\circ\text{C}$ ,  $\text{eT}$ ). (1) Контрольные растения, выращенные при естественной ( $400 \text{ ppm}$ ) концентрации  $\text{CO}_2$  ( $\text{aCO}_2$ ); (2) растения, выращенные при  $\text{aCO}_2$  и 4-дневном действии  $\text{eT}$ ; (3) растения, выращенные при повышенной ( $800 \text{ ppm}$ ) концентрации  $\text{CO}_2$  ( $\text{eCO}_2$ ); (4) растения, выращенные при  $\text{eCO}_2$  и 4-дневном действии  $\text{eT}$  ( $\text{eCO}_2$  и  $\text{eT}$ ).

ратуре РБФК/О-активаза может образовывать неактивные агрегаты, что приводит к замедлению активности карбоксилазной функции РБФК/О [8, 18]. Проведенный нами PCA-анализ морфофизиологических и биохимических параметров *C. quinoa* подтвердил, что для данного  $\text{C}_3$ -вида значимыми параметрами в условиях повышенной температуры были показатели эффективности функционирования ФС II (рис. 5а; табл. 1). PCA-анализ  $\text{C}_4$ -вида *A. retroflexus* не выявил значимой реакции на температурное воздействие. Однако некоторые параметры при действии  $\text{eT}$  достоверно изменялись. Наблюдалось значительное снижение интенсивностей А и Е, которые сопровождались признаками осмотического стресса, о чем свидетельствует значительное увеличение содержания пролина (рис. 1, 2).

Неоднозначность реакции  $\text{C}_3$ -растений на высокий уровень  $\text{CO}_2$  может быть связана со сложным и комплексным характером воздействия  $\text{eCO}_2$  на углеводный обмен растений. Так,  $\text{eCO}_2$ , снижая устьичную проводимость, влияет на динамику как углеродного, так и водного обмена растений. С одной стороны, низкие значения устьичной проводимости отрицательно действуют на интенсивность поступления  $\text{CO}_2$  в растения, что частично компенсируется стимуляцией скорости карбоксилирования РБФК/О высоким содержа-

нием  $\text{CO}_2$  [9, 37]. С другой стороны, они могут привести к значительной экономии воды в растениях, снижая уровень транспирации, что приводит к увеличению эффективности использования воды [6, 9]. В наших экспериментах у растений *C. quinoa* не наблюдалось возрастания WUE, вследствие снижения Е при действии  $\text{eCO}_2$  (рис. 2). Для  $\text{C}_3$ -видов характерно подавление интенсивности фотодыхания высоким уровнем  $\text{CO}_2$  за счет снижения оксигеназной функции РБФК/О [9]. При удвоении уровня  $\text{CO}_2$  снижение фотодыхания может составить более  $\sim 50\%$  [6]. В проведенных нами экспериментах снижение содержания ключевого фермента гликолатного фотодыхательного цикла ГДК у растений *C. quinoa* при действии  $\text{eCO}_2$  составило  $60\%$  (рис. 4г). Проведенный нами PCA-анализ действия  $\text{eCO}_2$  на параметры *C. quinoa* подтвердил, что для данного  $\text{C}_3$ -вида значимыми параметрами были содержание фермента ГДК и интенсивность транспирации (рис. 5а, табл. 1). Хотя PCA-анализ  $\text{C}_4$ -вида *A. retroflexus* не выявил значимой реакции на воздействие  $\text{eCO}_2$ , однако некоторые параметры у этого вида при  $\text{eCO}_2$  достоверно изменялись. В частности, наблюдалось снижение интенсивностей А и Е, что сопровождалось окислительным стрессом, наличие которого подтверждает 2-кратное увеличение содержания МДА и значительное увеличение диссипацион-

**Таблица 1.** Факторные нагрузки биохимических и физиологических параметров на главные компоненты (PC1 и PC2) многофакторного анализа (РСА) растений *Chenopodium quinoa* и *Amaranthus retroflexus*, выращенных при естественной (400 ppm) и повышенной (800 ppm) концентрациях CO<sub>2</sub> и кратковременном действии повышенной температуры (35°C)

Параметры	<i>C. quinoa</i>		<i>A. retroflexus</i>	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Сухая биомасса	-0.198	0.052	-0.143	0.274
Содержание воды	0.255	-0.270	0.314	-0.085
Содержание пролина	-0.213	-0.143	0.308	-0.171
Содержание МДА	0.245	0.139	0.069	0.152
A	-0.265	0.325	0.049	0.496
Rd	-0.133	0.364	0.251	0.040
E	-0.223	<b>0.375</b>	0.029	0.467
WUE	-0.233	0.204	0.066	0.459
ФС I	-0.178	0.116	0.071	-0.147
$F_v/F_m$	<b>-0.349</b>	-0.203	<b>-0.400</b>	-0.118
$F'_v/F'_m$	<b>-0.335</b>	-0.236	-0.325	-0.187
$\Phi_{\text{ФСII}}$	<b>-0.325</b>	-0.122	<b>-0.391</b>	0.047
NPQ	-0.296	-0.054	-0.219	0.108
Содержание РБФК/О	-0.295	0.026	-0.324	-0.142
Содержание ФЕПк	-0.108	<b>-0.374</b>	<b>0.330</b>	-0.271
Содержание ГДК	-0.143	<b>-0.442</b>	-0.160	-0.108

Примечание. Полужирным шрифтом показаны наиболее значимые параметры. A – интенсивность видимого фотосинтеза; Rd – интенсивность темнового дыхания; E – интенсивность транспирации; WUE – эффективность использования воды;  $F_v/F_m$  – максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II;  $F'_v/F'_m$  – максимальная квантовая эффективность фотохимии ФС II при заданной интенсивности света;  $\Phi_{\text{ФСII}}$  – эффективный квантовый выход фотохимии ФС II при заданной интенсивности света; NPQ – нефотохимическое тушение.

ных дыхательных затрат в темновом митохондриальном дыхании (рис. 1г, 2в). Снижение E у C<sub>4</sub>-растений при действии eCO<sub>2</sub> показано и другими авторами [11, 38]. О влиянии eCO<sub>2</sub> на активность, содержание и экспрессию генов РБФК/О у C<sub>4</sub>-растений информация противоречивая: экспрессия может как снижаться [39], так и увеличиваться [38]. Это объясняется тем, что гены, кодирующие важные фотосинтетические ферменты, необходимые для эффективного функционирования C<sub>4</sub>-фотосинтеза, роста биомассы и накопления сахарозы, по-разному регулируются в условиях eCO<sub>2</sub> и связано это с видоспецифичностью или с разновидностью C<sub>4</sub>-пути и/или комбинированным воздействием высоких экологических нагрузок, сопровождающих eCO<sub>2</sub>.

РСА-анализ морфофизиологических и биохимических параметров при совместном действии eCO<sub>2</sub> и eT продемонстрировал их значительные отличия по первой компоненте (PC1) от кон-

трольного варианта у обоих видов (рис. 5). Как у C<sub>3</sub>-, так и у C<sub>4</sub>-вида значимыми параметрами были показатели эффективности функционирования ФС II, а у *A. retroflexus* еще и содержание ФЕПк (рис. 5а, б; табл. 1). При этом у C<sub>3</sub>-вида решающим фактором была eT, поскольку подобным образом растения реагировали на данный фактор в отдельности. Воздействие eCO<sub>2</sub> и совместное действие eCO<sub>2</sub> и eT одинаково негативно влияли на содержание у *C. quinoa* фотодыхательного фермента ГДК. Это согласуется с данными других авторов, показавших снижение фотодыхания в результате подавления eCO<sub>2</sub> функции оксигенации РБФК/О [6, 9]. Характерной особенностью совместного действия eCO<sub>2</sub> и eT на C<sub>3</sub>-вид *C. quinoa* было снижение сухой биомассы, содержания воды в тканях и WUE (рис. 1, 2). Из работ других авторов следует, что *C. quinoa* проявляет очень разнообразную реакцию по перечисленным параметрам в зависимости от генотипа и фенологической стадии

[16]. О наличии окислительного стресса свидетельствует увеличение содержания МДА, а усиление темнового дыхания, вероятно, связано с его диссипационной и защитной функцией от окислительного стресса (рис. 1, 2). У  $C_4$ -вида при совместном действии  $eCO_2$  и  $eT$  возрастание содержания ФЕПк свидетельствует об усилении роли УКМ и, возможно, о рассогласовании функционирования цикла Кальвина и УКМ (рис. 4). Данные изменения фотосинтетических параметров сопровождались значительным возрастанием содержания пролина, связанным в основном с температурным фактором (рис. 1), и возрастанием содержания МДА, свидетельствующим об окислительном стрессе, связанным у данного  $C_4$ -вида с  $eCO_2$  (рис. 1). При совместном действии  $eCO_2$  и  $eT$  у обоих видов наблюдалось снижение WUE, и в большей степени у  $C_3$ -вида.

Итак,  $C_4$ -вид *A. retroflexus*, по сравнению с  $C_3$ -видом *S. quinoa*, продемонстрировал в контрольных условиях более высокие значения интенсивности фотосинтеза и транспирации, активности ФС I, а также низкое содержание пролина. На действие  $eT$  более сильно реагировал  $C_3$ -вид, наблюдалось подавление световых реакций (ФС II), цикла Кальвина и фотодыхания. У  $C_4$ -вида подавлялись интенсивность фотосинтеза и транспирации. Сильное возрастание пролина у *A. retroflexus* свидетельствует о тепловом стрессе. На действие  $eCO_2$   $C_3$ -вид реагировал значительным снижением фотодыхания, а у  $C_4$ -вида признаки окислительного стресса сопровождались подавлением интенсивности фотосинтеза, транспирации и возрастанием темнового дыхания, вероятно, связанного с диссипационной и защитной функцией. Смягчающий эффект  $eCO_2$  на термоустойчивость  $C_3$ - и  $C_4$ -растений, показанный в ряде работ [2, 20–22], в наших экспериментах у растений *S. quinoa* и *A. retroflexus* не был установлен. Действие  $eT$  на  $C_3$ -вид было главным повреждающим фактором, который при действии  $eCO_2$  приводил еще к снижению роста и окислительному стрессу. У  $C_4$ -вида *A. retroflexus* совместное действие  $eCO_2$  и  $eT$  вызывало дополнительно возрастание содержания ключевого фермента УКМ – ФЕПк. А сочетание температурного стресса, вызванного  $eT$ , и окислительного стресса, вызванного  $eCO_2$ , приводило к нарушению эффективности ФС II. Таким образом,  $C_3$ -растения *S. quinoa* в стрессовых условиях проявили большую вариабельность фотосинтетического и устьичного аппарата, а также способность к акклиматации фотосинтеза к повышенной температуре на уровне световых и темновых реакций, но слабую устойчивость к совместному действию  $eCO_2$  и  $eT$ , тогда как  $C_4$ -растения *A. retroflexus* продемонстрировали изначально большую адаптированность к теплой среде, за счет нали-

чия узкоспециального УКМ, а также стабильность ростовых параметров, однако у данного вида при совместном действии  $eCO_2$  и  $eT$  помимо окислительного стресса наблюдались признаки теплового стресса. Тем не менее, на основании анализа первичной продуктивности изученных растений, можно предположить, что в условиях совместного действия  $eCO_2$  и  $eT$  преимущество будут иметь  $C_4$ -виды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00551).

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. *Ain Q.T., Siddique K., Bawazeer S., Ali I., Mazhar M., Rasool R., Mubeen B., Ullah F., Unar A., Jafar T.H.* Adaptive mechanisms in quinoa for coping in stressful environments: an update // *PeerJ*. 2023. V. 11: e14832. <https://doi.org/10.7717/peerj.14832>
2. *Shanker A.K., Gunnapaneni D., Bhanu D., Vanaja M., Lakshmi N.J., Yadav S.K., Prabhakar M., Singh V.K.* Elevated  $CO_2$  and water stress in combination in plants: Brothers in arms or partners in crime? // *Biology*. 2022. V. 11. P. 1330. <https://doi.org/10.3390/biology11091330>
3. *Cao Q., Li G., Liu F.* Elevated  $CO_2$  enhanced water use efficiency of wheat to progressive drought stress but not on maize // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 953712. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.953712>
4. *Dusenge M.E., Duarte A.G., Way D.A.* Plant carbon metabolism and climate change: elevated  $CO_2$  and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 32. <https://doi.org/10.1111/nph.15283>
5. *Yadav S., Elansary H.O., Mattar M.A., Elhindi M.K., Alotaibi A.M., Mishra A.* Differential accumulation of metabolites in *Suaeda* species provides new insights into abiotic stress tolerance in  $C_4$ -halophytic species in elevated  $CO_2$  conditions // *Agronomy*. 2021. V. 11. P. 131. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010131>
6. *Xu Z., Jiang Y., Zhou G.* Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated  $CO_2$  with environmental stress in plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 701. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00701>
7. *Reich P.B., Hobbie S.E., Lee T.D., Pastore M.A.* Unexpected reversal of  $C_3$  versus  $C_4$  grass response to elevated  $CO_2$  during a 20-year field experiment // *Science*. 2018. V. 360. P. 317. <https://doi.org/10.1126/science.aas9313>
8. *Lara M.V., Andreo C.S.*  $C_4$  plants adaptation to high levels of  $CO_2$  and to drought environments // *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*. Shanker, A., (Ed.). InTech: Hampshire, UK, 2011. P. 415. <https://doi.org/10.5772/24936>

9. Zheng Y., Li F., Hao L., Yu J., Guo L., Zhou H., Ma C., Zhang X., Xu M. Elevated CO<sub>2</sub> concentration induces photosynthetic down-regulation with changes in leaf structure, non-structural carbohydrates and nitrogen content of soybean // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. P. 255.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1788-9>
10. Jothiramshekar S., Benjamin J.J., Krishnasamy R., Pal A., George S., Swaminathan R., Parida A. Responses of selected C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> halophytes to elevated CO<sub>2</sub> concentration under salinity // Curr. Sci. 2018. V. 115. P. 129.  
<https://doi.org/10.18520/cs/v115/i1/129-135>
11. Faria A.P., Marabesi M.A., Gaspar M., França M.G. The increase of current atmospheric CO<sub>2</sub> and temperature can benefit leaf gas exchanges, carbohydrate content and growth in C<sub>4</sub> grass invaders of the Cerrado biome // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 127. P. 608.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.042>
12. Wang M., Xie B., Fu Y., Dong C., Hui L., Guanghui L., Liu H. Effects of different elevated CO<sub>2</sub> concentrations on chlorophyll contents, gas exchange, water use efficiency, and PSII activity on C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> cereal crops in a closed artificial ecosystem // Photosynth. Res. 2015. V. 126. P. 351.  
<https://doi.org/10.1007/s11220-015-0134-9>
13. Boretti A., Florentine S. Atmospheric CO<sub>2</sub> concentration and other limiting factors in the growth of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants // Plants. 2019. V. 8. P. 92.  
<https://doi.org/10.3390/plants8040092>
14. Prasch C.M., Sonnewald U. Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks // Plant Physiol. 2013. V. 162. P. 1849.  
<https://doi.org/10.1104/pp.113.221044>
15. Yamori W., Hikosaka K., Way D.A. Temperature response of photosynthesis in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation // Photosynth Res. 2014. V. 119. P. 101.  
<https://doi.org/10.1007/s11220-013-9874-6>
16. Hinojosa L., González J.A., Barrios-Masias F.H., Fuentes F., Murphy K.M. Quinoa abiotic stress responses: A review // Plants. 2018. V. 7. P. 106.  
<https://doi.org/10.3390/plants7040106>
17. Li G., Chen T., Feng B., Peng S., Tao L., Fu G. Respiration, rather than photosynthesis, determines rice yield loss under moderate high-temperature conditions // Front Plant Sci. 2021. V. 12. P. 678653.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678653>
18. Sage R.F., Kubien D.K. The temperature response of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> photosynthesis // Plant, Cell Environ. 2007. V. 30. P. 1086.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01682.x>
19. Wang D., Heckathorn S.A., Barua D., Joshi P., Hamilton E.W., Lacroix J.J. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM species // Am. J. Bot. 2008. V. 95. P. 165.  
<https://doi.org/10.3732/ajb.95.2.165>
20. Zinta G., AbdElgawad H., Domagalska M.A., Vergauwen L., Knapen D., Nijss I. Physiological, biochemical, and genome-wide transcriptional analysis reveals that elevated CO<sub>2</sub> mitigates the impact of combined heat wave and drought stress in *Arabidopsis thaliana* at multiple organizational levels // Glob. Chang. Biol. 2014. V. 20. P. 3670.  
<https://doi.org/10.1111/gcb.12626>
21. Zinta G., AbdElgawad H., Peshev D., Weedon J.T., Van den Ende W., Nijss I. Dynamics of metabolic responses to periods of combined heat and drought in *Arabidopsis thaliana* under ambient and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 2159.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery055>
22. Zhou R., Yu X., Wen J., Jensen N.B., Dos Santos T.M., Wu Z., Rosenqvist E., Ottosen C.O. Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration and combined heat and drought stress on tomato photosynthesis // BMC Plant Biol. 2020. V. 20. P. 260.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02457-6>
23. Arrivault S., Alexandre Moraes T., Obata T., Medeiros D.B., Fernie A.R., Boulouis A., Ludwig M., Lunn J.E., Borghi G.L., Schlereth A., Guenther M., Stitt M. Metabolite profiles reveal interspecific variation in operation of the Calvin-Benson cycle in both C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> plants // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 1843.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz051>
24. Yu J., Li R., Fan N., Yang Z., Huang B. Metabolic pathways involved in carbon dioxide enhanced heat tolerance in bermudagrass // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1506.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01506>
25. Bordignon L., Faria A.P., França M.G.C., Fernandes G.W. Osmotic stress at membrane level and photosystem II activity in two C<sub>4</sub> plants after growth in elevated CO<sub>2</sub> and temperature // Ann. Appl. Biol. 2019. V. 174. P. 113.  
<https://doi.org/10.1111/aab.12483>
26. Jeong H.M., Kim H.R., Hong S., You Y.H. Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration and increased temperature on leaf quality responses of rare and endangered plants // J. Ecol. Environ. 2018. V. 42.  
<https://doi.org/10.1186/s41610-017-0061-0>
27. Kirschbaum M.U.F., McMillan A.M.S. Warming and elevated CO<sub>2</sub> have opposing influences on transpiration. Which is more important? // Curr. Forestry Rep. 2018. V. 4. P. 51.  
<https://doi.org/10.1007/s40725-018-0073-8>
28. Wei Z., Abdelhakim L., Fang L., Peng X., Liu J., Liu F. Elevated CO<sub>2</sub> effect on the response of stomatal control and water use efficiency in amaranth and maize plants to progressive drought stress // Agric. Water Manage. 2022. V. 266.  
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107609>
29. Schafleitner R., Lin Y.-P., Dinssa F., N'Danikou S., Finkers R., Minja R., Abukutsa-Onyango M., Nyonje W., Lin C.-Y., Wu T.-H., Sigalla J.P., van Zonneveld M., Hsiao Y.-Y., Kumar S., Wu W.-J., et al. The World Vegetable Center *Amaranthus* germplasm collection: Core collection development and evaluation of agronomic and nutritional traits // Crop Sci. 2022. V. 62. P. 1173.  
<https://doi.org/10.1002/csc2.20715>
30. 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.  
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
31. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. 1968, V. 125. P. 180.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

32. *Shuyskaya E., Rakhmankulova Z., Prokofieva M., Saidova L., Toderich K., Voronin P.* Intensity and duration of salinity required to form adaptive response in  $C_4$  halophyte *Kochia prostrata* (L.) Shrad. // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.955880>
33. *Nakamura N., Iwano M., Havaux M., Yokota A., Munekage Y.N.* Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type  $C_4$  photosynthesis in the genus *Flaveria* // *New Phytol.* 2013. V. 199. P. 832. <https://doi.org/10.1111/nph.12296>
34. *Yadav S., Mishra A.* Ectopic expression of  $C_4$  photosynthetic pathway genes improves carbon assimilation and alleviate stress tolerance for future climate change // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2020. V. 26. P. 195. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00751-8>
35. *Crafts-Brandner S.J., Salucci M.E.* Sensitivity of photosynthesis in a  $C_4$  plant, maize, to heat stress // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 1773. <https://doi.org/10.1104/pp.002170>
36. *Heckathorn S.A., Ryan S.L., Baylis J.A., Wang J.A., Hamilton E.W., Cundiff L.* In vivo evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress // *Funct. Plant Biol.* 2002. V. 29. P. 933. <https://doi.org/10.1071/PP01191>
37. *Singh S.K., Reddy V.R.* Methods of mesophyll conductance estimation: its impact on key biochemical parameters and photosynthetic limitations in phosphorus stressed soybean across  $CO_2$  // *Physiol. Plant.* 2016. V. 157. P. 234. <https://doi.org/10.1111/ppl.12415>
38. *Souza A.P., Gaspar M., Silva E.A., Ulian E.C., Wacławowski A.J., Nishiyama M.Y. Jr., Santos R.V. Teixeira M.M., Souza G.M., Buckeridge M.S.* Elevated  $CO_2$  increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane // *Plant Cell Environ.* 2008. V. 31. P. 1116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01822.x>
39. *Huang Y., Fang R., Li Y., Liu X., Wang G., Yin K., Jin J., Herbert S.J.* Warming and elevated  $CO_2$  alter the transcriptomic response of maize (*Zea mays* L.) at the silking stage // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 17948. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54325-5>

## ВЛИЯНИЕ МОЗАИЧНОГО НОКАУТИРОВАНИЯ ГЕНА ФИТОИНДЕСАТУРАЗЫ *NtPDS* НА БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ У *Nicotiana tabacum* L.

© 2023 г. А. В. Нежданова<sup>а</sup> \*, М. А. Слугина<sup>а</sup>, А. В. Кулакова<sup>а</sup>, А. М. Каминская<sup>а</sup>,  
Е. З. Кочиева<sup>а</sup>, А. В. Щенникова<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра  
Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Каротиноиды крайне важны как незаменимые участники фотосинтеза и фотозащиты, а также роста, развития и стрессовой реакции растений. Фермент фитоиндесатураза (PDS; EC 1.3.5.5) катализирует первую фазу десатурации 15-*цис*-фитоина (предшественника всех каротиноидов). В работе впервые исследовано влияние нокаута *PDS* в геноме *Nicotiana tabacum* L. с использованием системы CRISPR-Cas9 на активность нижестоящих генов пути биосинтеза каротиноидов. Получены девять трансгенных линий табака с мозаичным редактированием гена *NtPDS* – три варианта инделей (350<sup>^</sup>351→ins<sup>^</sup>g#, 350<sup>^</sup>351→ins<sup>^</sup>t# и t351→del(1nt)#) в области экзона II, приводящих к синтезу укороченной, нефункциональной версии белка. Линии характеризовались пятнистой, зелено-белой пигментацией листьев, изменениями времени инициации цветения и морфологических характеристик, а также снижением содержания каротиноидов и хлорофиллов в ткани листа. Продемонстрировано увеличение уровня транскриптов гена фитоинсинтазы *NtPSY2* у позднецветущих линий в сравнении с контролем. Редактированная линия L29 с самым поздним цветением характеризовалась существенным подъемом уровня транскриптов нижестоящих структурных генов каротиногенеза. Снижение содержания каротиноидов в листьях мозаично редактированных растений сопровождалось падением уровня экспрессии MADS-бокс гена *NtSEPI*, продукт которого предположительно участвует в регуляции транскрипции генов биосинтеза каротиноидов. Полученные данные могут быть использованы для дальнейших исследований регуляции биосинтеза каротиноидов и апокаротиноидов у Пасленовых культур.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, CRISPR-Cas9, биосинтез каротиноидов, фитоиндесатураза, экспрессия генов

**DOI:** 10.31857/S001533032360033X, **EDN:** CXCKHG

### ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды (пигменты различных оттенков желтого, оранжевого и красного) образуются *de novo* у фото- и хемосинтезирующих организмов: у некоторых видов бактерий, архей и грибов, а также у водорослей и растений; остальные организмы (включая животных и человека) каротиноиды не синтезируют, но потребляют с пищей и метаболизируют [1]. Для фотосинтезирующих организмов данные пигменты крайне важны как незаменимые участники фотосинтеза и фотозащиты. Каротиноиды собирают энергию света и осуществляют синглет-синглетную передачу энергии электронного возбуждения хлорофиллам. Одновременно они поглощают избыточную энергию хлорофиллов, защищая организм от неблагоприятного воздействия света высокой интенсивности. Нефотохими-

ческое тушение происходит при ферментативном преобразовании производных  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротинов, ксантофиллов (виолаксантин, антраксантин и эпоксид лютеина), в деэпоксидные ксантофиллы (зеаксантин и лютеин). Кроме того, образующиеся в процессе фотосинтеза активные формы кислорода нейтрализуются каротиноидами как антиоксидантами за счет физических и/или химических реакций [1, 2].

У растений блокировка синтеза каротиноидов приводит к нарушениям в работе фотосинтетического аппарата и защите от фотоингибирующего и оксидативного стрессов [3]. Более того, это отменяет образование  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротинов – основных источников фитогормонов стриголактонов и абсцизовой кислоты (АБК), необходимых для регуляции различных аспектов роста, развития и

стрессовой реакции организма [4, 5], равно как и витамина А в рационе человека и животных [6].

С учетом вышесказанного, нарушение синтеза каротиноидов может иметь критические последствия вплоть до гибели растения. К примеру, на этом основано действие хлорсодержащих отбеливающих гербицидов (таких как норфлуразон), которые приводят растение к гибели, ингибируя биосинтез каротиноидов [2, 7]. Гербицид действует на стадии первой десатурации, когда начинается преобразование предшественника каротиноидов (15-*цис*-фитоин) в окрашенный хромофор 9,15,9'-три-*цис*- $\zeta$ -каротина под действием фитоиндесатуразы (PDS; EC 1.3.5.5). Фермент катализирует симметричное введение первых двух из четырех двойных связей, необходимых для образования полностью транс-ликопина [2, 7]. Молекулы PDS собираются в каталитически активные гомотетрамеры, образующие гидрофобный туннель, который связывает 15-*цис*-фитоин (высоко гидрофобный субстрат) и пластохинон (косубстрат). Механизм действия гербицида связан с эффективностью его конкуренции с пластохиноном за сайт связывания в туннеле PDS-тетрамера [2]. Исследование PDS выявило несколько сайтов, мутации в которых препятствуют взаимодействию с карбонилем норфлуразона; введение таких мутаций обеспечивает устойчивость растения к хлорсодержащим гербицидам с сохранением биосинтеза каротиноидов [2].

Критичность корректной работы PDS продемонстрирована и для запасующих органов растения. Так, снижение уровня транскриптов *PDS* в плодах томата не только сокращает количество каротиноидов, но также приводит к падению экспрессии ключевого для созревания MADS-бокс гена *RIPENING INHIBITOR (RIN)* и генов, являющихся мишенями фактора транскрипции (ТФ) *RIN* [8]. Это может быть следствием прямого взаимодействия белков PDS и *RIN*, либо, под влиянием дефицита каротиноидов, роста синтеза других метаболитов (например, АБК) и белков, которые подавляют транскрипцию *RIN* [8]. В свою очередь, сверхэкспрессия *RIN* в растениях томата с мутацией *rin* приводит к повышению экспрессии *PDS* и накоплению каротиноидов [9]. Отметим, что среди подтвержденных мишеней ТФ *RIN* находятся многие гены каротиногенеза (*Phytoene synthase PSY1*, *15-cis-zeta-carotene-isomerase Z-ISO*, *Lycopene beta-cyclase LCY-b*, *Zeta-carotene desaturase ZDS*, *Carotenoid isomerase CriISO*) [10, 11].

То, что ингибирование активности PDS приводит к "отбеливанию" в норме зеленой фотосинтезирующей ткани, позволило исследователям использовать *PDS* как репортерный ген для оценки эффективности CRISPR-Cas9-редактирования генома растений [12, 13], а также для тестирования системы вирус-индуцированного подавления ге-

нов (VIGS) [14]. Транзистентное VIGS-замалчивание гена *PDS* с целью обесцвечивания хлорофилл-содержащих тканей существенно облегчает визуализацию флуоресценции слитых с GFP белков в листьях растений и представляет собой альтернативу конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [15]. PDS-эффект используется не только для отработки различных методов, но и в целях исследования различных аспектов развития и адаптации растения. Так, показано, что нарушение функции хлоропластов за счет подавления фитоиндесатуразы усиливает системное накопление переносимого тлей вируса в листьях *Nicotiana benthamiana* Domin [16].

В данном исследовании мы использовали систему CRISPR-Cas9 для выключения гена *PDS* в геноме *Nicotiana tabacum* L. с целью изучения защитного/адаптационного ответа растения путем изменения активности других генов пути каротиногенеза, а также MADS-бокс генов, кодирующих гомологи ТФ *RIN*. Нами были получены независимые трансгенные линии, химерные по нокауту *PDS* за счет однобуквенных вставок/делений (со сбивкой рамки считывания) в экзоне II гена. Выключение гена приводило к нарушениям фенофаз и других морфологических характеристик растения, а также вызывало альбиносность листовой ткани, снижение содержания каротиноидов и хлорофиллов. У редактированных линий наблюдалось падение уровня экспрессии гена *PDS* и рост экспрессии других генов каротиногенеза (*PSY2*, *ZISO*, *CRTISO*, *CrtBI*, *LCYE*, *NSY* и *VDE*). Значительные изменения наблюдались в уровне экспрессии стресс-чувствительных генов, кодирующих MADS-доменные факторы транскрипции (*N. tabacum AGL8*, *MADS23*, *SEP1*, *SEP2* и *SEP3*). Полученные результаты подчеркивают важную роль фермента PDS в метаболизме каротиноидов, фотосинтезе и фотозащите у табака, а также предполагают возможное опосредованное участие PDS в регуляции стресс-чувствительных MADS-бокс генов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** Объектом исследования стал табак *N. tabacum* L. сорт Samsun. Для получения стерильной культуры *in vitro* семена тепличных растений стерилизовали в парах хлора. Открытые микропробирки с семенами (~10–20 мг) помещали в стеклянный эксикатор над емкостью с 50–100 мл хлорсодержащего моющего средства (типа "Доместос") с добавлением 2–3 мл концентрированной HCl. Эксикатор плотно закрывали крышкой и оставляли на 2 ч, после чего семена помещали на чашки Петри с агаризованной (0.7%) средой MS (Murashige and Skoog basal nutrient medium including vitamins; M5519, Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 г/л сахарозы (S9378; Sigma-Aldrich). Проростки переносили в 0.5 л пла-

стикковые контейнеры с той же средой и выращивали *in vitro* в климатической камере в условиях длинного фотопериода (16 ч день/8 ч ночь, 21°C) в течение 3–4 недель до фазы 5–7 листа.

**Конструкция для CRISPR-Cas9 редактирования.** С целью выявления наиболее консервативных участков гена *PDS* (*N. tabacum* NCBI Gene ID LOC107816873) кДНК гена сравнивали с гомологичными последовательностями видов табака (*N. attenuata* LOC109223965; *N. tomentosiformis* LOC104107035; *N. sylvestris* LOC104248773; *N. benthamiana* LC543533.1) и *Cyanobacteria bacterium* J055 (RFHR01000124.1). Область 5'-конца гена, включавшую два первых экзона *NtPDS* (360 нуклеотидов от АТГ-кодона), использовали для подбора направляющей (guid; g) РНК с помощью web-программ CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp>) и CRISPR MultiTargeter ([http://www.multicrispr.net/basic\\_input.html](http://www.multicrispr.net/basic_input.html)).

Конструкцию (для CRISPR/Cas9-введения случайных мутаций в кодирующую последовательность *NtPDS*, соответствующую выбранной гРНК) собирали на основе бинарного вектора p201N\_Cas9 (AddGene, Watertown, MA, США; кат. № 59175; <https://www.addgene.org/>) в соответствии с протоколом ([https://media.addgene.org/data/plasmids/47/47024/47024-attachment\\_rNUYUYROwjZ.pdf](https://media.addgene.org/data/plasmids/47/47024/47024-attachment_rNUYUYROwjZ.pdf)) [17]. Т-область вектора включала ген *Cas9* (под двойным промотором CaMV35S), ген *NPTII* (устойчивость к канамицину; для селекции трансгенных растений) и сайт *I-PpoI* для клонирования кассеты экспрессии гРНК (управляемой промотором *U6.6 Medicago truncatula*), предварительно собранной в челночном векторе pUC\_gРНК (AddGene Кат. № 47024) [17]. Корректность сборки плазмиды p201N-*NtPDS*-gRNA проверяли методами ПЦР и рестрикции согласно [17] и использовали для трансформации штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Агробактерию, содержащую пустой вектор p201N, применяли для трансформации растений в качестве контроля.

**Трансформация растений табака.** Для трансформации использовали экспланты культуры *in vitro* табака (нарезанные секторами (~0.5 × 0.5 см) пластины верхних листьев с предварительно удаленными жилками).

Суспензию агробактерии для инфицирования эксплантов получали из свежей культуры агробактерии, выращенной в течение ночи (+28°C, 150 г/мл) в 5 мл жидкой среды LB, содержащей рифампицин (Rif, 12.5–25.0 мг/л) и канамицин (Km, 100 мг/л). Культуру центрифугировали (1500 g, 10 мин), осадок суспендировали в 20 мл жидкой среды А2 (MS, 3% сахараза; рН 5.5) в стерильной чашке Петри, где замачивали экспланты (40 мин в темноте; верхней поверхностью листа вверх) в суспензии агробактерии (p201N – контроль; содержащие плазмиду p201N-*NtPDS*-gRNA – опыт).

Инфицированные экспланты просушивали с помощью фильтровальной бумаги, выкладывали верхней стороной листа вниз на чашки Петри с агаризованной (0.7%) средой А2 и выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 2 сут. Далее экспланты отмывали от агробактерии (15 мин в жидкой А2 среде, содержащей карбенициллин (Cb) 500 мг/л), просушивали на фильтровальной бумаге и помещали на чашки с агаризованной (0.7%) средой А3 (MS, 2% глюкоза, 0.1 мг/л NAA (1-Naphthaleneacetic acid), 1 мг/л ВАР (6-Benzylaminopurine), Km 100 мг/л и Cb 500 мг/л). Раз в две недели экспланты перекладывали на свежую среду А3. Образующиеся побеги срезали с каллуса, укореняли на среде А3 без ВАР, адаптировали к грунту и тепличным условиям.

**Анализ целевого участка гена *NtPDS*.** Геномную ДНК экстрагировали из целого листа каждой трансгенной линии T<sub>0</sub> с использованием набора ZR-96 Plant/Seed DNA Kit (Zymo Research, США). Область 178 п. н. гена *NtPDS*, содержащую целевой сайт гРНК, амплифицировали методом ПЦР с использованием праймеров PDS2exF и PDS3exR (табл. 1) при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95°C, 35 циклов (30 с при 95°C, 30 с при 59°C, 1 мин при 72°C), 10 мин при 72°C. Продукты ПЦР ожидаемого размера выделяли из агарозного геля с помощью набора QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия), клонировали в вектор pGEM®-T Easy (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, США) и секвенировали на секвенаторе ДНК ABI Prism 377 (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности ДНК анализировали на возможные полиморфизмы с помощью программы MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>).

**Анализ экспрессии генов.** Для анализа использовали ткань верхушечных листьев побега, достигшего фазы развития 8–10 листьев. Из ткани листа (~0.2–0.5 г), предварительно измельченной растиранием в ступке в жидком азоте, выделяли суммарную РНК с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Германия). Удалив возможные примеси геномной ДНК (RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия), препарат анализировали на качество (электрофорез в 1.5% агарозном геле) и использовали для синтеза (с праймером oligo-dT) первой цепи кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Концентрации РНК и кДНК измеряли флуориметрически (Qubit® Fluorometer, Thermo Fisher Scientific).

Количественную ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) проводили в двух биологических и трех технических повторах на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием 3.0 нг кДНК, генспецифических праймеров (табл. 1) и смеси SYBR Green RT-PCR (Синтол, Россия) при следующих

Таблица 1. Последовательности праймеров

Ген <i>N. tabacum</i> (NCBI ID)	Последовательность (5' → 3')
Аmplification редактируемой области гена <i>NiPDS</i>	
<i>NiPDS</i> (LOC107816873)	TGCATTGATTATCCAAGACCAG GTTTGTGACCAGCATCTGC
РВ-ПЦР	
<i>NiPDS</i> (LOC107816873)	GCTCTTCCTGCGCCATTAATG CTTGCTTTCTCATCCAGTCCTT
<i>NiPSY2</i> (LOC107772713; LOC107761716)	AACTGGACTCTGCTAGTAGATG GCACAAGAGATTTTGCATAAGCA
<i>NiZDS</i> (LOC107772271)	CAGCAGATACGTGATTTGGAT ACAGTCAATGAATCCAAGAGCA
<i>NiCRTISO</i> (LOC107832559; LOC107791326)	ATGAAGCAAAGAAAGAGCTTGT GCAAGGTATCGTCTATGTGTCT
<i>NiCrrRB1</i> (LOC107809222; LOC107822278)	ACTATGGTTTCTCCATAAAGGCCT GCGGCCACCTTCCTTAAATAAG
<i>NiVDE</i> (LOC107780507; LOC107763628)	CCTGACGAAACGGAATGTCAG AGTCACCAACATCAGATTTACGA
<i>NiWUS</i> ( <i>NiWUSCHEL-like</i> [LOC107796712; LOC107812471; MG843891.1; JQ686923.1])	CTTCTCATGGTGTACTGGCC CAGTTCCTCATAATCGTCTACTAG
<i>NiSEP1</i> ( <i>SEPALLATA 1-like</i> [LOC107776641; LOC107789627]; гомолог гена <i>Arabidopsis SEPALLATA 1</i> )	GCAACATGCTCAATCTCAGG TTGGGCATTTGTTACTGCTG
<i>NiSEP2</i> ( <i>NiMADS6-like</i> [LOC107821033; LOC107818774]; гомолог генов <i>Arabidopsis AGL6</i> и <i>SEPALLATA 2</i> )	AATAATGGCGGAACAGATGG TGGATCAGGTTCCACATTTCCA
<i>NiSEP3</i> (LOC107773468; LOC107764357; JQ686934.1; гомолог гена <i>Arabidopsis AGL9</i> )	TCACTTGAGAGGCAGCTTGA CATCGCCCTGAGTTTGAGTT
<i>NiAGL8</i> (LOC107777773; гомолог гена <i>Arabidopsis AGL8</i> [836212])	ATCAGTGGGATCAGCAGAACCA ACCTCCTCCACTTCTCCATTATC
<i>NiMADS23-like</i> (LOC107825287; гомолог генов <i>S. tuberosum MADS23-like</i> [LOC102593715] и <i>Arabidopsis ANR1</i> [LOC9321977]) <i>actin-7</i> (LOC107831145)	CAATTGGCAACTCCAACCTTCTGAG CGTCCCTTCTTACACGAACACCA ACAGTGTCTGGATTGGAGGATC GAAGCACTTCTGTGGACAATG

условиях: исходная денатурация 5 мин при 95°C, далее 40 циклов (15 с при 95°C; 40 с при 60°C). Полученные данные нормализовали по экспрессии референсного гена *Nicotiana tabacum Actin-7* (LOC107831145) [18].

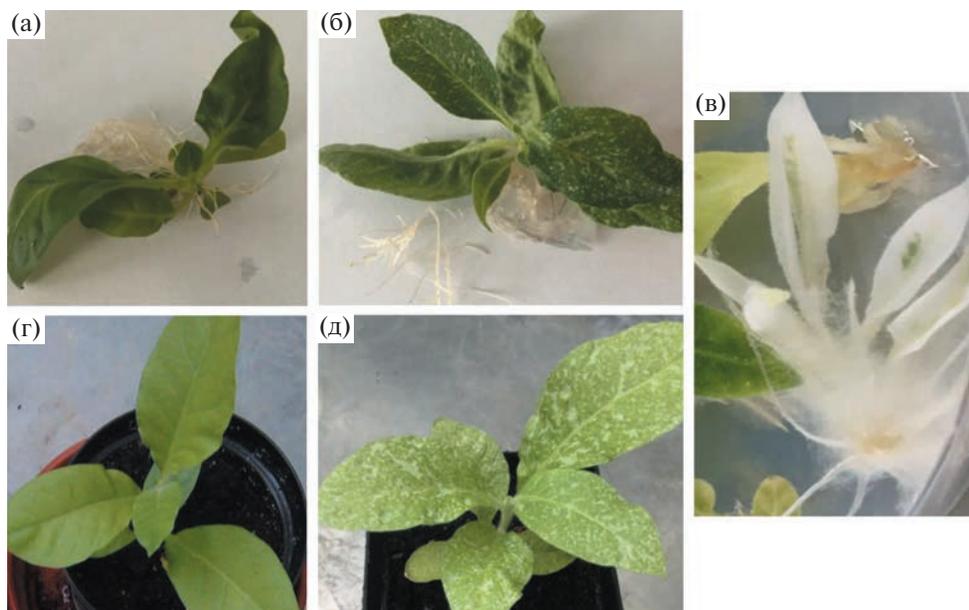
**Анализ содержания каротиноидов, хлорофиллов и антоцианов.** В ткани листа трансгенных/редактированных и контрольных растений измеряли количество (мг/г сырого веса) хлорофиллов (*a* и *b*), каротиноидов (сумма) и антоцианов (сумма) согласно [19]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия).

**Структурный и статистический анализ.** Для сопоставляющей работе структурного анализа последовательностей ДНК и белка использовали программы NCBI-BLAST и NCBI-CDD (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Статистическую обработку экс-

прессионных и биохимических данных проводили с помощью программы Graph Pad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>, США). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) на основе двух биологических и трех технических повторов. Для оценки различий применяли критерий Стьюдента;  $P < 0.01$  считали показателем статистической значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Трансгенные линии табака *N. tabacum* с редактированным геном *NiPDS*.** Для редактирования гена *NiPDS* в качестве gPHK была выбрана последовательность 5'-GAGATTGTTATTGCTGGTGCAGG-3' (в положении 334–356 п. н. от ATG-кодона, кДНК, конец экзона II). Была собрана плазмидная конструкция p201N-*NiPDS*-gRNA и введена в штамм *A. tumefaciens* LBA4404, который был ис-



**Рис. 1.** Трансгенные растения табака *N. tabacum* с мозаично нокаутированным геном фитоиндесатуразы *NtPDS* (б, в, д) в сравнении с нетрансгенным контролем (а, г).

пользован для трансформации листовых эксплантов табака сорта Samsun.

В качестве контроля использовали нетрансгенные растения (WT) и растения, трансформированные пустым вектором (p201N). Каких-либо морфологических отличий от WT-контроля растения p201N не имели. В сравнении с WT, укоренившиеся на канамицине регенеранты T<sub>0</sub> *NtPDS*-gRNA имели измененную в разной степени окраску листа — от полностью белой (такие регенеранты погибли после образования корней и первых истинных листьев) до зеленой. Из полученных 27 жизнеспособных трансгенных (укоренившихся, канамицин-резистентных) линий 18 формировали зеленые листья, и девять — мозаично альбиносные (зеленые с белыми пятнами) (рис. 1). Цветки всех трансгенных линий не имели каких-либо заметных фенотипических отклонений.

Полученные трансгенные растения *NtPDS*-gRNA формировали две группы, характеризующиеся заметной мозаичной альбиносностью листьев (I) и ее отсутствием (II). В свою очередь, каждая группа делилась на три подгруппы: рано цветущие (A) (2 и 4 линии, соответственно), поздно цветущие (B) (4 и 1) и цветущие, как контроль (B) (3 и 10). Кроме того, трансгенные линии (I) и (II) отличались от нетрансгенного контроля нарушением ряда других морфологических параметров (табл. 2).

Так, в сравнении с WT, линии группы (I) формировали укороченный за счет сокращения междоузлий стебель и меньше цветков/коробочек (все три подгруппы A–B), а также меньше листьев

(A и B) и семян (B и B). Подгруппа B цвела раньше (в ~2 раза) и подгруппа B позже (в ~2.5 раза), чем WT (табл. 2).

Линии группы (II), несмотря на отсутствие визуально регистрируемой альбиносности листьев, характеризовались сходными с (I) изменениями в сравнении с WT, за исключением количества семян (вес семян на одну коробочку не отличался от контроля) (табл. 2).

Анализ целевого сайта *NtPDS* в геноме трансгенных линий (клонирование и секвенирование) обнаружил различные варианты мутаций (однонуклеотидные индели со сдвигом рамки считывания и замены (SNP)) в редактируемом участке гена. Было показано, что в группе (I) из 10 клонов каждой линии 10–20% содержат пять вариантов измененного аллеля *NtPDS*: SNPs 341t→c и 351t→c; индели t351→del(1nt)#, 350^351→ins^g# или 350^351→ins^t#. Анализ клонов, полученных для одного нежизнеспособного растения с почти полностью белыми листьями, показал вставку 350^351→ins^g# в 9 случаях из 10 секвенированных. В случае растений группы (II) среди 10 клонов каждой линии были обнаружены только варианты с SNPs (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, однонуклеотидные индели со сдвигом рамки считывания легко детектировались у линий табака группы (I), которые формировали мозаично обесцвеченные листья. У растений группы (II) индели не обнаружены. Учитывая аналогичные группе (I) отличия растений группы (II) от контроля, данный факт может быть связан с существенно меньшим количеством ре-

**Таблица 2.** Характеристики трансгенных растений табака в сравнении с нетрансгенным контролем.

Образец		Варианты аллеля <i>NtPDS</i>	Дни до цветения	Высота, см	Листья, шт.	Цветки, шт.	Коробочки, шт.	Вес семян, г
WT	Сроки цветения (vs. WT)	WT	122.50 ± 17.80	133.80 ± 15.20	40.80 ± 7.80	13.70 ± 5.60	11.10 ± 5.12	0.11 ± 0.05
Группа (I)	(А) Норма: L2, L16, L24	350 <sup>^</sup> 351→ins <sup>^</sup> g# 350 <sup>^</sup> 351→ins <sup>^</sup> t#	121.00 ± 15.00	83.33 ± 13.02	32.33 ± 2.33	5.00 ± 3.00	3.67 ± 2.12	0.11 ± 0.03
	(Б) Ранние: L3, L7	t351→del(1nt)#	61.50 ± 3.30	65.5 ± 4.50	36.5 ± 3.50	9.00 ± 3.00	6.50 ± 1.50	0.07 ± 0.01
	(В) Поздние: L13, L28–30	341t→c 351t→c	304.25 ± 94.56	86.00 ± 17.05	44.50 ± 11.50	6.00 ± 3.00	4.50 ± 2.50	0.08 ± 0.02
Группа (II)	(А) Норма: L1, L11, L14, L15, L17, L19, L20, L22, L26, L27	341t→c 351t→c Нет SNPs или инделей	117.75 ± 15.75	73.25 ± 13.75	28.25 ± 2.25	4.75 ± 3.75	4.00 ± 3.00	0.11 ± 0.04
	(Б) Ранние: L5, L18, L21, L23		65.30 ± 12.50	72.70 ± 9.50	26.70 ± 3.57	9.90 ± 3.50	7.30 ± 3.00	0.11 ± 0.03
	(В) Поздние: L12		297.00 ± 0.00	121.00 ± 0.00	42.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	0.12 ± 0.00

**Таблица 3.** Содержание пигментов в ткани листа контрольных и опытных (позднецветущих) растений

Растение*	Содержание пигментов (мг/г сырого веса)			
	сумма каротиноидов	хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>	сумма антоцианов
WT	0.142 ± 0.012	0.394 ± 0.024	0.169 ± 0.012	0.030 ± 0.004
L28	0.094 ± 0.021	0.263 ± 0.031	0.117 ± 0.017	0.024 ± 0.002
L29	0.095 ± 0.027	0.263 ± 0.035	0.119 ± 0.021	0.028 ± 0.002

Примечание: \* содержание каротиноидов и хлорофиллов в альбиносной ткани листа регенеранта (рис. 1в) носит следовый характер.

дактированных клеток и секвенированием числа клонов, недостаточного для обнаружения мутаций.

Структурный анализ редактированной последовательности *NtPDS* показал, что все три инделя приводят к сбою рамки считывания. Образуются преждевременные стоп-кодона и, как следствие, значительно укороченные и измененные на С-конце варианты белка: 154 (в случае 350<sup>^</sup>351→ins<sup>^</sup>g# и 350<sup>^</sup>351→ins<sup>^</sup>t#) и 144 (t351→del(1nt)#) аминокислотных (а. о.) остатка при корректном размере *NtPDS* 582 а. о. В случае инсерций первый преждевременный стоп-кодон образуется через 111 нуклеотидов после сбивки рамки считывания, и С-конец мутантного белка состоит из 37 некорректных а. о. остатков [CRSGWFVYSKISGRCWSQTAIAG-GKRCPRWKGSCMER]. При делеции неправильный С-конец формируется из 27 а. о. [QVWV-VCLQQNIWQMLVTRNRYCWRQEMS].

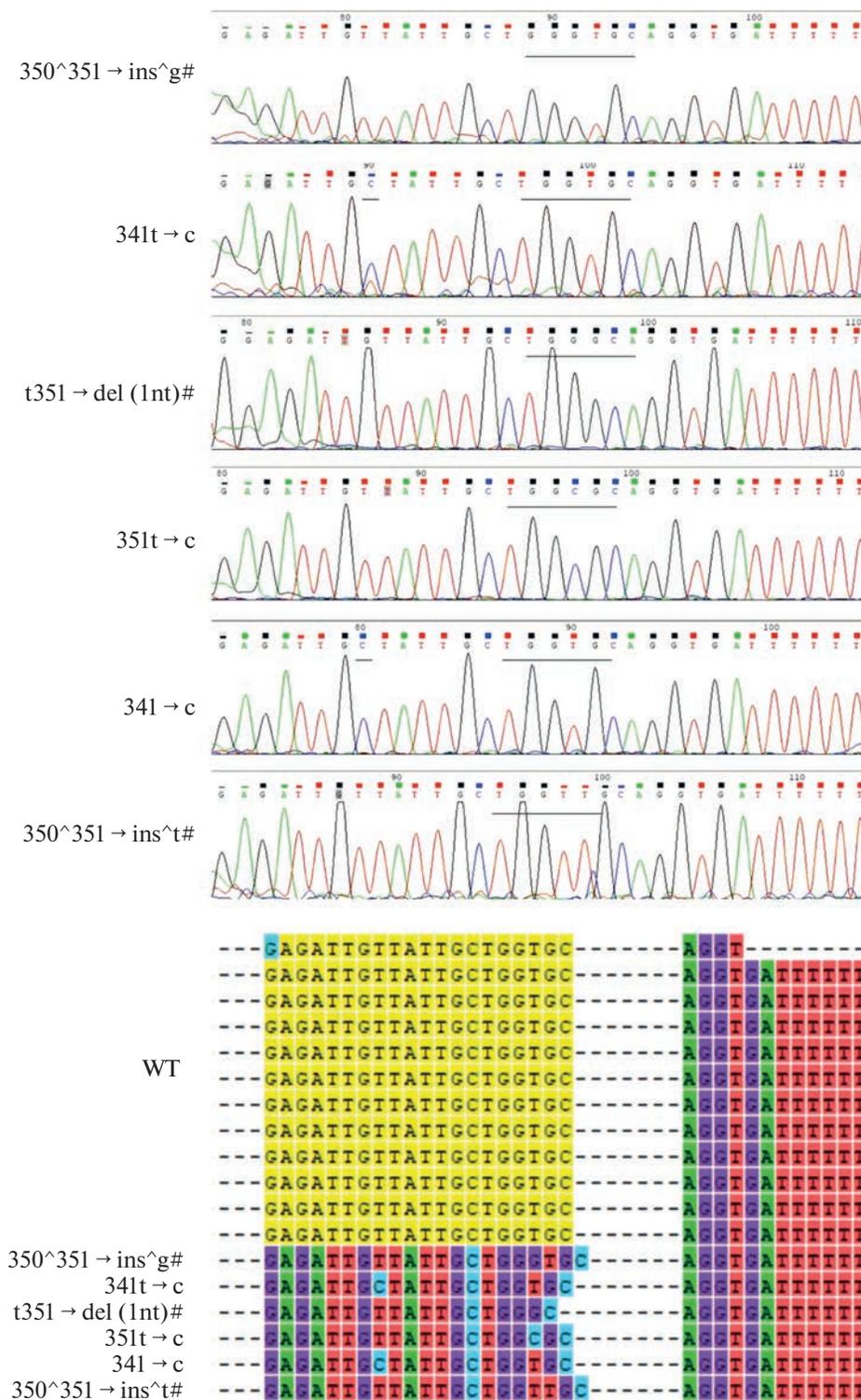
Среди обнаруженных SNPs, один (t351→c) является синонимичным, тогда как второй (t341→c) приводит к нейтральному замещению V114→A в N-концевой области функционального домена PLN02612 (расположен на участке 21–578 а. о. белка *NtPDS*).

**Содержание пигментов в линиях табака дикого типа и трансгенных/редактированных линиях.** Воздействие инделей в последовательности гена фитоинсинтазы *NtPDS* на морфологию растений,

включая пигментацию фотосинтезирующей ткани, предполагает нарушение биосинтеза каротиноидов. Для оценки такой возможности был проведен сравнительный анализ содержания каротиноидов (сумма), хлорофиллов (*a* и *b*) и антоцианов (сумма) в листьях табака дикого типа (WT) и двух трансгенных поздних линий L28 и L29 из группы (I). Кроме фенотипического проявления нокаута *NtPDS*, выбор линий основывался на значительном их отличии от контроля по времени инициации цветения: 346 (L28) и 461 (L29) день против 122 дней в случае WT.

В результате было показано, что в сравнении с контролем количество как каротиноидов, так и хлорофиллов в редактированных линиях уменьшилось в среднем в ~1.5 раза, тогда как содержание антоцианов не изменилось (табл. 3).

**Экспрессия генов, связанных с биосинтезом каротиноидов, в листьях табака дикого типа и трансгенных/редактированных линий.** Известно, что количество субстрата и/или продукта метаболических путей влияет на экспрессию соответствующих генов [8, 20]. С учетом химерности редактирования полученных линий L28 и L29 мы проверили, во-первых, уровень транскриптов полноразмерного гена *NtPDS*, и, во-вторых, как влияет изменение его экспрессии, а также содержания каротиноидов, на экс-

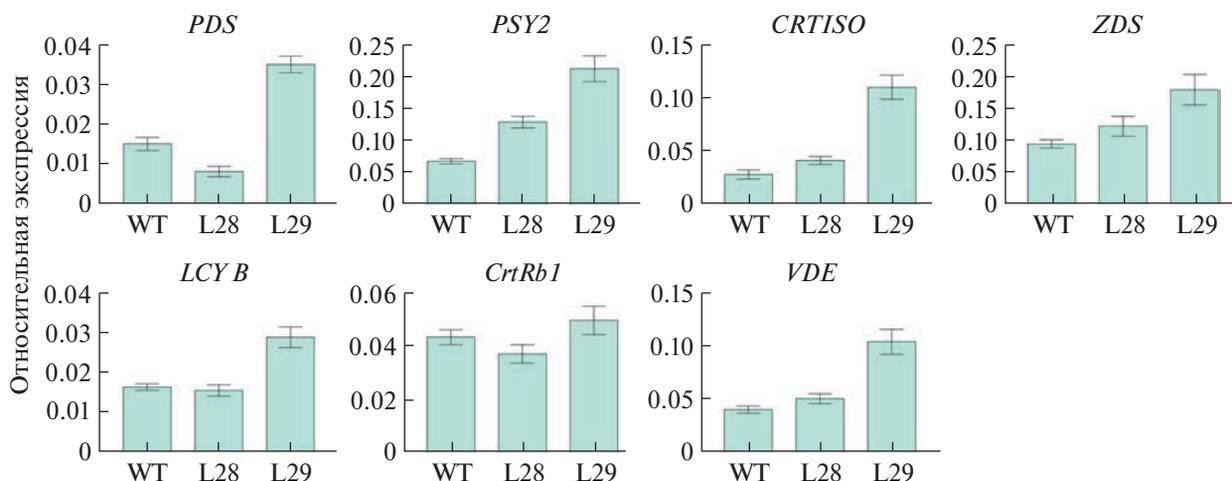


**Рис. 2.** Результаты секвенирования (сверху) и выравнивания (снизу) целевого сайта гена фитиндесатуразы *NtPDS* с указанием обнаруженных полиморфизмов (замены и индели даны в соответствии с табл. 2).

прессию генов *NtPSY2*, *NtCrtISO*, *NtZDS*, *NtLCYB*, *NtCrtRB1* и *NtVDE* в листьях WT, L28 и L29.

Результаты показали, что в сравнении с WT уровень транскриптов *NtPDS* снизился в ~2.0 раза

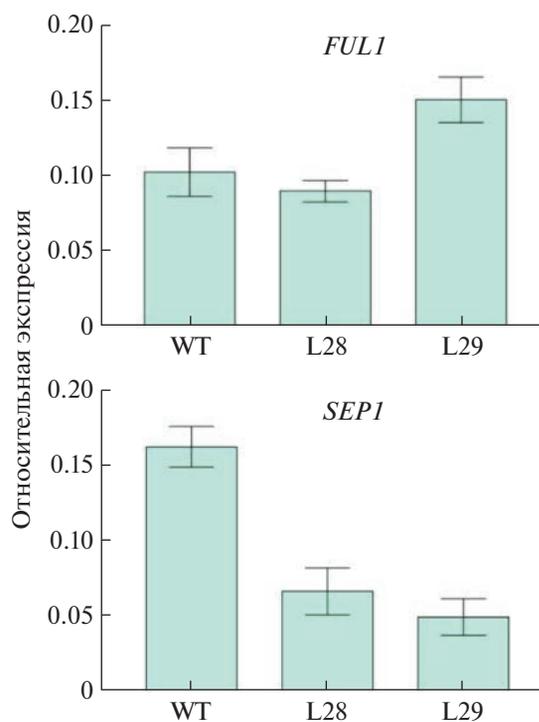
у линии L28 и поднялся в ~2.2 раза у L29, тогда как экспрессия *NtCrtRB1* у обеих линий L28 и L29 не изменилась. Уровень транскриптов остальных анализируемых генов существенно вырос у линии



**Рис. 3.** Экспрессия структурных генов пути биосинтеза каротиноидов *NtPDS*, *NtPSY2*, *NtCrtISO*, *NtZDS*, *NtLCYB*, *NtCrtRb1* и *NtVDE* в листьях контрольного нетрансгенного растения (WT) и поздноцветущих мозаично редактированных линий L28 и L29. \*  $P < 0.01$  – статистически значимое различие от значений WT-контроля.

L29: в ~1.7 (*NtLCYB*), ~4.0 (*NtCrtISO*), ~2.9 (*NtPSY2*), ~1.9 (*NtZDS*) и ~2.6 (*NtVDE*) раз. В то же время в листьях L28 он остался неизменным, за исключением *NtPSY2*, экспрессия которого увеличилась в ~1.7 раза (рис. 3).

Таким образом, взаимосвязи между уровнями транскриптов *NtPDS* (суммарно неотредактированного и отредактированных), экспрессией нижестоящих генов каротиногенеза и содержанием каротиноидов в листе не наблюдалось.



**Рис. 4.** Экспрессия генов *NtSEP1* и *NtAGL8* (*FUL1*) в листьях контрольного нетрансгенного растения (WT) и поздноцветущих мозаично редактированных линий L28 и L29. \*  $P < 0.01$  – статистически значимое различие от значений WT-контроля.

**Экспрессия регуляторных MADS-box генов в листьях табака дикого типа и трансгенных/отредактированных линий.** Из исследований томата *Solanum lycopersicum* L. известно, что промотор многих структурных генов каротиногенеза содержит сайт связывания с MADS-доменными белками. В тканях плода томата транскрипция этих генов находится под контролем ТФ RIN (подсемейство SEPALLATA (*SEP*) MADS-доменных белков), и уровень экспрессии гена *RIN* взаимосвязан с содержанием каротиноидов [8, 21]. В вегетативной ткани, кроме *SEP*, в ответ на стресс активируются гены и других MADS-доменных ТФ (к примеру, гомологи *Arabidopsis thaliana* AGAMOUS-LIKE 8 (*AGL8*) и ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1 (*ANR1*)) [22, 23].

С учетом этих данных, мы провели оценку влияния изменений в каротиногенезе отредактированных растений на экспрессию MADS-box генов *NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3* (представлены 3 кланды подсемейства *SEP*), *NtAGL8* и *NtMADS23* (гомолог *ANR1*). В результате были обнаружены транскрипты *NtSEP1* и *NtAGL8*, тогда как остальные анализируемые гены не экспрессировались в листе растений WT, L28 или L29. При этом уровень транскриптов *NtSEP1* у L28 и L29 был более чем в 2 раза ниже, чем в контроле; *NtAGL8* экспрессировался у WT, L28 и L29 приблизительно на одном уровне (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Метаболизм каротиноидов регулируется в растении с помощью известного и хорошо охарактеризованного ферментативного механизма, в котором фитоиндесатураза *PDS* катализирует первую стадию модификации 15-*цис*-фитоина — предшественника всех каротиноидов [1, 24, 25]. Различные исследования показывают, что как подавление каталитической активности *PDS*, так и нокаут/замалчивание кодирующего его гена, критично для растения, поскольку приводит к нарушениям фотосинтеза, фотозащиты и гормонального баланса [2, 12–14]. Уровень экспрессии гена *PDS* напрямую связан с эффективностью каротиногенеза во всех тканях растения и количеством накапливаемых каротиноидов в запасающих органах [26].

В данном исследовании ген *PDS* был нокаутирован в геноме табака *N. tabacum* (сорт Samsun) с помощью CRISPR/Cas9-системы. Девять независимых трансгенных линий формировали листья со слабо пигментированными участками, мозаично локализованными на зеленом фоне (рис. 1б, д). Регенеранты с почти полным обесцвечиванием листьев (рис. 1в) были нежизнеспособными. Подобные изменения соответствовали ранее показанному фенотипу растений с отсутствием транскрипции гена *PDS* [14] или экспрессией нефункционального варианта белка *PDS* [12, 13].

Наблюдаемый паттерн пигментации наглядно свидетельствовал о мозаичности факта нокаутирования гена, что считается обычным при CRISPR/Cas9-редактировании с использованием агробактериальной трансформации растения [27]. Мозаичность способствовала выживанию регенерантов, в отличие от побегов с почти полностью белой тканью листа (рис. 1в), что еще раз подчеркивает критичность роли *PDS* для поддержания жизненно важных процессов в растении.

Предположительно лежащее в основе полученного фенотипа нарушение биосинтеза каротиноидов было подтверждено результатами биохимического и генетического анализа. Существенное сокращение количества каротиноидов в листовой ткани (табл. 3) согласовалось с присутствием однонуклеотидных инделей в экзоне II гена *PDS* (табл. 2, рис. 2), приводящих к синтезу коротких вариантов белка. По меньшей мере, их размер (144 или 154 а. о.) исключал формирование функционального гомотетрамера *PDS*. Так, на примере риса *Oryza sativa* показано, что *PDS*-гомодимеры в тетрамерном комплексе стабилизируются четырьмя водородными связями между Thr207, Trp216 и Arg220 одного мономера и карбонильными атомами кислорода Pro239, Leu235 и Gln263 соседнего мономера (то есть между а. о., расположенными после 200 а. о.) [2].

Таким образом, нефункциональные, нокаутированные версии *PDS* табака прекращали синтез

каротиноидов в самом начале пути, в результате чего в хлоропластах редактированных клеток отсутствовали ксантофиллы (непосредственные участники работы фотосинтетического аппарата и фотозащиты растения [1]), что, вероятно, нарушало функцию хлоропластов [15]. Более того, там отсутствовали побочные продукты каротиногенеза — фитогормоны АБК и стриголактоны, необходимые для регуляции различных аспектов развития [4, 5], что может объяснить другие (помимо мозаичной пигментации листа) отличия редактированных линий от контроля (табл. 2).

Экспрессионный анализ линий L28 и L29, отличающихся от WT-контроля и друг от друга серьезным сдвигом по времени инициации цветения (L28/L29/WT — 346/461/122 дней), обнаружил существенные изменения уровня транскриптов *NtPDS* и *NtPSY2* у обеих линий, и всех генов, кроме *NtCrtR1*, у линии L29 (наиболее поздней) (рис. 3). Серьезное отставание по цветению линий L28 и L29 от контроля могло быть отражением нарушений как фотосинтеза/фотозащиты (следствие дефицита ксантофиллов), так и физиологических процессов (следствие дефицита фитогормонов). К примеру, для апокаротиноида АБК показано как положительное, так и отрицательное воздействие на время цветения растения [28]. Рост уровня транскриптов почти всех генов каротиногенеза (рис. 3) сопровождается пониженным (в сравнении с WT) содержанием каротиноидов (табл. 3) в листьях линии L29. Это допускает влияние количества субстрата и/или продукта каротиногенеза на генную экспрессию, как это предполагается для различных метаболических путей [8, 20]. Повышенной экспрессии *NtPSY2* в нередитированных клетках линии L28 оказалось, вероятно, достаточно для обеспечения пороговых (для цветения) значений продуктов каротиноидного пути. Существенное отставание линии L29 не только от контроля, но и от линии L28, возможно потребовало активации не только гена фитоинсинтазы *NtPSY2*, но и других нижестоящих генов пути (рис. 3), в особенности *NtLCYB* и *NtVDE*, играющих критичные роли в биосинтезе ксантофиллов и, следовательно, фотосинтезе и фотозащите [1].

Поскольку время цветения (как и другие аспекты развития) связано с фотопериодом и фотосинтезом [29, 30], существенное изменение содержания каротиноидов является для растения стрессом. Таким образом, дифференциальная экспрессия генов каротиногенеза в ответ на мозаичный нокаут *NtPDS* может свидетельствовать о вынужденной адаптации растения к изменению содержания продуктов каротиноидного пути посредством компенсаторного увеличения их синтеза в нередитированных клетках.

Повышение уровня транскриптов генов каротиногенеза может происходить за счет активации

их регуляторов, какими, к примеру, могут быть MADS-доменные ТФ [10, 11]. Так, в плодах томата транскрипция гена *PDS* находится под контролем MADS-доменного ТФ *RIN*; экспрессия гена *RIN* прямо зависит либо от уровня транскриптов *PDS*, либо от содержания каротиноидов [8]. Ген *RIN* входит в подсемейство *SEP*, отдельные члены которого (*SEPI* и *SEPA*) транскрибируются не только в плодах, но и в листьях [31]. В подтверждение предполагаемых корреляций с содержанием каротиноидов [8], листья обеих проанализированных линий L28 и L29 отличались от WT существенным снижением уровня транскриптов *NtSEPI* (рис. 4). С учетом вышесказанного, а также роли MADS-доменных ТФ в АБК-опосредованном ответе растений на абиотические стрессы [22, 32, 33], дифференциальная экспрессия гена *NtSEPI* (рис. 4) предполагает его участие в регуляции биосинтеза каротиноидов в листьях табака (в том числе, в ответ на стрессы).

Таким образом, в данном исследовании мы нокаутировали ген фитоинсинтазы *NtPDS* в геноме табака *N. tabacum* с использованием системы CRISPR-Cas9 и проанализировали полученные трансгенные линии на содержание каротиноидов в совокупности с экспрессией структурных генов пути синтеза каротиноидов и, возможно, участвующих в их регуляции MADS-бок генов. Полученные результаты мозаичного редактирования гена свидетельствуют о том, что индели (350<sup>^</sup>351→ins<sup>^</sup>g#, 350<sup>^</sup>351→ins<sup>^</sup>t# и t351→del(1nt)#) в экзоне II гена *NtPDS* приводят к образованию нефункционального белка NtPDS, что изменяет метаболизм каротиноидов, время инициации цветения и морфологические характеристики растений табака. Дифференциальная экспрессия *NtSEPI* в контрольных нетрансгенных растениях и позднецветущих отредактированных линиях L28 и L29 предполагает участие ТФ *NtSEPI* в регуляции биосинтеза каротиноидов и побочных продуктов пути, в том числе в ответ на стресс.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-16-00016) и Министерства науки и высшего образования РФ. В работе использована экспериментальная установка искусственного климата (ЭУИК, Федерального исследовательского центра Биотехнологии Российской академии наук).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments // J. Nat. Med. 2020. V. 74. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
2. Brausemann A., Gemmecker S., Koschmieder J., Ghisla S., Beyer P., Einsle O. Structure of phytoene desaturase provides insights into herbicide binding and reaction mechanisms involved in carotene desaturation. Structure // 2017. V. 25. P. 1222. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.002>
3. Demmig-Adams B., Adams W.W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition // Science. 2002. V. 298. P. 2149. <https://doi.org/10.1126/science.1078002>
4. Chen K., Li G.J., Bressan R.A., Song C.P., Zhu J.K., Zhao Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants // J. Integr. Plant Biol. 2020. V. 62. P. 25. <https://doi.org/10.1111/jipb.12899>
5. Mashiguchi K., Seto Y., Yamaguchi S. Strigolactone biosynthesis, transport and perception // Plant J. 2021. V. 105. P. 335. <https://doi.org/10.1111/tpj.15059>
6. Babu R., Rojas N.P., Gao S., Yan J., Pixley K. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRBI* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations // Theor. Appl. Genet. 2013. V. 126. P. 389. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1987-3>
7. Wagner T., Windhövel U., Römer S. Bsnformation of tobacco with a mutated cyanobacterial phytoene desaturase gene confers resistance to bleaching herbicides // Z. Naturforsch. C. J. Biosci. 2002. V. 57. P. 671. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-7-821>
8. Naing A.H., Kyu S.Y., Pe P.P.W., Park K.I., Lee J.M., Lim K.B., Kim C.K. Silencing of the phytoene desaturase (*PDS*) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes // Plant Methods. 2019. V. 15: 110. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0491-z>
9. Dong T., Chen G., Tian S., Xie Q., Yin W., Zhang Y., Hu Z. A non-climacteric fruit gene *CaMADS-RIN* regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit // PLoS One. 2014. V. 9: e95559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095559>
10. Fujisawa M., Nakano T., Ito Y. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator *RIN* by chromatin immunoprecipitation // BMC Plant Biol. 2011. V. 11: 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-26>
11. Li S., Xu H., Ju Z., Cao D., Zhu H., Fu D., Grierson D., Qin G., Luo Y., Zhu B. The *RIN-MC* fusion of MADS-box transcription factors has transcriptional activity and modulates expression of many ripening genes // Plant Physiol. 2018. V. 176. P. 891. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01449>
12. Chen L., Li W., Katin-Grazzini L., Ding J., Gu X., Li Y., Gu T., Wang R., Lin X., Deng Z., McAvoy R.J., Gmitter F.G., Deng Z., Zhao Y., Li Y. A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants // Hortic. Res. 2018. V. 5: 13. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0023-4>
13. Bánfalvi Z., Csákvári E., Villányi V., Kondrák M. Generation of transgene-free *PDS* mutants in potato by *Agrobacterium*-mediated transformation // BMC Biotechnol. 2020. V. 20: 25. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00621-2>

14. Xu H., Xu L., Yang P., Cao Y., Tang Y., He G., Yuan S., Ming J. Tobacco rattle virus-induced *PHYTOENE DESATURASE (PDS)* and Mg-chelatase H subunit (*ChlH*) gene silencing in *Solanum pseudocapsicum* L. // PeerJ. 2018. V. 6: e4424. <https://doi.org/10.7717/peerj.4424>
15. Zhang L., Gase K., Baldwin I., Gális I. Enhanced fluorescence imaging in chlorophyll-suppressed tobacco tissues using virus-induced gene silencing of the phytoene desaturase gene // Biotechniques. 2010. V. 48. P. 125. <https://doi.org/10.2144/000113345>
16. DeBlasio S.L., Rebelo A.R., Parks K., Gray S.M., Heck M.C. Disruption of chloroplast function through downregulation of phytoene desaturase enhances the systemic accumulation of an aphid-borne, phloem-restricted virus // Mol. Plant Microbe Interact. 2018. V. 31. P. 1095. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0057-R>
17. Jacobs T.B., LaFayette P.R., Schmitz R.J., Parrott W.A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 // BMC Biotechnology. 2015. V. 15: 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>
18. Nezhdanova A.V., Slugina M.A., Dyachenko E.A., Kamioninskaya A.M., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Analysis of the structure and function of the tomato *Solanum lycopersicum* L. MADS-box gene *SIMADS5* // Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii. 2021. V. 25. P. 492. <https://doi.org/10.18699/VJ21.056>
19. Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes // Russian Journal of Plant Physiology. 2020. V. 67. P. 1054. <https://doi.org/10.1134/S1021443720050040>
20. Meugnier E., Rome S., Vidal H. Regulation of gene expression by glucose // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2007. V. 10. P. 518. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3281298fef>
21. Slugina M.A. Transcription factor RIPENING INHIBITOR and its homologs in regulation of fleshy fruit ripening of various plant species // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. P. 783. <https://doi.org/10.1134/S1021443721050186>
22. Castelán-Muñoz N., Herrera J., Cajero-Sánchez W., Arribubieta M., Trejo C., García-Ponce B., Sánchez M.P., Álvarez-Buylla E.R., Garay-Arroyo A. MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 853. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00853>
23. Zhang Y., Cai W., Wang A., Huang X., Zheng X., Liu Q., Cheng X., Wan M., Lv J., Guan D., Yang S., He S. MADS-box protein AGL8 interacts with chromatin-remodeling component SWC4 to activate thermotolerance and environment-dependent immunity in pepper // J. Exp. Bot. 2023. erad092. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad092>
24. Cazzonelli C.I., Pogson B.J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 266. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
25. Quian-Ulloa R., Stange C. Carotenoid Biosynthesis and Plastid Development in Plants: The Role of Light // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22: 1184. <https://doi.org/10.3390/ijms22031184>
26. Yan P., Gao X.Z., Shen W.T., Zhou P. Cloning and expression analysis of phytoene desaturase and  $\zeta$ -carotene desaturase genes in *Carica papaya* // Mol. Biol. Rep. 2011. V. 38. P. 785. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0167-2>
27. Cui Y., Zhao J., Gao Y., Zhao R., Zhang J., Kong L. Efficient multi-sites genome editing and plant regeneration via somatic embryogenesis in *Picea glauca* // Front. Plant Sci. 2021. V. 12: 751891. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.751891>
28. Shu K., Luo X., Meng Y., Yang W. Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition // Plant Cell Physiol. 2018. V. 59. P. 215. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy007>
29. Song Y.H., Ito S., Imaizumi T. Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves // Trends Plant Sci. 2013. V. 18. P. 575. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.003>
30. Yang G., Li W., Fan C., Liu M., Liu J., Liang W., Wang L., Di S., Fang C., Li H., Ding G., Bi Y., Lai Y. Genome-wide association study uncovers major genetic loci associated with flowering time in response to active accumulated temperature in wild soybean population // BMC Genomics. 2022. V. 23: 749. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08970-2>
31. Parenicová L., de Folter S., Kieffer M., Horner D.S., Favalli C., Busscher J., Cook H.E., Ingram R.M., Kater M.M., Davies B., Angenent G.C., Colombo L. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1538. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>
32. Li X., Yu B., Wu Q., Min Q., Zeng R., Xie Z., Huang J. OsMADS23 phosphorylated by SAPK9 confers drought and salt tolerance by regulating ABA biosynthesis in rice // PLoS Genet. 2021. V. 17: e1009699. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009699>
33. Zhao P.X., Zhang J., Chen S.Y., Wu J., Xia J.Q., Sun L.Q., Ma S.S., Xiang C.B. Arabidopsis MADS-box factor AGL16 is a negative regulator of plant response to salt stress by downregulating salt-responsive genes // New Phytol. 2021. V. 232. P. 2418. <https://doi.org/10.1111/nph.17760>

## ОБРАЗОВАНИЕ КОЛЕТЕР НА ЛИСТЬЯХ МИКРОКЛОНОВ БАТАТА (*Ipomoea batatas* L.) В УСЛОВИЯХ *in vitro*

© 2023 г. Р. Н. Киракосян<sup>а, \*</sup>, Я. Ю. Голиванов<sup>а, б</sup>, В. И. Трухачев<sup>а</sup>, С. М. Зайцева<sup>а</sup>,  
М. Р. Халилуев<sup>б</sup>, Е. Н. Баранова<sup>б, с</sup>, Е. А. Калашникова<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева”, Москва, Россия

<sup>б</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский  
институт сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, Россия

<sup>с</sup> Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: mia41291@mail.ru

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 28.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Получены микроклоны *in vitro* овощного батата (*Ipomoea batatas* L.) и исследовано образование колетер на их листьях. Исследования проводили на трех сортах батата, отличающихся цветом мякоти и кожурой клубнеплодов, а также разными сроками созревания – Пурпл, Jewel и Мускатный. Изучено влияние ½ нормы минеральных солей МС, 1 нормы МС и 1½ нормы МС на морфометрические показатели микроклонов батата. Установлено, что применение ½ нормы минеральных солей по МС приводило к получению быстро растущих пазушных и адвентивных побегов и формированию мощной корневой системы в базальной части микрочеренков. Впервые на листьях микроклонов батата при введении и выращивании в культуре *in vitro* обнаружено образование секреторных выростов. Новообразования были отнесены к колетерам и дана их характеристика. Показана зависимость образования колетер на листьях микроклонов от циклов культивирования.

**Ключевые слова:** *Ipomoea batatas*, микроклоны, минеральный состав питательной среды, колетеры  
**DOI:** 10.31857/S0015330323600201, **EDN:** CWCXWX

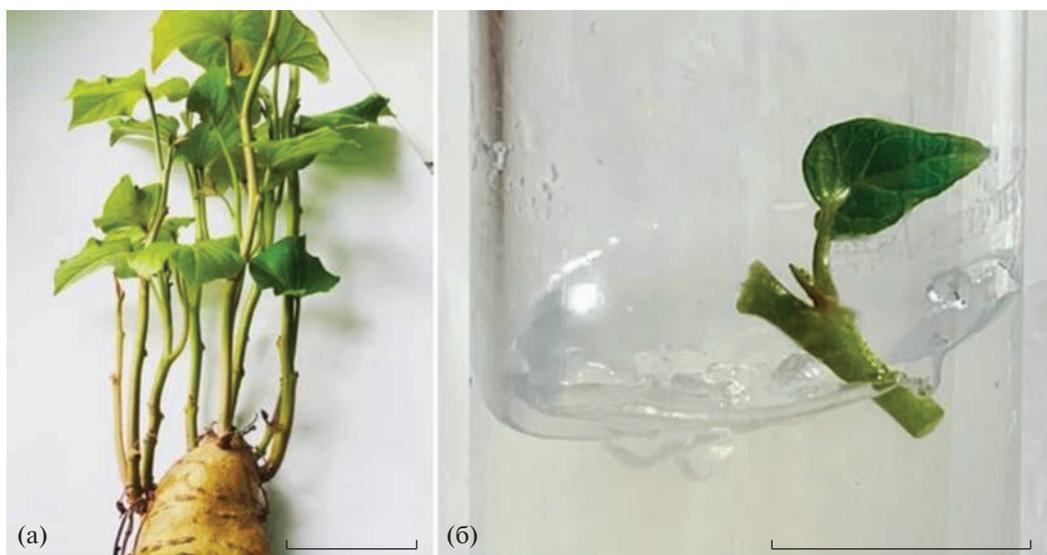
### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время все чаще говорят о ценной сельскохозяйственной культуре – батате, или сладком картофеле (*Ipomoea batatas* L.). Интерес к ней связан, прежде всего, с тем, что батат является источником минералов, витаминов, антиоксидантов, а также инулина и бета-каротина – предшественника витамина А [1]. Благодаря содержанию в клубнях различных компонентов, овощной батат диетологи считают более ценным продуктом, чем картофель. Он менее калориен, обладает низким гликемическим индексом, а значит, не влияет на уровень сахара в организме. Поэтому овощной батат смело можно использовать диабетикам в своем рационе. Одно из достоинств батата – это накопление в клубнях природного полисахарида инулина, который является хорошим иммуномодулятором, очищает организм от токсинов, радионуклидов и “плохого” холестерина [2].

Основной способ размножения *I. batatas* – вегетативный, однако при этом часто происходит передача вирусов от растения-донора к новому посадочному материалу. Решить данную проблему

можно с использованием биотехнологии, в частности, метода клонального микроразмножения [3, 4]. Для расширения ареала возделывания батата в Российской Федерации это направление исследований приобретает особое значение при создании новых сортов, обладающих устойчивостью к низким положительным температурам. Поэтому разработка эффективных методов размножения батата *in vitro* является актуальной проблемой.

Для повышения эффективности производства, снижения материальных затрат, а также улучшения качества микроклонов необходимо проводить оптимизацию технологии клонального микроразмножения на каждом этапе. Известно, что первый этап технологии предусматривает получение не только стерильной культуры первичных эксплантов, но и дифференцировку культивируемых клеток и тканей, реализацию их морфогенетического потенциала и получение хорошо растущей культуры *in vitro*. При переводе изолированных органов растений из условий *in vivo* в условия *in vitro*, они претерпевают стресс, который может проявляться в изменении морфологи-



**Рис. 1.** Внешний вид проросших клубнеплодов батата (а) и черенки для культивирования *in vitro* (б). Масштабная линейка – 1 см.

зиологических показателей. Известно, например, что для некоторых представителей семейства *Latiaceae* характерно образование железистых волосков на листьях или почках как в естественных условиях произрастания, так и в культуре *in vitro*. Они защищают данные органы от стрессового воздействия факторов условий культивирования за счет секреторных выделений [5, 6]. Что касается батата, то в настоящее время аспекты образования железистых волосков на его листьях при изменении условий культивирования плохо изучены.

Цель работы – изучение образования железистых волосков на листьях микроклонов батата в культуре *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали три сорта овощного батата *Ipomoea batatas* L., отличающихся цветом мякоти и кожурой клубнеплодов, а также разными сроками созревания – Пурпл (ранний, фиолетовый), Jewel (среднеранний, оранжевый) и Мускатный (среднепоздний, белый). Первичным эксплантом служили черенки, содержащие одну пазушную почку, изолированные с проросших клубнеплодов батата (рис. 1). Перед введением в культуру *in vitro* клубнеплоды помещали во влажный почвенный субстрат для активации роста спящих меристем. Формирование побегов из почек начиналось уже на седьмые сутки, а на 21 сут наблюдалось образование хорошо развитых побегов (рис. 1а), с которых мы нарезали первичные экспланты (рис. 1б).

Перед введением в культуру *in vitro* первичные экспланты подвергали поверхностной стерилизации 0.1% раствором сулемы ( $HgCl_2$ ) в течение 10 мин, после чего их промывали трижды стерильной дистиллированной водой и помещали в биологические пробирки на агаризованную МС-среду [7] без добавления регуляторов роста. Во всех вариантах питательной среды рН доводили до 5.6–5.8 перед автоклавированием. Биологические пробирки с растительным материалом помещали на стеллажи под белые линейно-люминесцентные лампы (OSRAM AG, Osram GmbH, Германия) с интенсивностью освещения 150 мкмоль/м<sup>2</sup> с и культивировали при температуре  $23 \pm 1^\circ C$  и 16-часовом световом дне.

Изучали влияние минеральных солей в концентрации  $\frac{1}{2}$  нормы МС, 1 МС и 1  $\frac{1}{2}$  МС на морфофизиологические показатели сформировавшихся микропобегов. Каждые шесть недель микроклоны пересаживали на свежую питательную среду, предварительно разделив их на микрочеренки, содержащие одну пазушную почку. При этом учитывали биометрические и морфологические показатели микропобегов. Все работы по стерилизации первичных эксплантов, введению в культуру *in vitro*, изучению морфогенетического потенциала проводили в асептических условиях ламинарного бокса (BIOBASE BBS-H1800(X), КНР).

Для изучения колетер использовали методы световой, стереоскопической и сканирующей микроскопии. Исследования с использованием светового и стереоскопического микроскопа проводили на временных препаратах, которые готовили по стандартной методике. Листья изолировали с



Рис. 2. Батат (сорт Jewel) *in vitro* на 7 сут (а), 14 сут (б), 30 сут (в). Масштабная линейка – 1 см.

30-суточных микроклонов батата с разных положений на стебле. Лист с колетерами помещали на предметное стекло в капле воды и анализировали на световом микроскопе Olympus CX23 (Япония) и стереоскопическом микроскопе Zeiss (Германия), модель Primo Star, при увеличении  $40\times$  и  $100\times$ . Всего было проанализировано более 500 листьев. Колетеры срезали с листа и помещали на предметное стекло в капле воды и глицерина в соотношении 1 : 1. Препараты анализировали на стереоскопическом микроскопе Zeiss (Германия), модель Primo Star, при увеличении  $400\times$ . Фотографии были сделаны с помощью фотонасадки TourCam.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) фрагменты участков листьев (размером  $2 \times 4$  мм), извлеченных из *in vitro* растений, отсекали острой бритвой и фиксировали в 2.5% глутаральдегиде в 0.1 М буфере Зоренсона, pH 7.2, с добавлением 15 мг сахарозы на 1 мл. После промывки в буфере образцы обезживали серией этанола (30% 30', 50% 30', 70% 30', 96% 30',  $2 \times 100\%$  30') и помещали в абсолютный ацетон. Затем была применена функция сушки в атмосфере  $\text{CO}_2$  (сушка в критической точке) (Hitachi HCP-2 Critical Point Drier, Япония). Сухие фрагменты листьев, верхней и боковой (поперечный срез) поверхности были смонтированы на SEM-заглушке с углеродными проводящими язычками и покрыты золотом и палладием с использованием устройства для ионного покрытия Eiko IB-3 (Япония). Образцы на-

блюдали на СЭМ JSM-6380LA (JEOL, Япония) в лаборатории электронной микроскопии (межфакультетской лаборатории биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова).

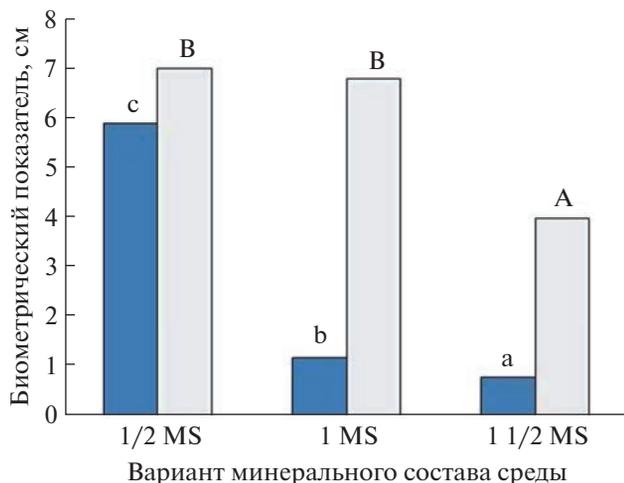
Локализацию вторичных соединений определяли гистохимическими методами: для определения суммы фенольных соединений материал окрашивали 0.08% раствором реактива Fast Blue [8]; для изучения локализации флаванов (катехинов и проантоцианидинов) использовали реакцию с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты; для изучения локализации терпеноидов проводили реакцию с НАДИ [9, 10]. Препараты просматривали с помощью светового микроскопа KERN OBS 114 (Германия).

Средние значения данных были рассчитаны с использованием Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США). Дисперсионный анализ (ANOVA) проводили с использованием Statistica версии 10.0, средние значения сравнивали с использованием критерия наименьшей значимой разницы Фишера (LSD) при уровне значимости  $P \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований установлено, что минеральный состав питательной среды оказывал существенное влияние на рост пазушных побегов микрочеренков батата *in vitro*. Выявлены некоторые закономерности роста и развития микропобегов из вегетирующих боковых почек. Так, уже на седьмые сутки с начала культивирования *in vitro* мы наблюдали активацию роста существующих меристем, а спустя еще семь суток – образование корневой системы. К концу первого цикла культивирования (40 сут) формировались побеги высотой в среднем до 5–6 см с хорошо развитой корневой системой (рис. 2).

Следует отметить, что уменьшение концентрации минеральных солей в составе питательной среды приводило к интенсивному росту пазушных почек и формированию побегов. Наилучшие результаты по росту побегов и укоренению были получены на среде, содержащей минеральные соли МС в  $\frac{1}{2}$  нормы (рис. 3). С увеличением концентрации солей в среде учитываемые биометрические показатели уменьшались. При этом ярко выраженный эффект влияния минеральных солей проявился на формировании побегов, в то время как на рост корней минеральный состав не оказал существенного влияния. Во всех вариантах средняя длина корней составила 6.5–7 см. Исключение составил вариант, в котором концентрация минеральных солей была увеличена в 1.5 раза. В этом варианте наблюдали ингибирующий эффект по отношению к росту корней, а средняя длина корня не превышала 4 см, что примерно в 2 раза ниже, чем в наилучшем варианте ( $\frac{1}{2}$  нор-



**Рис. 3.** Влияние минерального состава питательной среды на высоту побега (синие столбцы) и длину корней (белые столбцы) (сорт Jewel). Значения длины корней и высоты побегов, обозначенные одинаковыми буквами, несущественно отличаются между собой при  $P \leq 0.05$  на основании LSD.

мы MS). Такую ответную реакцию на состав питательной среды можно объяснить тем, что овощной батат может расти в различных условиях окружающей среды, не требуя наличия в почве большого количества элементов минерального питания [2]. Таким образом, применение  $\frac{1}{2}$  нормы минеральных солей по MS приводило к получению быстро растущих пазушных и адвентивных побегов и формированию мощной корневой системы в базальной части микрочеренков. Аналогичные результаты по активации развития пазушных и адвентивных почек, а также их активному росту были получены и для других исследуемых сортов батата.

Следует отметить, что при визуальном обследовании сформировавшихся микропобегов было обнаружено, что на нижней части вновь образовавшихся молодых листьев разных ярусов формировались в массовом количестве прозрачные наросты. При более тщательном изучении установлено, что это секреторные образования – колетеры (клейкие волоски) (рис. 4). В них синтезируется клейкое вещество, состоящее, как правило, из слизи и смолы, но могут быть и другие компоненты. [11]. Колетеры могут образовываться в разных частях растений, например, в пазухе листа, на прилистниках, по краю листьев или в основании черешков [12]. Разными авторами показано, что образовавшийся в колетерах экссудат предотвращает растительные ткани и органы от высыхания и перегрева [13–15].

Согласно нашим исследованиям, начало формирования колетер на листовой пластинке началось в середине цикла культивирования, примерно через 15–20 суток с начала выращивания *in vitro*, когда наблюдалось образование первого нормального листа из боковых почек. Колетеры образовывались по всей нижней площади листа и этот процесс происходил асинхронно. Поэтому под бинокулярной лупой можно одновременно было увидеть только что образовавшиеся колетеры (они имеют светло-зеленую окраску), так и колетеры, которые переставали функционировать и приобретали темно-бурую окраску, и которые, как правило, формировались к концу цикла культивирования (на 40 сут). По морфо-анатомическому строению колетеры микроклонов батата близки к железистым волоскам, состоящим из прозрачных сильно вакуолизированных эпидермальных клеток. Все колетеры располагались группой и были отнесены к кистевидному типу. При этом в центральной части листа колетеры формировались



**Рис. 4.** Колетеры на листьях микроклонов батата *in vitro*: а – кончик листа, б – средняя часть листа. Масштабная линейка – 0.1 см.

пучками (рис. 4б), а на конце листа были единичными или двойными (рис. 4а). На поверхности колетер были обнаружены секреторные клетки, которые равномерно распределялись по всей поверхности выростов. Вероятно, образование колетер является адаптационной/защитной реакцией растений батата к новым условиям выращивания *in vitro*, в то время как для растений батата, произрастающих в условиях *in vivo*, секреторные образования на листьях не формируются.

Следует отметить, что массовое образование колетер на листьях характерно для всех изучаемых сортов батата на первом цикле культивирования. Было отмечено, что в среднем на одном листе формировалось от 50 до 60 колетер. Однако, при последующем культивировании *in vitro* интенсивность образования и число колетер на листьях уменьшались, и к третьему циклу культивирования ни у одного из исследуемых сортов батата образование колетер на листьях *in vitro* не было отмечено. Это свидетельствует о частичной или полной адаптации микроклонов к условиям *in vitro* в отсутствие внешних стрессовых факторов, которые и обуславливают изменение морфологических признаков в сторону редукции колетер. Таким образом, мы стали свидетелями физиолого-анатомического атавизма у микроклонов батата в условиях *in vitro*, когда глобальное изменение факторов внешней среды заставляет интактные растения проявлять утраченные анатомические структуры.

Все колетеры имели белую окраску и являлись секреторными. При небольшом сдавливании из колетер выделялось прозрачное вещество, не растворяемое в воде. Известно, что в колетерах могут присутствовать различные белки, жиры, полисахариды и соединения фенольной и терпеноидной природы [11, 12, 16], качественный и количественный состав которых изменяется в процессе жизненного цикла колетер. Так, показано присутствие веществ фенольной природы, в частности танинов и полифенолов, в колетерах, формирующихся на листьях интактных растений *Pentas lanceolata*, *Betula pendula* и различных видов *Juglans* [11, 17, 18]. Наши исследования продемонстрировали, что и в колетерах батата происходит локализация фенольных соединений. Однако из-за их небольшого количества окраска была не ярко выражена. Кроме того, в колетерах нами были обнаружены и устьица (рис. 5е).

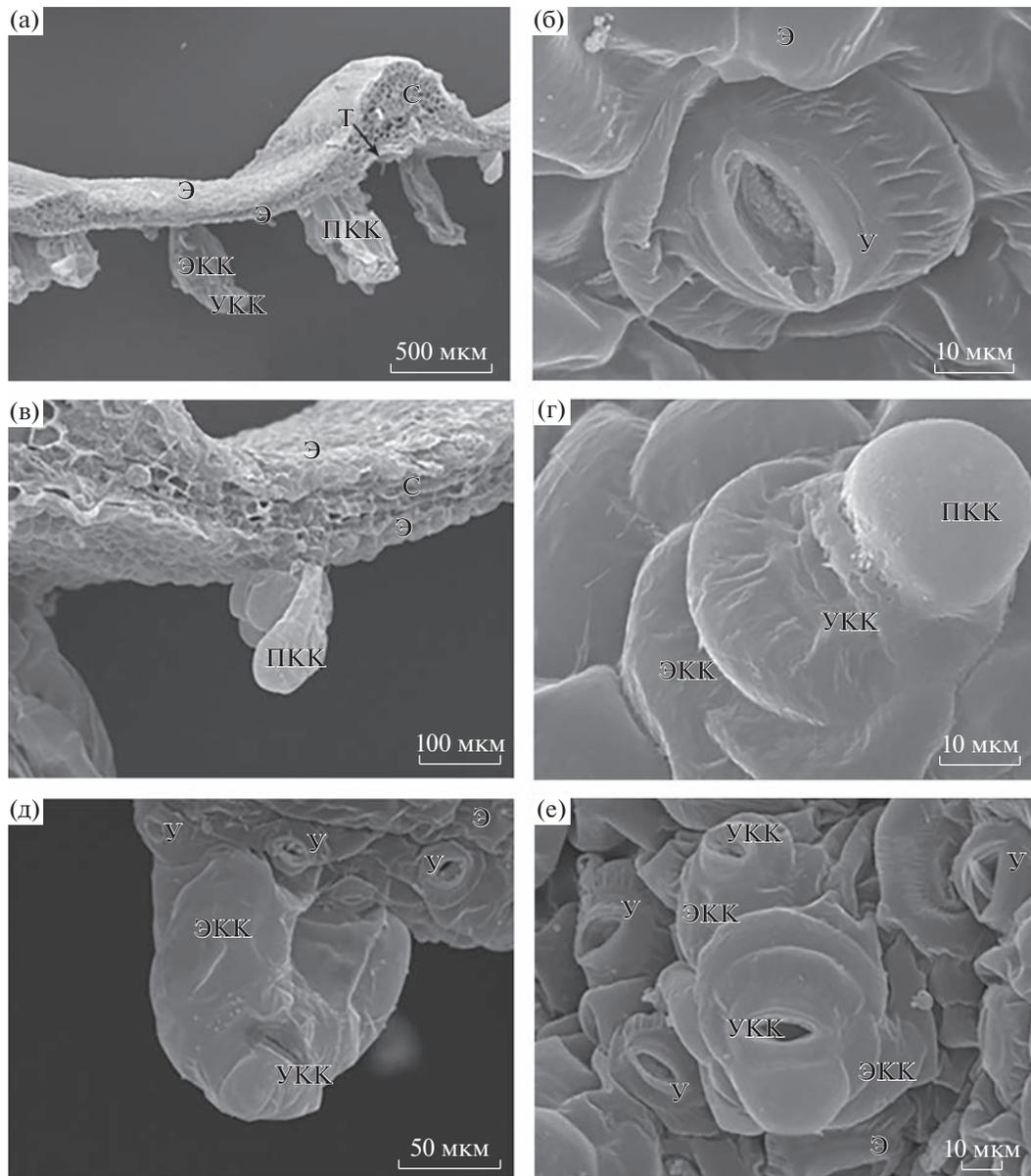
При исследовании поперечных срезов листа батата на сканирующем микроскопе мы отмечали образование тканей, различающихся по форме и размеру (рис. 5). Как правило, наблюдали формирование разросшейся ткани с округлыми паренхимными клетками (рис. 5а, б). Ряд образований сохранял обособленность и имел общую эпидермальную структуру (рис. 5с). В зависимости от своего размера, такие колетеры имели на поверх-

ности одно или несколько устьиц (рис. 5с, д, е), которые отличались от устьиц, расположенных в эпидермисе листа (рис. 5г).

Эпидермис батата представлял собой относительно гладкую структуру, сформированную кутикулой, на поверхности которой не наблюдали большого количества выпуклых, кристаллических структур или каких-либо других образований (рис. 6а). Около устьиц иногда можно было видеть разного рода кристаллоподобные структуры. Эпидермис имел типичную структуру с устьицами, количество которых значительно отличалось в зависимости от расположения на листе. Часть эпидермальных клеток деформировались и содержали выросты или разрастания (рис. 6б, д), некоторые образовывали гигантские структуры колетер размером до нескольких миллиметров. Поверхность колетер, не имеющих устьиц, тоже по большей части была гладкой (рис. 6г). Единичные устьица, расположенные в эпидермисе, были окружены неким секретом с кристаллическими образованиями (рис. 6с). Подобные структуры можно было отметить на колетерах, на поверхности которых наблюдали образование устьиц в открытом состоянии (рис. 6д). На внутренней поверхности клеток колетер также отмечали похожие игольчатые образования (рис. 6е).

Особенностью формирования колетер на поздних стадиях является образование каллусоподобных структур из паренхимных клеток (рис. 7а). Однако небольшие формирующиеся колетеры имели на своей поверхности клетки, схожие с клетками эпидермиса, и на начальных стадиях сохраняли некое подобие организованных выростов или утолщений (рис. 7б, с). В ряде случаев можно было наблюдать выросты единичных клеток, имеющих типичную паренхимную природу. Чаще они состояли из пары клеток, четко отличающихся по структуре от обычных триом, которые на листе батата, как правило, ассоциированы с поверхностью сосуда. Новообразующиеся колетеры, по видимому, изначально связаны с преобразованием клеток устьица (рис. 7б). На поздних стадиях колетеры состояли из большого числа длинных булавовидных клеток. Отмечено, что данные клетки не связаны между собой и, скорее всего, делятся хаотично и беспорядочно (рис. 7д). Наблюдаемая утрата межклеточной связи в виде общего эпидермиса и отсутствие плазмодесм, вероятно, вызывает изменения в клетках и их последующую гибель в результате избыточного испарения и механического высыхания поверхности клеточных стенок, обеспечивающих в паренхиме апопластный и симпластный транспорт.

В силу того, что продукты вторичного метаболизма играют непосредственную медиаторную роль не только в значимых физиологических процессах растений (дыхание, фотосинтез, защита от стресса),

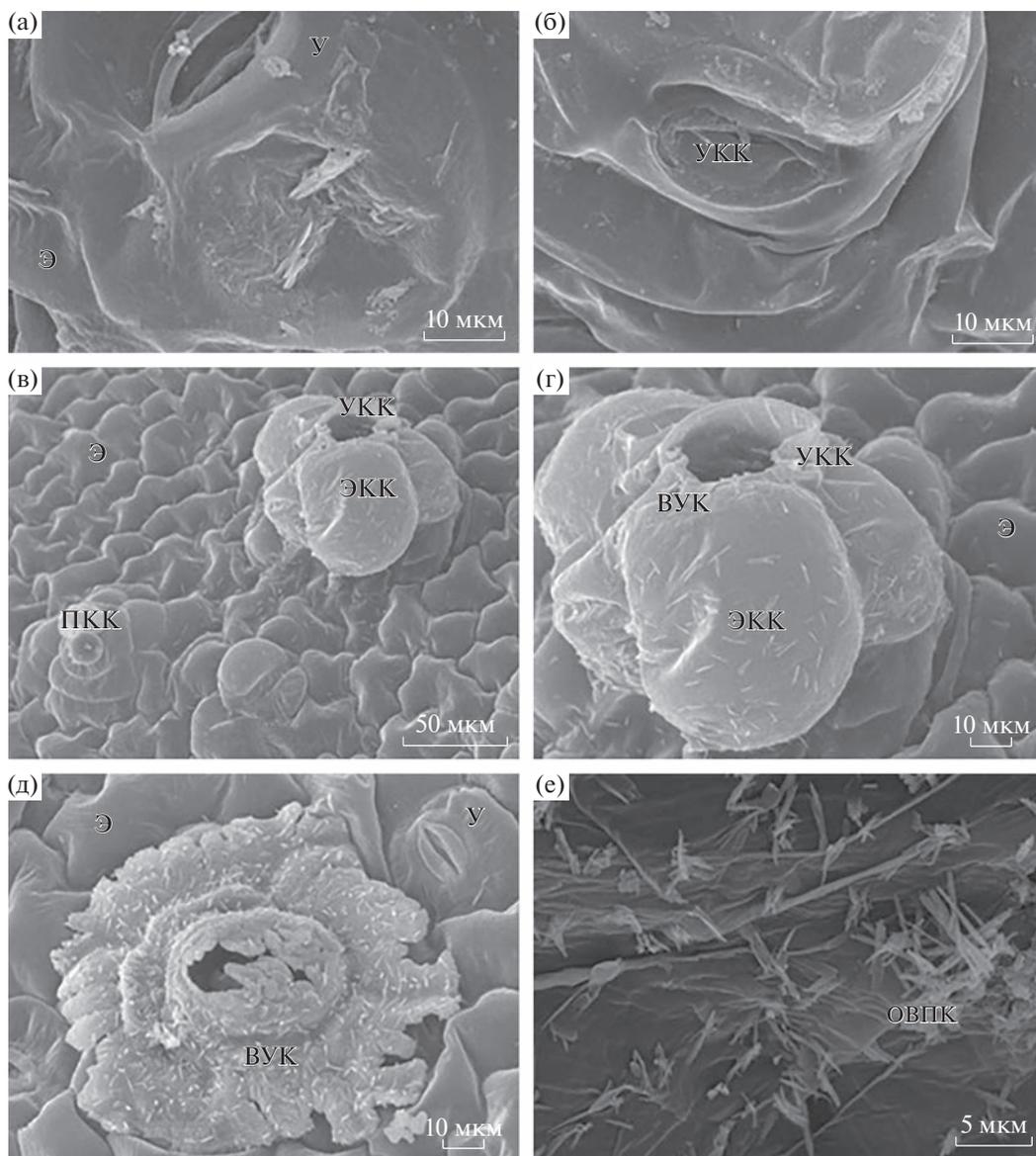


**Рис. 5.** Изображения фрагментов поперечного среза и нижней части листа батата, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: поперечный срез листа с расположенными на нижней (абаксиальной) стороне колетерами (а); увеличенный фрагмент колетер с разрозненными клетками (б) и с общей системой эпидермиса (в); клетка устьица в ткани нижнего эпидермиса (г); модифицированный фрагмент эпидермиса и устьица формирующейся колетеры (д); изменение морфологии нижнего эпидермиса и устьиц при образовании колетер (е). Обозначения: С – колетеры; Т – трихома; Э – эпидермис; У – устьица; ЭКК – эпидермальные клетки колетер; ПКК – паренхимные клетки колетер; УКК – устьичные клетки колетер.

но и являются мажорными компонентами в процессах взаимодействия растений с окружающей средой (аллелопатия, аттрактурирующие и инсектицидные компоненты, гормоноподобное и регуляторное действие и т.д.), вопросы локализации данных веществ имеют важное значение для понимания механизмов введения и адаптации растений к условиям *in vitro*.

С использованием специфических гистохимических реакций нами показано, что вторичные

метаболиты в листьях микроклонов батата представлены фенольными и терпеноидными соединениями (рис. 8). Установлено, что вторичные метаболиты локализуются в проводящих и эпидермальных тканях. Гистохимическая реакция на флаваны с ванилиновым реактивом показала доминирование в фенольном комплексе растений батата низкомолекулярных веществ флаванового ряда. Эпидермальные ткани листа микроклонов батата содержали вторичные метаболиты в виде



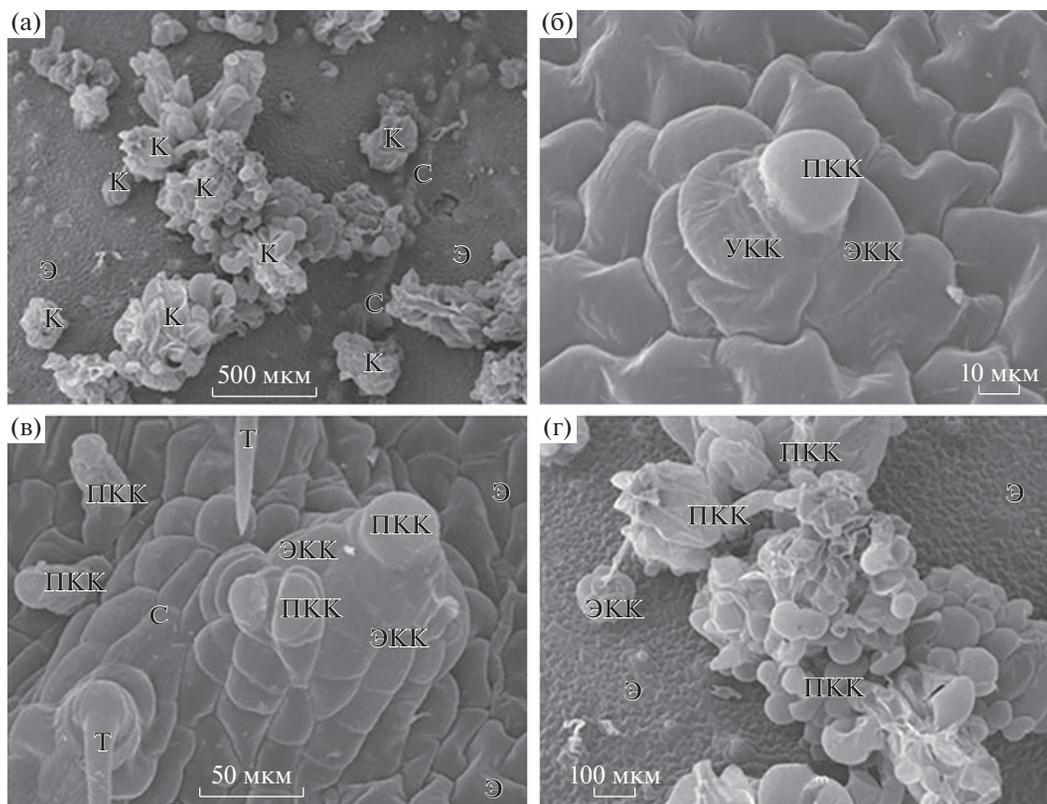
**Рис. 6.** Изображения фрагментов нижней (абаксиальной) поверхности клеток эпидермиса и устьиц колелер листа батата, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: устьице на абаксиальной стороне листа (а); полностью открытое устьице на абаксиальной стороне листа, в окружении раздувшихся клеток (б); устьице на абаксиальной стороне листа, покрытое секреторными выделениями, рядом с устьищем без изменения морфологии (в); устьице на поверхности колелеры, с незначительными секреторными выделениями (г); увеличенный фрагмент рисунка бб с ярко выраженными секреторными выделениями на поверхности окружающих устьище клеток (д); увеличенный фрагмент поверхности секреторных выделений вокруг клетки устьища, размещенного на рисунке бв (е). Обозначения: Э – эпидермис; У – устьица; ЭКК – эпидермальные клетки колелер; ПКК – паренхимные клетки колелер; УКК – устьичные клетки колелер; ВУК – выделения устьичных клеток; ОВПК – образования внутренних паренхимных клеток.

аморфного вещества в клеточных стенках и вакуолях. Накопление веществ изопреноидной природы осуществлялось в клеточных стенках и межклетниках эпидермальных тканей листа, а также в виде слоистых отложений на поверхности кутикулы (рис. 8д). Еще одной характерной особенностью в локализации вторичных метаболитов являлось наличие терпеноидов в оболочках замыкающих и побочных клеток устьиц. При этом частичное со-

держание терпеноидов наблюдали только в тонких участках клеточных стенок, обращенных к устьичной щели. Устьичная щель была полностью заполнена полифенолами и терпеноидами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Успех клонального микроразмножения зависит от сбалансированного минерального и гормо-



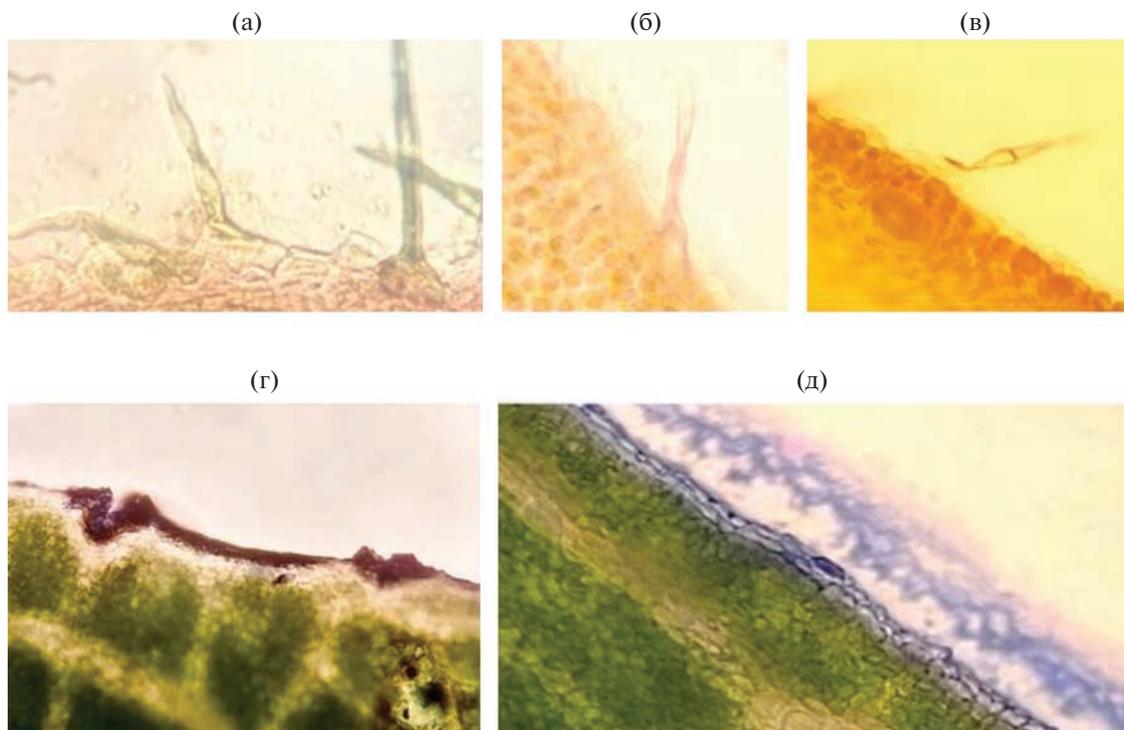
**Рис. 7.** Изображения фрагментов абаксиальной стороны листа батата множественными колетерами, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: разнообразие и обилие колетер на нижней поверхности листа (а); небольшое изменение устьичной клетки, сопровождающее подъем над эпидермисом и асимметричное увеличение одной из устьичных клеток (б); образование крупной колетеры с сохранением эпидермальных клеток, рядом с сосудистым пучком (в); крупные образования колетер, состоящие из удлиненных клеток, имеющих крепление у основания, но не имеющих связи между собой (г). Обозначения: К, С – колетеры; Т – трихома; Э – эпидермис; ЭКК – эпидермальные клетки колетер; ПКК – паренхимные клетки колетер; УКК – устьичные клетки колетер.

нального состава питательной среды. По данным ряда авторов, среда на основе минеральных солей по МС является наиболее подходящей для роста пазушных и адвентивных почек у батата. Однако для некоторых сортов батата показано, что среда, содержащая  $\frac{1}{2}$  норму минеральных солей по прописи МС, является наилучшей для размножения и укоренения микропобегов [19].

В результате проведенных нами исследований показано, что минеральный состав питательной среды оказывает существенное влияние на рост пазушных побегов и укоренение микрочеренков батата. Нами выявлены некоторые закономерности роста и развития микропобегов из вегетирующих почек. Установлено, что с увеличением концентрации солей в среде уменьшаются учитываемые биометрические показатели. При этом ярко выраженный эффект влияния концентрации минеральных солей проявился на формировании побегов, в то время как на рост корней концентрация минеральных солей не оказала существенного влияния. Вероятно, такая ответная реакция на состав питательной среды обусловлена тем,

что овощной батат может расти в различных условиях окружающей среды, не требуя наличия в почве большого количества элементов минерального питания [2].

Следует отметить, что при выращивании овощного батата *in vitro* было обнаружено образование на нижней части молодых листьев прозрачных наростов – колетер. Колетеры представляют собой многоклеточные секреторные структуры паренхимального происхождения, которые окружены эпидермальными клетками [20, 21]. Чаще всего их можно обнаружить на адаксиальной стороне прилистников и/или чашелистиков среди 60 семейств покрытосеменных растений [21]. Структурно они могут выглядеть как трихомы или выступы, которые образуются из эпидермальных или субэпидермальных тканей [22]. Анатомическую структуру колетер можно описать как паренхиматозную клеточную ось, окруженную слоем палисадноподобных эпидермальных клеток [21, 23]. Известно, что эпидермальные клетки колетер являются секреторными. Иногда по их средней оси развиваются сосудистые пучки [21]. Данные структуры диффе-



**Рис. 8.** Локализация фенольных соединений в листе (а–в) и терпеноидов в клетках эпидермы и кутикулы листа батата (д, е). Реакция с ванилином реактивом на флаваноны (а, б), на сумму растворимых фенольных соединений с реактивом Fast Blue (в), на наличие терпеноидов с реактивом НАДИ (г, д). Увеличение: а, г, д – 100 мкм, б, в – 50 мкм.

ренцируются на ранних этапах онтогенеза в области апикальных побеговых и латеральных меристем. Также колетеры могут встречаться на репродуктивных органах [24].

Функции колетер в большинстве своем не ясны. По некоторым данным, колетеры выполняют защитную функцию за счет покрытия верховой части побега слизистым секретом [21, 25]. Также существуют предположения, что секрет колетер защищает молодые побеги от обезвоживания в жарких тропических условиях за счет покрытия им меристемы [22, 26].

Природа липкого вещества, которое содержится и выделяется колетерами, очень вариabельна. В них могут присутствовать различные белки, жиры и полисахариды, а также низкомолекулярные биологически активные вещества [16]. Как известно, в растительных клетках представители фенольного метаболизма, в большинстве случаев, находятся в виде гликозидированных либо этерифицированных форм. Наши исследования показали, что в колетерах накапливаются соединения фенольной и терпеноидной природы. Синтез некоторых представителей вторичного метаболизма связан с наличием пластид (хлоропластов и лейкопластов) в клетках [27]. В процессе культивирования отмечается изменение окраски колетер с прозрачного на темный цвет. Вероятно,

это происходит за счет старения колетер, сопровождающегося изменением биохимического состава экссудата. В литературе связывают образование темноокрашенных колетер с содержанием в них веществ фенольной природы, в частности, танинов и биофлаваноидов [27]. В свою очередь, полифенолы являются наиболее распространенными представителями вторичных метаболитов растений. Биосинтез и накопление этих низкомолекулярных и высокорекреационных соединений отличается пластичностью и зависит не только от видовой принадлежности растений, но и от органов, стадии онтогенеза и периода вегетации, а также от выполняемых ими функций.

Вероятно, развитие колетер у батата связано с изменениями дифференцировки клеток устьиц. Развитие и рост колетер зависят от того, происходит ли их разрастание под эпидермальной поверхностью или они сразу формируются паренхимоподобными клетками. Однако во всех случаях при разрастании структур их целостность оказывается нарушенной, и паренхимные клетки, оказавшись без ограничивающего действия кутикулы и эпидермальных клеток, формируют хаотичную структуру с низким уровнем связей между клетками. Если на первой стадии работа этих структур как секреторных явно наличествует, то на поздних стадиях, когда клетки теряют связь между собой и,

будучи незащищенными (вероятно, не имея возможности пройти дифференцировку по пути эпидермальных клеток и образовать кутикулу), подвергаются воздействию окислительного и подсушивающего влияния воздушной среды, они переходят в состояние стресса и, вероятно, более или менее быстро погибают. Это совпадает с тем, что секреция характерна для молодых листьев [28]. Клетки колетер имеют значительно большие размеры, чем паренхимные или эпидермальные клетки, и должны характеризоваться избыточным давлением и содержать гигантскую вакуоль для обеспечения роста и секреции веществ наружу [29]. Кроме того, колетеры могут иметь разные формы, в том числе, булавовидные и грушевидные, что используется рядом авторов в работах по систематике [30].

Экспериментально установлено, что в клеточных стенках и содержимом вакуолей колетер интактных растений и микроклонов присутствуют полифенолы, представленные, в том числе, флаванонами. Немногочисленные зоны аккумуляции веществ терпеноидной природы (рис. 6г, д) имеют идентичный, но менее выраженный характер, чем локализация полифенолов. Данная тенденция может быть следствием особенностей как первичного, так и вторичного метаболизма в выделительных тканях, где продукты углеводного метаболизма при участии ароматических аминокислот дают начало вторичному метаболизму. Приведенные данные еще раз наглядно свидетельствуют о тесной взаимосвязи между биосинтезом изопреноидов и фенольных соединений.

Таким образом, для растений батата характерно формирование секреторных образований на листовых пластинках микроклонов *in vitro* в ответ на изменение условий культивирования. Данная ответная реакция растений *in vitro* в существующей литературе не обсуждается. Нами это явление было обнаружено впервые. Вероятно, формирование колетер связано с тем, что перевод растений батата из условий *in vivo* в *in vitro* является стрессом, поскольку при этом меняется газовый состав и водный баланс условий выращивания (в пробирке). Поэтому для защиты листьев, например, от обезвоживания, для регуляции транспирации или образования мест для локализации ценных для растения веществ (полисахаридов, вторичных соединений) и происходит формирование колетер. Однако данное явление характерно не для всех растений *in vitro* и требует дополнительных исследований.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2023-220 на поддержку программы развития университета “Приоритет – 2030”. Исследование также поддержано заданиями № 18-118021490111-5 (ФГБНУ ГБС РАН) и № 0574-2019-0002 (ФГБНУ

ВНИИСБ) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Авторы выражают благодарность Анатолию Георгиевичу Богданову и ЦКП УНО “Электронная микроскопия в науках о жизни”, уникальной научной установке для трехмерной электронной микроскопии и спектроскопии (биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tumwegamire S., Kapinga R., Rubaihayo P.R., LaBon-te D.R.* Evaluation of dry matter, protein, starch, sucrose,  $\beta$ -carotene, iron, zinc, calcium, and magnesium in East African sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) germplasm // Hort. Sci. 2011. V. 46. P. 348. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.3.348>
2. *Abubakar A.S., Yahaya S.U., Shaibu A.S., Ibrahim H.* *In vitro* propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars // Agric. Sci. Digest. 2018. V. 38. P. 17. <https://doi.org/10.18805/ag.D-128>
3. *Калашиникова Е.А.* Клеточная инженерия растений: Учебник и практикум. М.: Юрайт. Сер. 76. Высшее образование. (2-е изд.). 2020. 378 с.
4. *Калашиникова Е.А., Куракосян Р.Н.* Современные аспекты биотехнологии. М.: РГАУ–МСХА. 2016. 145 с.
5. *Tresmondi F., Canaveze Y., Guimarães E., Machado S.R.* Colleters in Rubiaceae from forest and savanna: The link between secretion and environment // Sci. Nat. 2017. V. 104. P. 17. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1444-x>
6. *Voigt D., Kim J., Jantschke A., Varenberg M.* Robust, universal, and persistent bud secretion adhesion in horse-chestnut trees // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 16925. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74029-5>
7. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
8. *Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J., Rock B.N., Eder J.* Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies*) // New Phytol. 2000. V. 146. P. 403. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00666.x>
9. *Разаренова К.Н., Бабушкина Е.В., Смирнов П.Д., Костина О.В., Муравник Л.Е.* Гистохимия трихом официальных представителей семейства *Lamiaceae* // Медицинский альманах. 2017. Т. 3. С. 193.
10. *Gardner R.O.* Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin // Stain Technol. 1975. Т. 50. P. 315. <https://doi.org/10.3109/10520297509117081>
11. *Костина О.В., Муравник Л.Е.* Колетеры прилистников *Pentas lanceolata* (Rubiaceae) ультраструктур-

- ные и функциональные особенности // Ботанический журнал. 2017. Т. 102. С. 733.
12. *Gonzalez M., Tarragó R.* Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America // *Bot. J. Lin. Soc.* 2009. V. 160. P. 197.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00969.x>
  13. *Miguel E.C., Klein D.E., Oliveira M.A., Cunha M.* Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulate* (Rubiaceae) // *Rev. Braz. Bot.* 2010. V. 33. P. 425.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000300006>
  14. *Paiva E.A.S.* Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae) // *Comp. Rend. Biol.* 2009. V. 332. P. 1078.  
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.08.003>
  15. *Canaveze Y., Machado S.R.* Leaf colleters in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis, and cellular secretion // *Botany.* 2015. V. 93. P. 287.  
<https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0229>
  16. *Miguel E.C., Gomes V.M., Oliveira M.A., Cunha M.D.* Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition and antifungal activity // *Plant Biol.* 2006. V. 8. P. 715.  
<https://doi.org/10.1055/s-2006-924174>
  17. *Муравник Л.Е.* Морфология и ультраструктура трихом околоплодников у видов *Juglans* (Juglandaceae) в связи с синтезом вторичных метаболитов // Ботанический журнал. 2007. Т. 92. P. 96.
  18. *Valkama E., Salminen J.-P., Koricheva J., Pihlaja K.* Comparative analysis of leaf trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish birch species // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 643.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg070>
  19. *Kirakosyan R.N., Kalashnikova E.A., Abubakarov H.G., Sleptsov N.N., Dudina Y.A., Temirbekova S.K., Khuat Q.V., Trukhachev V.I., Sumin A.V.* Influence of mineral treatment, plant growth regulators and artificial light on the growth of Jewel sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. cv. Jewel) *in vitro* // *Life.* 2023. V. 13. P. 52.  
<https://doi.org/10.3390/life13010052>
  20. *Klein D.E., Gomes V.M., Silva-Neto S.J., Cunha M.* The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae) // *Ann. Bot.* 2004. V. 94. P. 733.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mch198>
  21. *Thomas V.* Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter // *Ann. Bot.* 1991. V. 68. P. 287.
  22. *Appezato-da-Gloria B., Estelita M.E.M.* Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae) // *Braz. J. Bot.* 2000. V. 23. P. 113.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042000000200001>
  23. *Da Cunha M., Vieira R.C.* Anatomia foliar de *Psychotria veloziana* Benth. (Rubiaceae) // *Rodriguésia.* 1993. V. 45–49. P. 39.  
<https://doi.org/10.1590/2175-7860199319974549717504>
  24. *Mayer J.L.S., Cardoso-Gustavson P., Appezato-da-Glória B.* Colleters in monocots: new record for Orchidaceae // *Flora.* 2011. V. 206. P. 185.  
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.09.003>
  25. *De-Paula O.C., Oliveira D.M.T.* Ocorrência de colleters em embriões de tres espécies de *Chamaecrista* Moench (Fabaceae: Caesalpinioideae) // *Rev. Bras. Biocienc.* 2007. V. 5. P. 348.
  26. *Klein D.E., Gomes V.M., Silva-Neto S.J., Cunha M.* The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae) // *Ann. Bot.* 2004. V. 94. P. 733.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mch198>
  27. *Muravnik L.E., Kostina O.V., Shavarda A.L.* Development, structure and secretion compounds of stipule colleters in *Pentas lanceolata* (Rubiaceae) // *South African J. Bot.* 2014. V. 93. P. 27.  
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.007>
  28. *Paiva E.A.S.* Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure, secretion and evidences for young leaf protection // *J. Torrey Bot. Soc.* 2012. V. 139. P. 1.  
<https://doi.org/10.3159/TORREY-D-11-00046.1>
  29. *Zanotti A., Fernandes V.F., Azevedo A.A., Meira R.M.S.A.* Leaf and sepal colleters in *Calolisianthus speciosus* Gilg (Gentianaceae): a morphoanatomical comparative analysis and mechanisms of exudation // *Acta Bot. Bras.* 2021. V. 35. P. 445.  
<https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0424>
  30. *Silva M.D.S., Coutinho Í.A.C., Araújo M.N., Meira R.M.S.A.* Colleters in *Chamaecrista* (L.) Moench sect. *Chamaecrista* and sect. *Caliciopsis* (Leguminosae-Caesalpinioideae): anatomy and taxonomic implications // *Acta Bot. Bras.* 2017. V. 31. P. 382.  
<https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0339>

## КРУГЛОСУТОЧНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ ПОВЫШАЕТ УРОЖАЙНОСТЬ И ПИЩЕВУЮ ЦЕННОСТЬ, И СНИЖАЕТ СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ В МИКРОЗЕЛЕНИ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE*

© 2023 г. Т. Г. Шибаетова<sup>а</sup> \*, А. А. Рубаева<sup>а</sup>, Е. Г. Шерудило<sup>а</sup>, А. Ф. Титов<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр РАН”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: shibaeva@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Микрозелень четырех видов семейства *Brassicaceae* (брокколи, мизуна, редис и рукола) выращивали в условиях 16- и/или 24-часового фотопериода. В первой серии опытов интеграл дневного освещения был разным (15.6 и 23.3 моль/(м<sup>2</sup> сут) при ФАР 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с)), во второй – одинаковым (15.6 моль/(м<sup>2</sup> сут) при ФАР 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) и 180 мкмоль/(м<sup>2</sup> с)). В третьей серии опытов круглосуточное освещение применяли только в последние трое суток перед сбором урожая. Полученные результаты показали, что растения брокколи, мизуны, редиса и руколы на ранних фазах роста устойчивы к действию круглосуточного освещения и не проявляют типичных признаков фотоповреждения листьев. Микрозелень всех четырех видов, выращенная в условиях круглосуточного освещения, во всех трех сериях опытов имела более высокую урожайность и пищевую ценность (более высокое содержание веществ с антиоксидантными свойствами – антоцианов, флавоноидов, каротиноидов, пролина, а также повышенную активность ферментов антиоксидантной системы), и более низкое содержание нитратов по сравнению с растениями, выращенными при 16-часовом фотопериоде. Сделан вывод, что за счет использования круглосуточного освещения без увеличения энергетических затрат (при сохранении ИДО) возможно увеличение урожайности и пищевой ценности изученных видов микрозелени и снижение в ней содержания нитратов по сравнению со стандартным 16-часовым фотопериодом. Кроме того, повышение пищевой ценности и снижение содержания нитратов также возможно и при применении круглосуточного освещения (как агротехнического приема) в течение нескольких дней непосредственно перед сбором урожая.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, круглосуточное освещение, микрозелень, фотопериод

**DOI:** 10.31857/S0015330323600262, **EDN:** QYVARR

### ВВЕДЕНИЕ

Микрозелень – особая культура, представляющая новейший тренд мирового растениеводства. Ее производство стало привлекательным направлением бизнеса вследствие неуклонно растущего потребительского спроса и в силу ее высокой рыночной стоимости [1]. К тому же многие виды микрозелени оказывают благоприятное воздействие на здоровье человека, поскольку содержат высокую концентрацию полезных питательных веществ [2]. Эти молодые растения имеют более высокое содержание антиоксидантных соединений (полифенолов, каротиноидов, аскорбиновой кислоты) по сравнению со взрослыми растениями, поэтому микрозелень относят к группе “функциональных продуктов” питания [1, 2]. Помимо высокой пищевой ценности, одним из главных критериев “функционального продукта” является его биологическая безопасность, а избыточное мине-

ральное питание или слабая освещенность (или иные причины) могут приводить к повышению содержания в растениях нитрат-ионов (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Нитраты, будучи необходимыми компонентами для жизнедеятельности растений, в организме человека, восстанавливаясь до нитритов, вызывают различные нарушения в обмене веществ и даже патологические процессы [3]. Результаты единичных исследований влияния круглосуточного освещения (CL, от *Continuous Lighting*) на содержание нитратов в растениях довольно противоречивы. Есть данные о том, что содержание нитратов в листьях руколы значительно снижалось в условиях CL, причем независимо от спектрального состава света [4]. В то же время более высокая интенсивность света оказывала слабое влияние на содержание нитратов в микрозелени рапса, капусты, руколы, горчицы [5] и мизуны [6]. Следовательно, необходимы дополнительные исследе-

дования для изучения влияния условий освещения на содержание нитратов у разных видов, чтобы выращивать микрозелень с их содержанием в безопасных для человека количествах.

В настоящее время микрозелень выращивают в теплицах и на фабриках растений с использованием искусственного освещения (*PFAL* – *plant factories with artificial lighting*). Такие фабрики растений представляют собой закрытые производственные системы, в которых интегрированы современные промышленные технологии для круглогодичного производства продукции различных сельскохозяйственных культур. Стоимость полученной в этом случае продукции прежде всего определяется затратами на электроэнергию, а поскольку цены на энергоносители во всем мире неуклонно растут, то необходим поиск надежных решений, позволяющих снижать потребление энергии при производстве тех или иных свежих продуктов, и повышающих эффективность конвертирования электроэнергии в урожай и его качество. В настоящее время большинство проводимых работ по изучению влияния световых условий на продуктивность и эффективность производства нацелены на подбор оптимального спектрального состава света [7] и интенсивности фотосинтетически активной радиации (ФАР) [8, 9], а влиянию фотопериода при светодиодном освещении уделяется недостаточно внимания, хотя несомненно он играет важную роль в регулировании процессов роста и развития растений. В частности, продолжительность фотопериода оказывает влияние на некоторые молекулярные механизмы, связанные с восприятием и передачей светового сигнала листьями, циркадной ритмикой, которые регулируют рост, время цветения, реакцию на абиотические и биотические стрессы и в целом метаболизм растений.

Одним из возможных способов повышения эффективности производства продукции на фабриках растений является перераспределение интеграла дневного освещения (ИДО = освещенность × фотопериод) во времени. Использование длинных фотопериодов, включая СЛ, с более низкой интенсивностью освещения позволяет сократить начальные затраты на осветительные приборы и операционные затраты на освещение благодаря использованию более низких ночных тарифов на электроэнергию. Кроме того, применение СЛ открывает значительные дополнительные возможности для повышения урожайности и качества урожая без увеличения энергетических затрат [4, 10, 11]. В целом СЛ обеспечивает постоянное поступление энергии для ассимиляции углерода, что теоретически предполагает большее накопление биомассы и более высокий урожай. Но положительный экономический эффект от использования СЛ может быть достигнут только при условии, что такой световой режим не приво-

дит к фотоповреждению листьев, поскольку известно, что продолжительные световые периоды вызывают фотоповреждение растений (хлороз и/или некроз) листьев и снижение урожайности таких овощных культур как томаты, баклажаны, огурцы и перцы, что ограничивает применение этого экономически выгодного режима освещения при выращивании в теплицах определенных видов овощей [11, 12]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что СЛ повышает урожайность и пищевую ценность микрозелени четырех видов семейства *Brassicaceae* [13]. Однако, эти результаты были получены в условиях, когда растения выращивали при фотопериодах 16 и 24 ч с одинаковой интенсивностью освещения, что приводило к более высокому ИДО в вариантах с СЛ, а повышение урожайности за счет увеличения ИДО является энергетически затратным, т.е. неэффективным.

Учитывая вышеизложенное, цель данного исследования заключалась в изучении физиологических механизмов реакции растений на СЛ у четырех видов микрозелени семейства *Brassicaceae* (брокколи, мизуна, редис и рукола) и проверке возможности увеличения урожайности и пищевой ценности микрозелени, и снижения содержания в ней нитратов по сравнению со стандартным 16-часовым фотопериодом за счет: а) использования СЛ без увеличения энергетических затрат (при сохранении ИДО) и б) применения СЛ в конце продукционного периода (перед сбором урожая).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 4 вида растений семейства *Brassicaceae* – брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck), мизуна (*Brassica rapa* ssp. *nipposinica* (L.H. Bailey) Hanelt), редис (*Raphanus sativus* var. *radicula* Pers.) и рукола (*Eruca vesicaria* sp. *sativa* Mill.). Растения выращивали в контролируемых условиях среды. Средняя температура воздуха и относительная влажность воздуха составляли  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  и  $60 \pm 5\%$ , соответственно.

Микрозелень выращивали в пластиковых контейнерах на ковриках из кокосового субстрата площадью  $10 \text{ см}^2$ . В первые 3 дня после посева контейнеры с микрозеленью помещали для проращивания в темноту и поливали водой. Растения в возрасте 4 дней от посева (фаза полностью раскрытых семядолей) подвергали воздействию разных световых режимов, увлажняя субстрат половинным питательным раствором Хогланда-Арнона (рН 6.2–6.4).

Освещение растений обеспечивали светодиодными лампами (LED GL V300, Китай), соотношение (%) светодиодов красного : зеленого : синего света составляло 50.3 : 21.1 : 17.6. В первой серии

**Таблица 1.** Условия освещения в опытах с разным и одинаковым интегралом дневного освещения (ИДО), а также при воздействии круглосуточного освещения (CL) в конце продукционного периода

Серии опытов	Фотопериод, ч	ФАР, мкмоль/(м <sup>2</sup> с)	ИДО, моль/(м <sup>2</sup> сут)
1. С разным ИДО	16	270	15.6
	24	270	23.3
2. С одинаковым ИДО	16	270	15.6
	24	180	15.6
3. CL в конце продукционного периода	16	270	15.6
	16 (8 сут) + 24 (3 сут)	270	18.2

опытов с разным интегралом дневного освещения (ИДО) растения выращивали при фотопериодах 16 или 24 ч и ФАР 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), ИДО составлял 15.6 и 23.3 моль/(м<sup>2</sup> сут) соответственно. Во второй серии опытов с одинаковым ИДО растения выращивали при фотопериодах 16 или 24 ч при ФАР 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) и 180 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), соответственно. ИДО в обоих вариантах составлял 15.6 моль/(м<sup>2</sup> сут). В третьей серии опытов растения выращивали при фотопериоде 16 ч, а начиная с 9 сут (последние 3 сут опыта) часть растений подвергали воздействию 24 ч фотопериода при ФАР 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) (табл. 1). ФАР измеряли с помощью измерителя освещенности LI-250A (“LICOR Biosciences”, Lincoln, NE, USA). В каждом опыте за контроль приняты растения, выращенные при фотопериоде 16 ч.

Анализ растений проводили на 12 сут после посева, в фазе появления первого настоящего листа. У десяти проростков каждого вида всех вариантов были измерены длина гипокотила, длина первого настоящего листа, сырой и сухой вес побегов. Длину гипокотила измеряли от основания гипокотила до апикальной меристемы побега. Для определения сырого веса растения взвешивали, а затем образцы высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C до постоянного веса.

Рассчитывали массу листа на единицу площади (LMA, от англ. *leaf mass per area*) как отношение сухой массы четырех высечек семядольных листьев диаметром 4 мм к их площади. Сухую массу высечек определяли после их высушивания при 105°C.

Индекс робастности (от англ. *robust* – крепкий) определяли, как отношение произведения сухой массы побега и диаметра гипокотила к длине гипокотила.

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла (Хл) *a* и *b*, каротиноидов (Кар)) определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 (“Спектр”, Россия) в экстракте 96% этилового спирта и рассчитывали по известным формулам [14].

Содержание малонового диальдегида (МДА), конечного продукта перекисного окисления липидов, определяли методом, основанным на реакции образования триметинового комплекса с максимумом поглощения 532 нм при взаимодействии данных веществ с тиобарбитуровой кислотой [13].

Для анализа активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.1.5.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6), аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) и гваякол-пероксидазы (ГвПО, КФ 1.11.1.7) листья растений гомогенизировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7.8), гомогенат центрифугировали при 15000 *g* в течение 10 мин при 4°C и в супернатанте определяли активность ферментов с использованием спектрофотометра СФ-2000 (“Спектр”, Россия). Активность АПО определяли в присутствии 0.5 мМ аскорбиновой кислоты и 0.25 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> по снижению оптической плотности при 290 нм [13]. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> при 240 нм; активность СОД – по способности ингибировать фотохимическую реакцию тетразолия нитросинего [13]. Анализ ГвПО основывался на окислении гваякола в присутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [13]. Измеряли оптическую плотность при 470 нм. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сухой массы листьев, а удельную активность – на 1 мг белка. Общее содержание белка определяли по методу Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [13].

Для определения содержания перекиси водорода навеску растительной ткани гомогенизировали на льду в 0.1% трихлоруксусной кислоте, центрифугировали 15 мин при 12000 *g* и температуре 4°C. К 0.5 мл супернатанта добавляли по 0.5 мл 10 мМ К-фосфатного буфера (рН 7.0) и 1 мл 1 М KI. После 1 ч выдерживания смеси в холодильнике в темноте определяли оптическую плотность при 390 нм на спектрофотометре СФ 2000 (“Спектр”, Россия) [13]. Содержание перекиси водорода рассчитывали по стандартной концентрационной кривой и выражали в мкмоль/г сырого веса.

**Таблица 2.** Биометрические показатели растений (% к контролю)

Серия опытов	Длина гипокотыля	Длина первого настоящего листа	Сырая масса побега	Сухая масса побега	LMA
<i>Брокколи</i>					
1	87*	228*	129*	130*	128*
2	97	160*	110	124*	114
3	93	111	120*	110	153*
<i>Мизуна</i>					
1	81*	128*	116*	128*	136*
2	87*	109	109	130*	118*
3	92	132*	127*	124*	119*
<i>Редис</i>					
1	80*	227*	130*	181*	169*
2	93	158*	122*	151*	135*
3	82*	145*	111*	150*	128*
<i>Рукола</i>					
1	96	311*	115*	154*	228*
2	99	100	109	114	130*
3	99	124*	110	135*	134*

Примечание: за контроль приняты растения, выращенные в условиях 16 ч фотопериода с освещенностью 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР. \* – статистически значимые различия с контролем. Абсолютные значения контрольных образцов: длина гипокотыля (мм) – 51.2 ± 2.2 (брокколи), 47.3 ± 1.7 (мизуна), 52.3 ± 2.4 (редис), 36.8 ± 1.2 (рукола), длина первого листа (мм) – 2.5 ± 0.7 (брокколи), 5.4 ± 0.5 (мизуна), 5.5 ± 0.7 (редис), 16.5 ± 0.8 (рукола); сырая масса побега (г) – 0.07 ± 0.01 (брокколи), 0.076 ± 0.003 (мизуна), 0.23 ± 0.02 (редис), 0.052 ± 0.003 (рукола); сухая масса побега (мг) – 10.0 ± 1.0 (брокколи), 7.7 ± 0.5 (мизуна), 21.0 ± 2.6 (редис), 2.9 ± 0.3 (рукола); LMA (мг/см<sup>2</sup>) – 5.2 ± 0.4 (брокколи), 3.3 ± 0.2 (мизуна), 2.9 ± 0.3 (редис), 2.5 ± 0.4 (рукола).

Содержание свободного пролина в тканях листа оценивали по нингидриновому методу [13].

Для определения содержания антоцианов и флавоноидов навеску растительного материала гомогенизировали в 4 мл холодной смеси этанола и 1.5 N соляной кислоты (85 : 15, об/об) с последующей экстракцией в течение 14 ч в холодильнике в темноте. После 5 мин центрифугирования экстракта при 10000 g и температуре +4°C для антоцианов определяли оптическую плотность супернатанта при 530 и 657 нм на спектрофотометре СФ 2000. При расчете содержания антоцианов учитывали величину поглощения Хл и продуктов его распада при 657 нм. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически при 300 и 350 нм в супернатанте для антоцианов, предварительно разбавив его в 10 раз. Содержание флавоноидов рассчитывали, как отношение оптической плотности к сырой массе:

$$UB - (A_{300}/\text{г сырой массы}) \text{ и} \\ UA - (A_{350}/\text{г сырой массы}) [15].$$

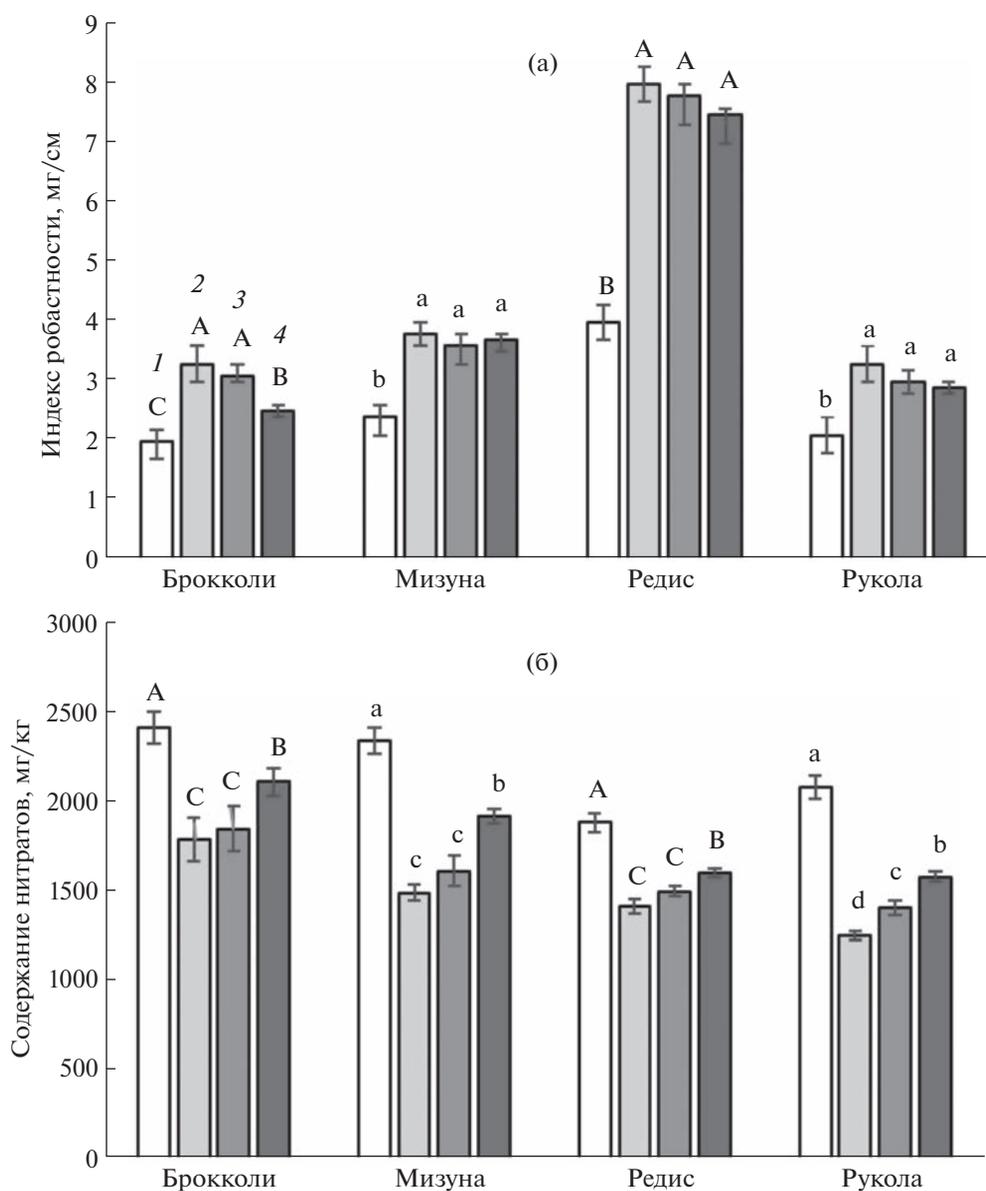
Содержание нитратного азота определяли потенциометрическим методом с помощью рН-метра Анион-4100 (“Анион”, Россия). Навеску сухого вещества помещали в 1% раствор алюмокалиевых квасцов (“Вектон”, Россия) и переме-

шивали на шейкере ПЭ-6500 (“Экротим”, Россия) в течение 5 мин. Затем снимали показания электродвижущей силы (ЭДС) с помощью потенциометра [16]. Содержание нитратов выражали как мг/кг сырого веса растительного материала.

В работе представлены средние значения по двум-трем независимым опытам (4–6 и более биологических повторностей в каждом варианте отдельного опыта) и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями определяли на основе дисперсионного анализа (LSD тест) при  $P < 0.05$  с использованием программного обеспечения MS Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Опыт 1.* Растения всех четырех видов при выращивании в условиях фотопериодов 16 и 24 ч с одинаковой освещенностью (разным ИДО, опыт 1) имели меньшую длину гипокотыля, большую сырую и сухую биомассу побегов, более высокие значения LMA и индекса робастности (табл. 2, рис. 1а) при CL. У всех исследованных видов в условиях CL отмечено ускорение развития, о котором судили по более раннему появлению первого настоящего листа (табл. 2), что предполагает более ранние сроки сбора урожая. Ни у одной из культур не наблюдалось признаков фотоповре-



**Рис. 1.** Индекс робастности (а) и содержание нитратов (б) у растений, выращенных при фотопериодах 16 ч (контроль) (1) и 24 ч с разным (серия опытов 1) (2) и одинаковым (серия опытов 2) (3) ИДО и при воздействии СЛ в конце продукционного периода (серия опытов 3) (4). Различными латинскими буквами для каждого вида указаны достоверные различия средних значений при  $P < 0.05$ .

ждения листьев. Содержание Хл в условиях СЛ было несколько ниже, чем при фотопериоде 16 ч, однако визуально эти изменения не были заметны и листья имели нормальную зеленую окраску. Содержание Кар под влиянием СЛ достоверно увеличивалось в листьях редиса и руколы, но значительно снижалось в листьях мизуны (табл. 3). В условиях СЛ у всех видов растений, кроме редиса, зафиксировано более высокое содержание перекиси водорода и МДА (табл. 3). При этом отмечено, что такие растения накапливали больше антоцианов, флавоноидов, пролина (табл. 3) и имели более высокую активность антиоксидантных фер-

ментов – КАТ, СОД, АПО, ГвПО (табл. 4). У растений всех четырех видов в условиях СЛ содержание нитратов было ниже, чем у растений, выращенных в условиях 16-часового фотопериода (рис. 1б).

*Опыт 2.* В опытах с одинаковым ИДО, т.е. когда интенсивность освещения при 24-часовом фотопериоде была ниже, чем при 16-часовом, вышеречисленные различия между растениями, выращенными при разных фотопериодах, сохранялись, хотя в некоторых случаях они были менее выраженными. Так, по высоте растения, выращенные при разных фотопериодах, практически не отличались (табл. 2, рис. 2), что свидетельству-

**Таблица 3.** Физиолого-биохимические показатели листьев растений (% к контролю)

Серия опытов	Хл ( <i>a + b</i> )	Каротиноиды	Антоцианы	Флавоноиды	Пролин	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	МДА
<i>Брокколи</i>							
1	90	108	199*	136*	132*	131*	329*
2	117*	95	135*	109	108*	100	110
3	81*	67*	110	155*	155*	126*	188*
<i>Мизуна</i>							
1	81*	50*	152*	125*	112	125*	130*
2	116*	114*	97	116*	134*	137*	109
3	92	81*	100	120*	123*	100	111
<i>Редис</i>							
1	85*	125*	159*	136*	171*	117	98
2	80*	92	170*	119*	125*	89	101
3	76*	97	124*	125*	113	91	107
<i>Рукола</i>							
1	78*	129*	348*	136*	561*	154*	276*
2	79*	94	166*	103	152*	100	117*
3	90	100	137*	155*	141*	106	107

Примечание: за контроль приняты растения, выращенные в условиях 16 ч фотопериода с освещенностью 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР. \* – статистически значимые различия с контролем. Абсолютные значения контрольных образцов: Хл (*a + b*) (мг/г сух веса) – 9.0 ± 0.3 мм (брокколи), 5.4 ± 0.3 (мизуна), 6.5 ± 0.2 (редис), 12.3 ± 0.7 (рукола), каротиноиды (мг/г сух веса) – 1.2 ± 0.1 (брокколи), 0.4 ± 0.1 (мизуна), 0.8 ± 0.1 (редис), 0.7 ± 0.1 (рукола); антоцианы (у.е.) – 1.3 ± 0.5 (брокколи), 0.30 ± 0.04 (мизуна), 0.40 ± 0.04 (редис), 1.7 ± 0.2 (рукола); флавоноиды (у.е.) – 23.0 ± 1.2 (брокколи), 18.9 ± 1.4 (мизуна), 23.9 ± 2.2 (редис), 30.7 ± 2.1 (рукола); пролин (мкмоль/г сыр. Веса) – 26.5 ± 2.8 (брокколи), 11.5 ± 0.3 (мизуна), 7.6 ± 1.3 (редис), 27.4 ± 2.5 (рукола); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (мкмоль/г сыр. Веса) – 0.71 ± 0.05 (брокколи), 0.63 ± 0.04 (мизуна), 0.40 ± 0.05 (редис), 0.54 ± 0.04 (рукола); МДА (мкмоль/г сыр. Веса) – 18.4 ± 1.3 (брокколи), 11.9 ± 0.5 (мизуна), 18.3 ± 1.2 (редис), 20.1 ± 0.7 (рукола).

ет от том, что на этот показатель большее влияние оказывает ИДО. В то же время значения LMA и сухой массы побегов в целом были выше у растений, выращенных в условиях CL (табл. 2), что выразилось в более высоком индексе робастности у всех четырех видов (рис. 1а). Содержание Хл было несколько выше в условиях CL у брокколи и мизуны, но ниже у редиса и руколы (табл. 3). Содержание Кар в условиях CL было выше только у мизуны, у остальных видов – не отличалось достоверно от растений, выращенных при 16-часовом фотопериоде. В отличие от первой серии опытов, у растений в условиях CL при более низкой освещенности не наблюдалось значительного увеличения содержания перекиси водорода и МДА. Лишь у мизуны зафиксировано увеличение содержания перекиси водорода на 37%, а у руколы содержание МДА было выше на 17%. При этом отмечено увеличение содержания антоцианов у всех видов, кроме мизуны, флавоноидов у мизуны и редиса, и пролина у всех четырех видов растений (табл. 3). Зафиксировано также повышение активности антиоксидантных ферментов в условиях CL, хотя оно было менее выраженным, чем в первой серии опытов с разным ИДО (табл. 4). Снижение содержания нитратов в условиях CL было сопо-

ставимым с таковым в первом опыте, лишь несколько менее выраженным у руколы (рис. 1б).

*Опыт 3.* Когда растения подвергались действию CL только в течение последних 3 сут. опыта, достоверное уменьшение длины гипокотыля происходило только у редиса (табл. 2), однако растения всех четырех видов имели большую биомассу побегов, более высокие значения LMA и длины первого настоящего листа. В результате индекс робастности у всех видов был выше, чем при выращивании растений при 16-часовом фотопериоде. Только у брокколи индекс робастности был ниже, чем в опыте 1 и 2, у остальных растений он был сопоставим с предыдущими вариантами применения 24-часового фотопериода (рис. 1а). Снижение содержания Хл под влиянием CL было аналогичным опыту 1 (табл. 3). Содержание Кар было ниже у брокколи и мизуны по сравнению с растениями в условиях 16-часового фотопериода. Достоверное увеличение содержания перекиси водорода и МДА отмечено только у брокколи, у остальных видов можно отметить лишь тенденцию повышения (табл. 3). При этом содержание антоцианов, флавоноидов и пролина и активность антиоксидантных ферментов были в большинстве случаев выше у растений, подвер-

**Таблица 4.** Активность антиоксидантных ферментов в листьях растений (% к контролю)

Серия опытов	Активность антиоксидантных ферментов			
	КАТ	СОД	АПО	ГвПО
	<i>Брокколи</i>			
1	113	164*	165*	117*
2	86	136*	167*	112
3	164*	147*	118	100
	<i>Мизуна</i>			
1	128*	131*	118*	131*
2	88	120*	90	89
3	123*	261*	130*	122*
	<i>Редис</i>			
1	289*	122*	132*	123*
2	141*	114	114	113*
3	148*	112	125*	117*
	<i>Рукола</i>			
1	118*	180*	132*	136*
2	103	115	117	108
3	120*	135*	125*	178*

Примечание: за контроль приняты растения, выращенные в условиях 16 ч фотопериода с освещенностью 270 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) ФАР. \* – статистически значимые различия с контролем. Абсолютные значения контрольных образцов: Кат (мкмоль Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/(мг белка · мин)) – 32.3 ± 2.6 (брокколи), 38.3 ± 5.5 (мизуна), 10.4 ± 2.8 (редис), 39.9 ± 3.2 (рукола), СОД (ед. акт./мг белка) – 6.6 ± 1.2 (брокколи), 13.0 ± 1.0 (мизуна), 15.3 ± 1.4 (редис), 5.0 ± 1.0 (рукола); АПО (мкмоль/(мг белка·мин)) – 79.4 ± 13.3 (брокколи), 96.4 ± 9.7 (мизуна), 143.70 ± 2.9 (редис), 113.1 ± 6.2 (рукола); ГвПО (мкмоль/(мг белка · мин)) – 193.3 ± 31.4 (брокколи), 180.4 ± 20.3 (мизуна), 141.4 ± 14.8 (редис), 19.1 ± 2.7 (рукола).

гавшихся СЛ в конце продукционного периода (табл. 3, 4). Под действием СЛ в течение 3 сут. содержание нитратов снижалось в меньшей степени, чем в опытах 1 и 2, но тем не менее оно составило от 13 до 24% для разных видов растений (рис. 1б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

**Рост и продуктивность.** Во всех трех сериях опытов у всех изученных видов сырая и сухая биомасса растений и значения LMA были выше в условиях СЛ по сравнению с растениями, выращенными при 16-часовом фотопериоде. В первом опыте (с разным ИДО) такая реакция растений была ожидаемой, поскольку СЛ обеспечивало более высокий ИДО, т.е. дополнительный свет для фотосинтеза и, следовательно, для накопления биомассы. Известно, что сухая биомасса растений увеличивается с увеличением ИДО до точки светового насыщения [17]. Более высокая продуктивность растений, выращенных в условиях СЛ, служит в поддержку гипотезы [11], что СЛ может вести к увеличению продуктивности растений, если при этом не происходит фотоповреждения листьев. В нашем исследовании все четыре вида растений не проявляли симптомов фотоповреждения листьев. Относительно чувствитель-

ности изучаемых видов к СЛ в литературе есть лишь сведения, что рукола, выращиваемая в условиях СЛ в течение 30 дней, не имела никаких повреждений [4]. Индекс робастности служит интегральным морфофизиологическим показателем, объединяющим объем гипокотыля (длину и диаметр) с сухой биомассой побега, который используется как показатель качества микрорзелени [1]. СЛ увеличивало индекс робастности у всех четырех видов микрорзелени, главным образом, за счет увеличения биомассы. Кроме того, СЛ значительно ускорило формирование первого настоящего листа. Поскольку микрорзелень обычно выращивают до стадии первого настоящего листа, то использование СЛ может служить способом сокращения времени сбора урожая, т.е. продукционного периода. Таким образом, в первом опыте СЛ, обеспечивая более высокий ИДО, повысило урожайность и ускорило развитие всех четырех видов микрорзелени.

Во второй серии опытов (с одинаковым ИДО) интенсивность освещения в варианте с СЛ была ниже, однако индекс робастности растений не отличался от такового у растений в первой серии опытов с более высоким ИДО при СЛ. Этот результат хорошо коррелируется с известными данными о том, что при одинаковом ИДО растения накапливают большую биомассу при более



**Рис. 2.** Внешний вид растений брокколи (*Brassica oleracea* var. *italica*) (а), мизуны (*Brassica rapa* ssp. *nipposinica*) (б), руколы (*Eruca sativa*) (в) и редиса (*Raphanus sativus* ssp. *radicula*) (г), выращенных при фотопериодах 16 и 24 ч с одинаковым ИДО (серия опытов 2).

длинных фотопериодах [18–23]. Эффективность использования световой энергии в процессе фотосинтеза неизменно снижается с повышением интенсивности освещения и, следовательно, выход продуктов фотосинтеза на единицу ФАР всегда будет больше при более низкой освещенности [19, 21]. Снижение эффективности использования световой энергии при высокой интенсивности освещения происходит частично вследствие активизации фотозащитных процессов, которые превращают часть поглощенной энергии света в тепло, не позволяя ей быть использованной в световых реакциях фотосинтеза. Это предотвращает появление индуцированных светом повреждений фотосинтетического аппарата благодаря инициации взаимодополняющих фотозащитных процессов, включающих ксантофилловый цикл и молекулярную реорганизацию антенных комплексов и реакционных центров. Наблюдаемое увеличение биомассы в ответ на более длительный фотопериод при одинаковом ИДО, вероятно,

происходит в результате морфологических изменений и физиологических реакций растений. “Растягивание” ИДО во времени с использованием более низкой интенсивности ФАР имеет преимущества для производителей, так как позволяет, во-первых, снизить первоначальные капитальные затраты благодаря уменьшению количества источников света (ламп) для обеспечения необходимого ИДО. Во-вторых, за счет увеличения эффективности использования световой энергии повышается выход продукции на единицу затраченных средств. В-третьих, использование более низкой интенсивности освещения в течение длительного времени уменьшает количество выделяемого источниками освещения тепла, снижая затраты на кондиционирование (охлаждение, отвод влаги) помещения [22]. Наконец, использование длинных фотопериодов позволяет использовать преимущества более низких ночных тарифов на электроэнергию.

В третьей серии опытов при использовании СЛ в последние 3 дня перед сбором урожая индекс робастности был несколько ниже, чем в первых двух сериях опытов, что объяснимо, но он тем не менее заметно превосходил таковой у растений, выращенных при 16-часовом фотопериоде.

В принципе повышение продуктивности растений на основе увеличения ИДО возможно или за счет повышения интенсивности освещения, или удлинения фотопериода. В данной работе повышение продуктивности наблюдалось и в первой серии опытов при увеличении ИДО, и во второй, когда ИДО был одинаковым, что значительно повышает эффективность использования ресурсов, в данном случае электроэнергии. Отметим, что при выращивании микрозелени амаранта, зеленого и фиолетового базилика в условиях СЛ эффективность использования электроэнергии на освещение была на 10–42% выше, чем при 16-часовом фотопериоде с одинаковым ИДО, а затраты на электроэнергию для производства единицы продукции, наоборот, снижались на 8–38% [10].

**Фотосинтетические пигменты.** Известно, что влияние света на содержание фотосинтетических пигментов варьирует в значительной степени, демонстрируя положительный или отрицательный отклик, в зависимости от фотопериода [4, 12]. В нашей работе содержание Хл у некоторых видов в ответ на действие СЛ снижалось, но не более, чем на 20% и визуально не было заметно. Это важно, так как содержание Хл тесно связано с восприятием человеком (как потенциальным потребителем) зеленой пигментации листьев, что является одним из критериев качества микрозелени [1]. У взрослых растений руколы также было отмечено снижение содержания Хл в условиях СЛ [4]. В то же время другие авторы отмечали в условиях СЛ увеличение содержания хлорофилла у базилика *Ocimum basilicum*, руколы, цикория *Cichorium endivia* [24], а также микрозелени амаранта *Amaranthus tricolor*, зеленого и фиолетового базилика по сравнению с 16-часовым фотопериодом [10]. У микрозелени листовой капусты *Brassica oleracea* var. *viridis* содержание хлорофилла в условиях СЛ увеличивалось при ИДО равном 14 моль/(м<sup>2</sup> сут), но уменьшалось при ИДО 21 моль/(м<sup>2</sup> сут). Уменьшение общего содержания Хл в листьях приводит к снижению поглощения света на единицу площади листа и служит одним из механизмов защиты от избыточного освещения. Поэтому во второй серии опытов, где “избыточность” света создавалась только длительностью фотопериода, но не количеством полученных растениями фотонов света, реакция брокколи и мизуны была иная и количество хлорофилла даже несколько увеличивалось. Ранее [13] мы отмечали у микрозелени изучаемых культур в условиях СЛ увеличение отношения Хл *a* и *b* (что предполагает образова-

ние ССК в ФС II меньшего размера), а также соотношение Кар и Хл, свидетельствующее об относительно более высокой концентрации Кар в пуле фотосинтетических пигментов, что связано с их защитной функцией по отношению к избыточному освещению, поскольку они являются эффективными физическими и химическими тушителями синглетного кислорода и других свободных радикалов [25]. Таким образом, у растений, выращенных с использованием СЛ, содержание Хл было либо сопоставимо или немного выше, чем у растений, выращенных при 16-часовом фотопериоде, либо снижение было не столь значимым, чтобы повлиять на визуальную оценку качества микрозелени. Нужно отметить, что причиной небольшого снижения содержания фотосинтетических пигментов может быть и так называемый эффект “разбавления”, так как их содержание оценивали в побегах, а в условиях СЛ повышается доля биомассы стеблей, в которых содержание этих пигментов невелико. В то же время повышенное содержание Кар в руколе и редисе повышает пищевую ценность микрозелени, поскольку Кар обладают антиоксидантными свойствами, полезными для здоровья человека.

**Окислительный стресс и антиоксиданты.** Повышенное содержание МДА и перекиси водорода в растениях, выращенных в условиях СЛ, свидетельствует том, что растения испытывали легкий окислительный стресс. В ответ на стресс в растениях, как правило, усиливается образование антиоксидантных биоактивных веществ. Антиоксиданты в продуктах питания являются важными соединениями для здоровья человека, т.к. выполняют важную роль в нейтрализации свободных радикалов в организме. Поэтому увеличение содержания веществ, обладающих антиоксидантной активностью, в микрозелени повышает ее пищевую ценность и делает продукт более конкурентоспособным благодаря высокому качеству. В данной работе во всех трех сериях опытов у всех видов микрозелени за некоторыми исключениями по отдельным показателям было зафиксировано увеличение содержания пролина, антоцианов и флавоноидов, а также усиление активности ферментов антиоксидантной системы (КАТ, СОД, АПО и ГвПО). То, что более высокий ИДО может повышать не только урожайность листовых овощей, но и содержание в них веществ, обладающих антиоксидантной активностью, было также показано в ряде работ, в том числе с использованием СЛ [9, 13, 17, 26, 27]. Однако не было очевидно, будет ли это наблюдаться в случае, если СЛ не будет обеспечивать растения дополнительной световой энергией, т.е. при использовании одинакового ИДО. Кроме того, пока не решен вопрос является ли фотоокислительный стресс, вызванный СЛ, непосредственно результатом непрерывного поступления света или он вызван избыточностью све-

та, возникающей вследствие более высокого ИДО. Заметим, что имеются данные, из которых следует, что при СЛ непрерывность поступления светового сигнала, протекания фотосинтеза и фотоокислительных процессов могут вызывать окислительный стресс у растений, даже если значения ИДО не выше, чем обычно требуется растениям при более коротких фотопериодах [23]. В нашем исследовании несмотря на то, что во второй серии опытов с одинаковым ИДО окислительный стресс в большинстве случаев не наблюдался (судя по отсутствию повышения содержания МДА или перекиси водорода), тем не менее, содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов увеличивались. Ранее аналогичные данные о более высокой активности КАТ, СОД и АПО в условиях СЛ по сравнению с 16-часовым фотопериодом при одинаковом ИДО были получены на растениях томата [28].

Что касается третьей серии опытов, то полученные результаты вызывают особый интерес. По содержанию антиоксидантов или по активности антиоксидантных ферментов данные первой и третьей серий опыта в некоторых случаях сопоставимы или эффекты в третьей серии несколько слабее, хотя в первой серии опытов длительность действия СЛ на растения составляла 9 сут., а в третьей — только 3 сут. В своей работе мы не изучали динамику содержания антоцианов, флавоноидов и пролина в условиях СЛ, но имеются работы, показывающие, что в начальный период действия СЛ растения испытывают стресс, в ответ на который синтезируются различные защитные вещества и активизируется работа антиоксидантных ферментов, а впоследствии может происходить адаптация к СЛ и, соответственно, изменяться состав веществ в растении. Так, показано, что у растений маша *Vigna radiata* L. такая адаптация происходила через 6 сут. действия СЛ, когда наблюдалось снижение активности КАТ, СОД, Гв-ПО и содержания пролина на фоне уменьшения концентрации МДА [29]. Максимальное снижение содержания нитратов в листьях пак-чой *Brassica campestris* L. при СЛ происходило уже через 24 ч, а затем наблюдалось некоторое их увеличение [30]. Эти результаты свидетельствуют о том, что непродолжительное применение СЛ непосредственно перед сбором урожая для повышения пищевой ценности и биологической безопасности растений может быть даже эффективнее, чем применение СЛ в течение всего периода выращивания. К тому же более короткие сроки применения СЛ снижают энергозатраты и повышают эффективность производства микрозелени.

В целом наши данные и анализ литературы [10, 31] показывают, что чувствительность растений к тем или иным световым воздействиям достаточно видоспецифична. Особенно это проявляется в ответных реакциях, когда на то или иное воздей-

ствии растения реагируют активным образованием защитных метаболитов. Так, например, при изучении влияния различных комбинаций оранжевого, красного и синего света на 8 видов, подвидов и сортов микрозелени рода *Brassica* (2 сорта мизуны *Brassica rapa nipposinica*, пак-чой *Brassica rapa chinensis*, 2 сорта редиса *Raphanus sativus* и 3 сорта горчицы *Brassica juncea*) авторы выявили три разных типа ответной реакции растений, оцениваемой по синтезу фенольных веществ и изменению антиоксидантной активности [32]. При действии СЛ на микрозелень амаранта и листовой капусты содержание в них фенольных соединений и антоцианов, а также антиоксидантная активность увеличивались, но эти же условия не оказывали значительного влияния на биохимический состав зеленого и фиолетового базилика [10].

**Содержание нитратов.** Контроль за содержанием нитратов в микрозелени является важным компонентом получения качественной безопасной продукции. Наши результаты показывают, что содержание нитратов значительно снижалось при выращивании растений в условиях СЛ (серии опытов 1 и 2), а также при использовании СЛ в конце продукционного периода (серия опытов 3). Это согласуется с данными о снижении содержания нитратов на 17% у растений руколы при выращивании в условиях СЛ по сравнению с 12-часовым фотопериодом [4]. Также было отмечено значительное (до 56%) снижение содержания нитратов в растениях салата, которые перед сбором урожая подвергали воздействию СЛ в течение 2–3 сут [3, 27]. В целом известно, что световые условия, а именно интенсивность освещения, спектральный состав света и фотопериод являются важными факторами, влияющими на содержание нитратов в растениях [4, 33, 34]. Также отмечена довольно выраженная видоспецифичность в реакциях растений на свет по содержанию нитратов в растениях [8, 34].

Известно, что содержание нитратов в растениях отрицательно коррелирует с концентрацией растворимых, неструктурных форм углерода, таких как сахара и органические кислоты [35], потому что они играют комплементарные роли в поддержании тургора клеток [36]. Поэтому значительное снижение содержания нитратов в условиях СЛ может быть связано с усилением синтеза углеводов и увеличением содержания ферредоксина и НАДФН, которые используются при редукции нитратов в листьях [11, 37]. Однако, с увеличением продолжительности СЛ синтез фермента нитратредуктазы (НР) и НАДФН *de novo* может снижаться [38]. Снижение содержания нитратов в условиях СЛ также может быть вызвано более высокой активностью НР в результате увеличения уровня экспрессии генов НР [4, 39]. Нитратредуктаза является ключевым ферментом, лимитирующим скорость восстановления нитрат-иона до нитрит-иона.

Свет влияет на активность НР в растениях, регулируя процессы транскрипции генов НР, трансляцию и посттрансляционную активность [40]. Предполагается, что свет может регулировать активность НР двумя способами, а именно регулируя экспрессию генов НР продуктами фотосинтеза и регулируя состояние НР через НАДФН [34].

В целом, результаты наших исследований показывают, что растения брокколи, мизуны, редиса и руколы на ранних фазах роста устойчивы к действию СЛ и не проявляют типичных признаков фотоповреждения листьев. Более того, за счет использования СЛ без увеличения энергетических затрат (при сохранении ИДО) возможно увеличение урожайности и пищевой ценности микрозелени брокколи, мизуны, редиса и руколы и снижения содержания в ней нитратов по сравнению со стандартным 16-часовым фотопериодом. Очевидно, испытывая под действием СЛ умеренный окислительный стресс, растения накапливают больше низкомолекулярных антиоксидантов (антоцианы, флавоноиды, каротиноиды, пролин) и отличаются повышенной активностью антиоксидантных ферментов. Это увеличивает пищевую ценность микрозелени, которая рекомендуется в качестве функционального продукта ("functional food") для здорового питания. Повышение пищевой ценности и снижение содержания нитратов также возможно при применении СЛ (в качестве агротехнического приема) в течение нескольких дней в конце производственного периода (непосредственно перед сбором урожая), получая при этом экономию электроэнергии, затраченной на выращивание микрозелени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00033а. Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук" в рамках государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0004).

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. *Treadwell D.D., Hochmuth R., Landrum L., Laughlin W.* Microgreens: A new specialty crop // Univ. Florida IFAS Ext. Bul. 2020. HS1164  
<https://doi.org/journals.flvc.org/edis/article/view/118552>
2. *Xiao Z., Codling E.E., Luo Y., Nou X., Lester G.E., Wang Q.* Microgreens of *Brassicaceae*: Mineral composition and content of 30 varieties // J. Food Compos. Anal. 2016. V. 49. P. 87.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.04.006>
3. *Zhou W., Wenke L., Qichang Y.* Reducing nitrate content in lettuce by pre-harvest continuous light delivered by red and blue light-emitting diodes // J. Plant Nutr. 2013. V. 36. P. 481.  
<https://doi.org/10.1080/01904167.2012.748069>
4. *Proietti S., Moscatello S., Riccio F., Downey P., Battistelli A.* Continuous lighting promotes plant growth, light conversion efficiency, and nutritional quality of *Eruca vesicaria* (L.) Cav. in controlled environment with minor effects due to light quality // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. 730119.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.730119>
5. *Jones-Baumgardt C., Llewellyn D., Ying Q., Zheng Y.* Intensity of sole-source light-emitting diodes affects growth, yield, and quality of *Brassicaceae* microgreens // HortSci. 2019. V. 54. P. 1168.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13788-18>
6. *Trejo-Tellez L.I., Estrada-Ortiz E., Gomez-Merino F.C., Becker C., Krumbein A., Schwarz D.* Flavonoid, nitrate and glucosinolate concentrations in Brassica species are differentially affected by photosynthetically active radiation, phosphate and phosphate // Front Plant Sci. 2019. V. 10. P. 371.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00371>
7. *Artés-Hernández F., Castillejo N., Martínez-Zamora L.* UV and visible spectrum LED lighting as abiotic elicitors of bioactive compounds in sprouts, microgreens, and baby leaves. A comprehensive review including their mode of action // Foods. 2022. V. 11. P. 265.  
<https://doi.org/10.3390/foods11030265>
8. *Viršilė A., Brazaitytė A., Vaštakaitė-Kairienė V., Miliauskienė J., Jankauskienė J., Novičkovas A., Laužikė K., Samuolienė G.* The distinct impact of multi-color LED light on nitrate, amino acid, soluble sugar and organic acid contents in red and green leaf lettuce cultivated in controlled environment // Food Chem. 2020. V. 310. 125799.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125799>
9. *Yan Z., He D., Niu G., Zhou Q., Qu Y.* Growth, nutritional quality, and energy use efficiency of hydroponic lettuce as influenced by daily light integrals exposed to white versus white plus red light-emitting diodes // HortSci. 2019. V. 54. P. 1737.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI14236-19>
10. *Lanoue J., St Louis S., Little C., Hao X.* Continuous lighting can improve yield and reduce energy costs while increasing or maintaining nutritional contents of microgreens // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. 983222.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.983222>
11. *Velez-Ramirez A.I., Van Ieperen W., Vreugdenhil D., Millenaar F.F.* Plants under continuous light // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 310.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.003>
12. *Sysoeva M.I., Markovskaya E.F., Shibaeva T.G.* Plants under continuous light: a review // Plant Stress. 2010. V. 4. P. 5.
13. *Shibaeva T.G., Sherudilo E.G., Rubaeva A.A., Titov A.F.* Continuous LED lighting enhances yield and nutritional value of four genotypes of *Brassicaceae* microgreens // Plants. 2022. V. 11. P. 1.  
<https://doi.org/10.3390/plants11020176>
14. *Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.* Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. 1983. V. 603. P. 591.

15. Kolupaev Y.E., Fisova E.N., Yastreb T.O., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. Effect of hydrogen sulfide donor on antioxidant state of wheat plants and their resistance to soil drought // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 59. <https://doi.org/10.1134/S1021443719010084>
16. Методические указания по определению нитратов и нитритов в продукции растениеводства 5048-89. М., 1989.
17. Poorter H., Niinemets U., Ntagkas N., Siebenk A., Maenpa M., Matsubara S., Pons T.L. A meta-analysis of plant responses to light intensity for 70 traits ranging from molecules to whole plant performance // New Phytol. 2019. V. 223. P. 1073. <https://doi.org/10.1111/nph.15754>
18. Koontz H.V., Prince R.P. Effect of 16 and 24 hours daily radiation (light) on lettuce growth // HortSci. 1986. V. 21. P. 123. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.21.1.123>
19. Weaver G., van Iersel M.W. Photochemical characterization of greenhouse-grown lettuce (*Lactuca sativa* L. 'Green Towers') with applications for supplemental lighting control // HortSci. 2019. V. 54. P. 317. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13553-18>
20. Weaver G., van Iersel M.W. Longer photoperiods with adaptive lighting control can improve growth of greenhouse-grown 'Little gem' lettuce (*Lactuca sativa*) // HortSci. 2020. V. 55. P. 573. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14721-19>
21. Aikman D.P. Potential increase in photosynthetic efficiency from the redistribution of solar radiation in a crop // J. Exp. Bot. 1989. V. 40. P. 855. <https://doi.org/10.1093/jxb/40.8.855>
22. Palmer S., van Iersel M.W. Increasing growth of lettuce and mizuna under sole-source LED lighting using longer photoperiods with the same daily light integral // Agronomy. 2020. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111659>
23. Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G., Titov A.F. The role of photosynthetic daily light integral in plant response to extended photoperiods // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69, 7. <https://doi.org/10.1134/s1021443722010216>
24. Pennisi G., Orsini F., Landolfo M., Pistillo A., Crepaldi A., Nicola S., Fernández J.A., Marcellis L.F.M., Gianquinto G. Optimal photoperiod for indoor cultivation of leafy vegetables and herbs // Eut. J. Hort. Sci. 2020. V. 85. P. 329. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2020/85.5.4>
25. Llorente B., Martínez-García J., Stange C., Rodríguez-Concepción M. Illuminating colors: regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light // Curr. Opin. Plant Biol. 2017. V. 37. P. 49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.011>
26. Proietti S., Moscatello S., Leccese A., Colla G., Battistelli A. The effect of growing spinach (*Spinacia oleracea* L.) at low light intensities on the amounts of oxalate, ascorbate and nitrate in their leaves // J. Hort. Sci. Biotechnol. 2004. V. 79. P. 606. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511814>
27. Bian Z.-H., Cheng R.-F., Yang Q.-C., Wang J., Lu C. Continuous light from red, blue, and green light-emitting diodes reduces nitrate content and enhances phytochemical concentrations and antioxidant capacity in lettuce // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2016. V. 141. P. 186. <https://doi.org/10.21273/JASHS.141.2.186>
28. Haque M.S., de Sousa A., Soares C., Kjaer K.H., Fidalgo F., Rosenqvist E., Ottosen C.-O. Temperature variation under continuous light restores tomato leaf photosynthesis and maintains the diurnal pattern in stomatal conductance // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1602. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01602>
29. Kumar D., Singh H., Bhatt U., Soni V. Effect of continuous light on antioxidant activity, lipid peroxidation, proline and chlorophyll content in *Vigna radiata* L // Funct. Plant Biol. 2022. V. 49. P. 145. <https://doi.org/10.1071/FP21226>
30. Fan X.-X., Xue F., Song B., Chen L.-Z., Xu G., Xu H. Effects of blue and red light on growth and metabolism in pakchoi // Open Chem. 2019. V. 17. P. 456. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0038>
31. Paradiso R., Proietti S. Light-quality manipulation to control plant growth and photomorphogenesis in greenhouse horticulture: the state of the art and the opportunities of modern led systems // J. Plant Growth Regul. 2021. V. 21. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10337-y>
32. Alrifai O., Hao X., Liu R., Lu Z., Marcone M.F., Tsao R. Amber, red and blue LEDs modulate phenolic contents and antioxidant activities in eight cruciferous microgreens // J. Food Bioact. 2020. V. 11. P. 95. <https://doi.org/10.31665/jfb.2020.11241>
33. Bian Z.H., Yang Q.C., Liu W.K. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review // J. Sci. Food Agric. 2015. V. 95. P. 869. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6789>
34. Signore A., Bell L., Santamaria P., Wagstaff C., Van Labeke M.-C. Red light is effective in reducing nitrate concentration in rocket by increasing nitrate reductase activity, and contributes to increased total glucosinolates content // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 604. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00604>
35. Champigny M.L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants // Photosynth. Res. 1995. V. 46. P. 117. <https://doi.org/10.1007/BF00020422>
36. Veen B.W., Kleinendorst A. Nitrate accumulation and osmotic regulation in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) // J. Expt. Bot. 1985. V. 36. P. 211.
37. Huner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. Energy balance and acclimation to light and cold // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. P. 224. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01248-5)
38. Lillo C. Light regulation of nitrate uptake, assimilation and metabolism // Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. Plant Ecophysiology. V. 3. / Eds Amâncio S., Stulen I. Dordrecht: Springer. 2004. P. 149. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2728-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2728-4_6)
39. Nawaz M.Q. Effect of different sowing methods and nitrogen levels on fodder yield of oat in salt affected soil // Pakistan J. Agricul. Research. 2017. V. 30. P. 323. <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2017/30.4.323.328>
40. Liandong Q., Shiqi L., Li X., Wenyan Y., Qingling L., Shuqin H. Effects of light qualities on accumulation of oxalate, tannin and nitrate in spinach // Transactions of the CSAE. 2007. V. 23. P. 201. <https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1002-6819.2007.4.040>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ АККЛИМАЦИИ К ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ  
НА МЕХАНИЗМЫ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ У ВИДОВ  
С РАЗНЫМ ТИПОМ ФОТОСИНТЕЗА: *Sedobassia sedoides* (C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>)  
И *Bassia prostrata* (C<sub>4</sub>-НАДФ)<sup>1</sup>

© 2023 г. Е. В. Шуйская<sup>а</sup>, \*, З. Ф. Рахманкулова<sup>а</sup>, М. Ю. Прокофьева<sup>а</sup>, В. В. Казанцева<sup>а</sup>,  
Н. Ф. Лунькова<sup>а</sup>, Л. Т. Саидова<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: evshuya@gmail.com

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Исследовали действие засухи на морфофизиологические, биохимические и молекулярно-генетические параметры растений *Sedobassia sedoides* (Pall.) Freitag & G. Kadereit с промежуточным C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>-типом фотосинтеза и *Bassia prostrata* (L.) A. J. Scott с C<sub>4</sub>-НАДФ-типом фотосинтеза, выращенные при разных температурах (25 и 30°C). Снижение биомассы, содержания воды и эффективности квантового выхода ФС II (Ф<sub>ФСII</sub>), а также усиление экспрессии гена *psbA*, кодирующего белок D1 ФС II, при действии засухи наблюдалось у обоих видов, независимо от температуры выращивания. В условиях засухи при 25°C у обоих видов наблюдалось снижение содержания фотосинтетических ферментов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) и фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк), которое у *S. sedoides* сопровождалось значительным усилением экспрессии генов *rbcL* и *PPDK*. Акклимация растений *S. sedoides* к повышенной температуре приводила к усилению активности циклического транспорта электронов ФС I, а также к смягчению негативного действия засухи на световые реакции фотосинтеза (снижение NPQ) и содержание фермента ФЕПк на фоне сдвига ионного баланса за счет снижения содержания калия. *B. prostrata* проявил большую засухоустойчивость и характеризовался большей термоллабильностью фотосинтетических ферментов, изменения в содержании и соотношении которых позволили данному виду поддерживать рост в условиях засухи при разной температуре.

**Ключевые слова:** *Bassia prostrata*, *Sedobassia sedoides*, Chenopodiaceae, осмотический стресс, РБФК/О, ФЕПк, фотосистемы I и II, экспрессия генов

**DOI:** 10.31857/S0015330323600195, **EDN:** QXDQTT

## ВВЕДЕНИЕ

Изменение климата является одной из самых серьезных экологических проблем. Экстремально жаркие и засушливые периоды становятся более частыми и продолжительными во всем мире, и прогнозируется их дальнейшее усиление с повышением температуры [1–3]. Засуха снижает активность фотосинтеза, содержание пигментов, ухудшает целостность мембран, осмотическую регуляцию, что ограничивает рост, развитие и урожайность растений [1]. Снижение фотосинтеза может быть следствием “устычных” или “неустычных” (метаболических) ограничений [4]. Дефицит воды ведет к снижению нециклического

транспорта электронов и фотохимической эффективности ФС II, часто за счет деградации белка D1, который является самым уязвимым среди внутренних компонентов ФС II [5]. Также осмотический стресс может вызвать активацию циклического транспорта электронов (ЦТЭ) ФС I [6]. При этом влияние засухи на экспрессию генов, кодирующих основные компоненты фотосистем, может быть как стимулирующим [7], так и подавляющим [8]. Снижение доступности CO<sub>2</sub> вследствие устьичных ограничений в тканях листа может вести к снижению активности ключевого фермента фотосинтеза рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О), в зависимости от интенсивности засухи и видовых различий [9]. Засуха также по-разному влияет на экспрессию генов *rbcL* и *RbcS* [3, 10], и снижение содержания РБФК/О может быть, в том числе,

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330323600195 для авторизованных пользователей.

следствием усиления процессов деградации белка, вызванных стрессовыми условиями. Показано, что РБФК/О может использоваться растениями как запас азота/аминокислот, который выводится из хлоропластов и хранится в вакуолях, в стрессовых условиях РБФК/О активно расщепляется протеазами и направляется в другие органы для поддержания синтеза белков [11, 12]. Вторым ключевым ферментом фотосинтеза у  $C_4$ -видов является фосфоенолпируваткарбоксилаза (ФЕПк), изменение содержания и активности которого, в условиях засухи, сопряжено с изменением содержания и активности РБФК/О у разных видов как в сторону увеличения [13], так и в сторону понижения [14]. Показано, что внедрение гена  $C_4$ -ФЕПк в  $C_3$ -растения увеличивает их засухоустойчивость [15]. Еще одним важным ферментом  $C_4$ -пути является фосфатдикиназа (PPDK), которая присутствует в хлоропластах и цитоплазме как  $C_4$ -, так и  $C_3$ -растений, и участвует в ассимиляции азота, синтезе жирных кислот и осмотически активных соединений [16]. Накопление данного фермента индуцируется различными абиотическими стрессами, в том числе и засухой [16].

Большинство растений независимо от типа фотосинтеза демонстрируют значительную способность приспосабливать свои фотосинтетические характеристики к температуре окружающей среды, что называется температурной акклимацией. При этом  $C_4$ -растения, по сравнению с  $C_3$ -видами, изначально лучше адаптированы к более высоким температурам [17]. Повышение температуры выращивания вызывает у растений увеличение оптимальной температуры фотосинтеза и делает фотосинтетический аппарат более устойчивым к тепловому стрессу [18]. Повышение устойчивости обусловлено оптимизацией работы наиболее уязвимых к увеличению температуры систем, которыми являются кислород-выделяющий комплекс в фотосистеме II (ФС II), система генерации АТФ и фиксация углерода РБФК/О из-за РБФК/О-активазы [18], в том числе за счет увеличения активности циклического транспорта электронов (ЦТЭ) ФС I для поддержания синтеза АТФ [17]. Тепловой стресс также активирует термочувствительные ферменты и экспрессию большинства генов, участвующих в энергетическом и липидном обмене, биосинтезе пигментов и фотосинтезе [18]. Так, биохимические характеристики РБФК/О могут меняться под действием температуры, что способствует акклимации растения к изменениям температуры [19].  $C_4$ -растения имеют свои особенности биохимических ограничений при повышенной температуре. Показано, что скорость фиксации  $CO_2$  РБФК/О у видов с малатным (НАДФ)  $C_4$ -типом фотосинтеза выше при любой температуре, чем у  $C_3$ - и промежуточных  $C_3$ - $C_4$  ( $C_2$ )-видов, при этом при повышении

температуры скорость фиксации  $CO_2$  РБФК/О у всех видов увеличивается и разница между видами с разным типом фотосинтеза также увеличивается [20, 21]. Молекулярно-генетические исследования показали, что тепловой стресс вызывает быстрое перепрограммирование экспрессии широкого спектра генов, имеющих решающее значение для снижения негативного эффекта температурного воздействия, однако до сих пор относительно мало известно об изменении экспрессии пластидного генома, хотя компоненты фотосинтетического аппарата являются основными мишенями термического повреждения [22].

Путь  $C_4$ -фотосинтеза опирается на скоординированную систему анатомических и биохимических признаков, которые обеспечивают концентрирование  $CO_2$  вокруг РБФК/О в клетках обкладки проводящих пучков, что предотвращает реакцию окисления РБФК/О и тем самым подавляет фотодыхание, делая  $C_4$ -растения более успешными в открытых и теплых местообитаниях по сравнению с  $C_3$ -видами [2, 23]. Считается, что  $C_4$ -фотосинтез формировался постепенно у  $C_3$ -видов через промежуточные стадии  $C_3$ - $C_4$ -фотосинтеза [23, 24]. Рассматриваются четыре отдельных этапа эволюционного перехода от  $C_3$ - к  $C_4$ -фотосинтезу (промежуточного  $C_3$ - $C_4$ -фотосинтеза): прото-Кранц –  $C_2$  (Туре I и II) –  $C_4$ -like фотосинтез, в ряду которых идет нарастание  $C_4$ -особенностей [25]. При этом есть точка зрения, что  $C_2$ -фотосинтез является стабильным эволюционным состоянием и не всегда ведет к  $C_4$ -фотосинтезу [26, 27]. Растения с промежуточным  $C_3$ - $C_4$ -фотосинтезом используют фотодыхательный углеродный насос, или глициновый челнок, для захвата  $CO_2$ , высвобождаемого в результате фотодыхательной активности мезофилла, и транспортировки его в клетки обкладки проводящих пучков для повторного использования в цикле Кальвина. При этом происходит усиление активности циклического транспорта электронов ФС I в связи с увеличением потребности в АТФ, необходимого для функционирования глицинового челнока [24]. Наличие высокого уровня внутривидового и внутривидового фотосинтетического разнообразия и пластичности показано для разных  $C_3$ - $C_4$ -видов, что усложняет определение принадлежности растений к разным типам  $C_2$ -фотосинтеза [23, 26, 28]. В то же время, присущая  $C_2$ -растениям физиологическая пластичность, позволяет им обитать в широких экологических диапазонах [27]. Несмотря на общее предпочтение более теплого климата,  $C_2$ -растения встречаются в более прохладных регионах, чем  $C_4$ -виды [23]. Сравнительный анализ адаптации  $C_2$ - и  $C_4$ -растений близких видов одного семейства к повышенной температуре и засухе ранее не проводился.

Целью данной работы было изучение способности растений  $C_3$ – $C_4$  ( $C_2$ )-вида *Sedobassia sedoides* и  $C_4$ -НАДФ-вида *Bassia prostrata* к акклимации к повышенной температуре и ее влияния на устойчивость к осмотическому стрессу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Растительный материал и условия эксперимента.

Семена галофитов *Sedobassia sedoides* (Pall.) Freitag & G. Kadereit (*Bassia sedoides* (Pall.) Asch) и *Bassia prostrata* (L.) A.J. Scott (*Kochia prostrata* (L.) Schrad.) (подсемейство Chenopodiaceae) были собраны в естественных местообитаниях Прикаспийской низменности (Волгоградская область). Семена замачивали в дистиллированной воде для проращивания. 3–4-дневные проростки высаживали на перлит, пропитанный 50% раствором Холганда. После появления настоящих листьев для оптимального роста в питательный раствор Холганда добавляли NaCl до конечной концентрации 50 мМ. Растения выращивали в двух отдельных камерах температурой 25°C и 30°C под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), 16-часовом фотопериоде. После 30 дней выращивания часть растений поливали 15.8% раствором ПЭГ6000 в течение 4 дней. Всего было 4 группы растений каждого вида: (1) контрольные растения, выращенные при 25°C без обработки ПЭГ; (2) растения, выращенные при 25°C и 4-дневной обработке ПЭГ; (3) растения, выращенные при 30°C без обработки ПЭГ; (4) растения, выращенные при 30°C и 4-дневной обработке ПЭГ.

**Определение содержания воды, пролина и ионов натрия и калия.** Для определения сухой биомассы растительные пробы высушивали при 80°C до постоянной массы. Содержание воды (W) рассчитывали по формуле и выражали в г H<sub>2</sub>O/г сухой массы:

$$W = (FW - DW)/DW, \quad (1)$$

где FW – сырая биомасса, DW – сухая биомасса.

Содержание ионов натрия и калия в побегах определяли в водной вытяжке высушенных образцов (100 мг) на пламенном фотометре ФПА-2-01 (“АООТ ЗОМЗ”, Россия) и выражали в ммоль/г сухой массы.

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates [29] с модификациями. В качестве анализируемых экстрактов использовали водные вытяжки высушенного и растертого материала. Результаты рассчитывали на 1 г сухой массы.

**Фотосистема I.** Изменение окислительно-восстановительного потенциала P700 измеряли путем мониторинга оптической плотности листьев при 820 нм с использованием dual-wavelength си-

стемы импульсной модуляции ED-P700DW (“Heinz-Walz, Effeltrich”, Германия) в сочетании с РАМ-101 (“Heinz-Walz”, Германия). Кинетика окисления P700 измерялась при освещении дальним красным светом (720 нм, 17.2 Вт/м<sup>2</sup>). Максимальное окисление P700 определяли с использованием ксеноновой газоразрядной лампы (50 мс, 1500 Вт/м<sup>2</sup>, “Heinz-Walz”, Германия) в присутствии дальнего красного света.

**Фотосистема II.** Определение квантового выхода флуоресценции ФС II адаптированного к темноте (20 мин) фрагмента листа осуществляли с помощью РАМ-флуориметра (РАМ-101, “Heinz-Walz”, Германия). Измеряли темновой максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II ( $F_v/F_m$ ). Измерение проводили с досветкой образца слабым модулированным потоком красного света, которое осуществлялось АЦПУ (PDA-100, “Walz”, Германия), преобразующим первичный сигнал от РАМ-101 на компьютер со специализированным программным интерфейсом. Расчет показателей проводили на основании текущего значения минимальной ( $F_0$ ) и максимальной ( $F_m$ ) флуоресценции адаптированного к темноте листа по формуле:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m. \quad (2)$$

Эффективный квантовый выход фотохимии ФС II при заданной интенсивности света рассчитывали по формуле:

$$\Phi_{ФСII} = F'_q/F'_m, \quad (3)$$

где  $F'_q$  – фотохимическое тушение флуоресценции открытым реакционным центром ФС II, а  $F'_m$  – максимальная флуоресценция после световой адаптации.

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (NPQ) рассчитывали по формуле:

$$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m. \quad (4)$$

**Определение содержания белков рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (РБФК/О) и фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк) с помощью вестерн-блоттинга.** Тотальный белок экстрагировали из 0.2–0.5 г надземной части растения, которую измельчали в жидком азоте и 1–2 мл экстракционного буфера, содержавшего 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.3 мМ ЭДТА, 2% поливинилпирролидона и 5 мМ дитиотреитол. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C (центрифуга MiniSpin, “Eppendorf”, Германия). Содержание белка определяли по методу Бредфорд, используя бычий сывороточный альбумин (“Sigma-Aldrich”, США) в качестве стандарта.

Анализ содержания белков РБФК/О и ФЕПк проводили с помощью иммуноферментного анализа по стандартной методике [30] с использованием коммерческих поликлональных антител против

белков большой субъединицы (L) (БС) РБФК/О (RbcL, AS03037, "Agrisera", Швеция) и ФЕПк (PEPC, AS09458, "Agrisera", Швеция). Разделение суммарных белков (10–15 мкг тотального белка в слоте) проводили с помощью 10% денатурирующего гель-электрофореза (SDS-PAGE) по методу Laemmli [31] с использованием маркеров стандартной молекулярной массы ("BioRad", США). После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану ("Amersham, GE Healthcare", Великобритания), используя прибор для мокрого блоттинга ("BioRad", США) согласно стандартному протоколу. Белки БС РБФК/О и ФЕПк визуализировали при помощи кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с флуоресцентными красителями люминолом и кумариновой кислотой ("Sigma", США) и пленки Retina XBE (Германия). Интенсивность полос в вестерн-блоттинге оценивали с помощью программы ImageJ 1.37v (США) и выражали относительно среднего уровня ( $n = 3$ ) для контрольных растений, который был взят за 100%. Анализ проводили не менее 3 раз.

**Выделение РНК** проводили фенол-хлороформной экстракцией с осаждением при помощи LiCl. Для экстракции РНК использовали смесь буфера (0.1 М LiCl, 0.1 М Трис-НСl (рН 7.5), 1% SDS, 10 мМ ЭДТА (рН 8)) с подкисленным фенолом (рН 4.5) в соотношении 1 : 1, разогретым до 90°C на водяной бане ("WB-4MS", Biosan, Латвия). К измельченной растительной ткани (400–500 мг) добавляли экстракционную смесь в соотношении 1 : 3. Для разделения фракций использовали хлороформ (500 мкл). Пробы центрифугировали в течение 15 мин при 12000 g (MiniSpin, "Eppendorf", Германия) при комнатной температуре. После третьего центрифугирования в супернатант добавляли 10 М LiCl до конечной концентрации 2.5 М LiCl и оставляли на ночь при 4°C. На следующий день РНК осаждали центрифугированием и промывали однократно 2 М LiCl и двукратно 80% этанолом. Осадок растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз. Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 ("ThermoScientific", США). Очистку РНК от геномной ДНК проводили согласно стандартному протоколу "ThermoScientific" (США) с использованием DNase I и RiboLock ("ThermoScientific", США).

**Обратную транскрипцию** проводили в два этапа. На первом этапе осуществляли отжиг праймеров для синтеза первой цепи тотальной кДНК на РНК матрице (Олиго(dT)<sub>15</sub> праймер и Random(dN)<sub>10</sub> праймер ("Евроген", Россия)) в течение 5 мин при 65°C (термостат ТТ-2 Термит, "ДНК-Технология", Россия). На втором этапе осуществляли обратную транскрипцию при помощи обратной транскриптазы MMLV ("Евроген", Россия), дНТФ ("ThermoScientific", США), добавляя RiboLock

("ThermoScientific", США). Концентрацию полученной кДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 ("ThermoScientific", США).

Праймеры для ПЦР (Дополнительные материалы, табл. 1) были подобраны с использованием Pick Primers NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) с функцией проверки специфичности пары праймеров ("Primer Pair Specificity Checking Parameters") и SnapGene Viewer (4.2.11) на нуклеотидных последовательностях, доступных в базе NCBI: праймеры к генам *rbcL Sedobassia sedoides* (AY270063.1), *Bassia prostrata* (AY270104.1), *PPDK Bienertia sinuspersici* (MK674493.1), *psaA Bassia littorea* (OK539756.1) и *Chenopodium quinoa* (LOC32958941), *psaB C. quinoa* (LOC32958940), *psbA Bassia scoparia* (AY251266.1) и *C. quinoa* (LOC32959011), *CAB C. quinoa* (LOC110735177). В качестве референсных генов использовали *UBQ10 C. quinoa* (LOC110721034) и *b-Tubulin C. quinoa* (XM\_021890176).

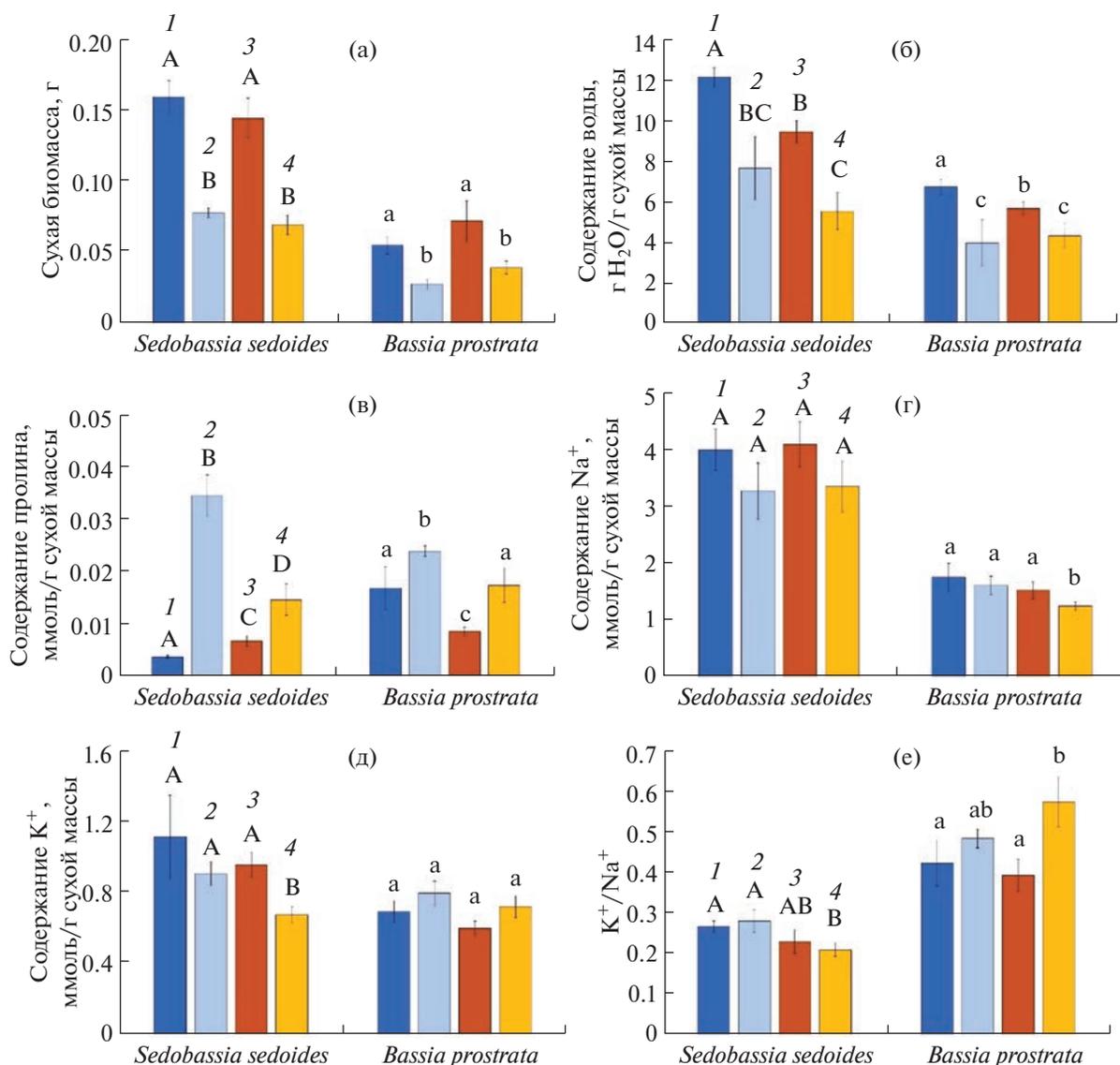
Проверку праймеров и определение размера ампликона проводили с помощью ПЦР (ТП4-ПЦР-01-Термик, "ДНК-Технология", Россия) и электрофореза в 2% агарозном геле. Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (ОТ-кПЦР) с помощью амплификатора Light Cycler96 ("Roche", Швейцария) с использованием красителя SybrGreen I ("Евроген", Россия). Данные по результатам ОТ-кПЦР анализировали в программе Light Cycler96 SoftwareVersion 1.1. Уровни транскриптов указаны относительно контрольных растений.

**Статистический анализ.** Во всех экспериментах было не менее трех биологических повторностей. Для корреляционного и факторного (ANOVA) анализа использовали программу SigmaPlot 12.0. На графиках приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Различия считались достоверными при  $P < 0.05$  (тест Тьюки). Для многофакторного анализа методом главных компонент (РСА) было использовано программное обеспечение R (версия 3.6.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Биомасса, содержание воды, пролина и ионов*

В контрольных условиях растения однолетнего вида *S. sedoides* характеризовались большей биомассой, чем растения многолетнего вида *B. prostrata* (рис. 1а). В условиях засухи наблюдалось 2-кратное снижение сухой биомассы (DW) у обоих видов независимо от температуры выращивания (рис. 1а). Выращивание растений *S. sedoides* и *B. prostrata* при повышенной температуре без обработки ПЭГ не приводило к изменению накоп-



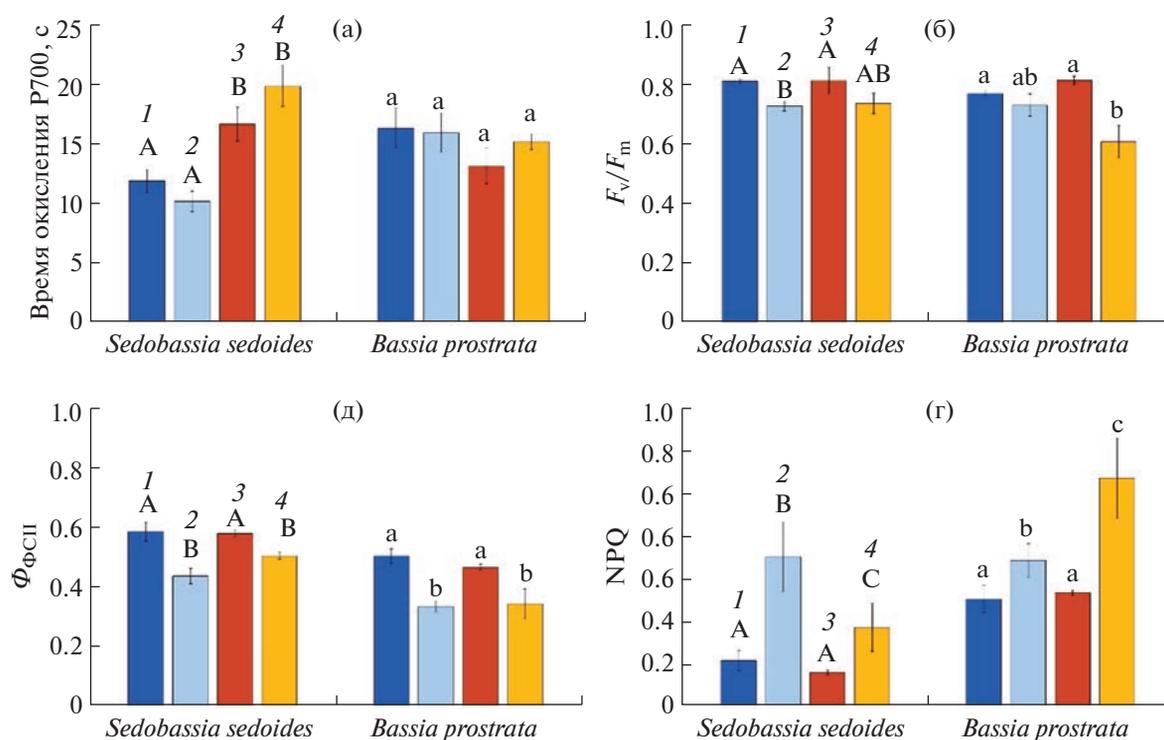
**Рис. 1.** Накопление сухой биомассы (а), содержание воды (б), пролина (в), ионов натрия (г) и калия (д), и отношение  $K^+/Na^+$  (е) у растений *Sedobassia sedoides* и *Bassia prostrata*, выращенных при разных температурах и кратковременном действии ПЭГ-индуцированной засухи. (1) Контрольные растения, выращенные при 25°C без обработки ПЭГ; (2) растения, выращенные при 25°C и 4-дневной обработке ПЭГ; (3) растения, выращенные при 30°C без обработки ПЭГ; (4) растения, выращенные при 30°C и 4-дневной обработке ПЭГ. Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$ .

ления сухой биомассы по сравнению с контрольными растениями у обоих видов (рис. 1а).

Содержание воды (W) в побегах контрольных растений *B. prostrata* было почти в 2 раза ниже, чем в побегах растений *S. sedoides* (рис. 1б). Воздействие на растения засухой при нормальной температуре выращивания (25°C) приводило к снижению содержания воды в побегах обоих видов растений на 67–70%. В условиях повышенной температуры (30°C) без обработки ПЭГ содержание воды в побегах *S. sedoides* и *B. prostrata* было на 20–30% ниже, чем в контроле, а действие засухи при этой температуре в большей степени влияло

на снижение содержания воды в побегах *S. sedoides*, чем у растений *B. prostrata* (рис. 1б).

Содержание пролина (Pro) в побегах контрольных растений *S. sedoides* было в 4.5 раза ниже, чем в контрольных растениях *B. prostrata* (рис. 1в). В условиях засухи при 25°C у растений *S. sedoides* наблюдалось повышение содержания пролина в 9.4 раза, а у растений *B. prostrata* – в 1.4 раза. При акклимации к повышенной температуре (30°C) у растений *S. sedoides* содержание пролина повышалось почти в 2 раза, в то время как у растений *B. prostrata* происходило его 2-кратное снижение, по сравнению с контролем. Воздействие засухи



**Рис. 2.** Фотосинтетические параметры у растений *Sedobassia sedoides* и *Bassia prostrata*, выращенных при разных температурах и кратковременном действии ПЭГ-индуцированной засухи. (а) Активность циклического транспорта электронов ФС I; (б) максимальный квантовый выход ФС II ( $F_v/F_m$ ); (в) эффективный квантовый выход фотохимии ФС II при заданной интенсивности света ( $\Phi_{\text{ФСII}}$ ); (г) нефотохимическое тушение флуоресценции ФС II (NPQ). (1) Контрольные растения, выращенные при 25°C без обработки ПЭГ; (2) растения, выращенные при 25°C и 4-дневной обработке ПЭГ; (3) растения, выращенные при 30°C без обработки ПЭГ; (4) растения, выращенные при 30°C и 4-дневной обработке ПЭГ. Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне  $P < 0.05$ .

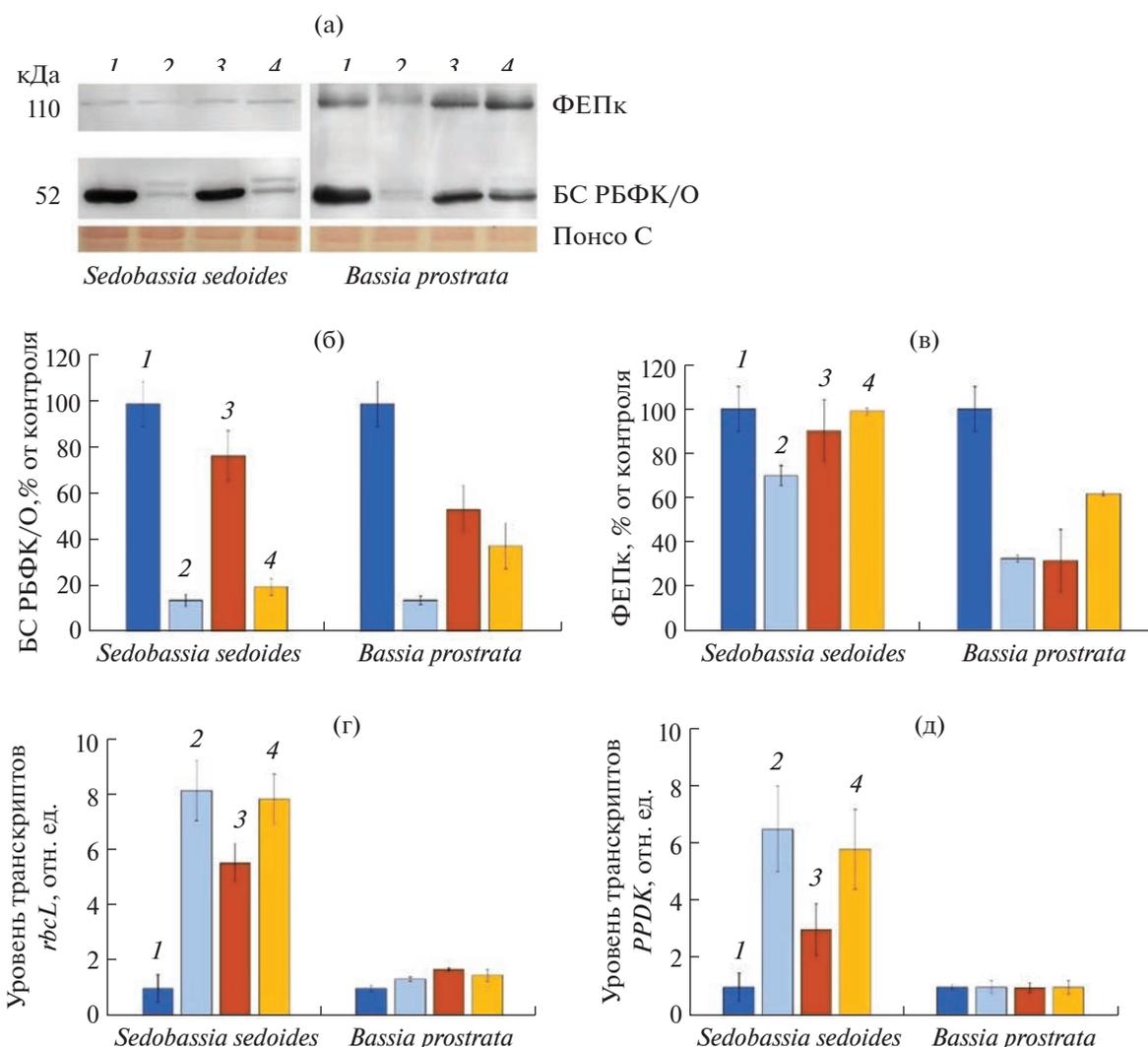
после акклимации к повышенной температуре приводило к увеличению содержания пролина примерно в 2 раза (относительно растений, выращенных при 30°C без обработки ПЭГ; рис. 1в) у обоих видов.

Содержание  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в побегах контрольных растений *S. sedoides* было выше, чем в побегах контрольных растений *B. prostrata* в 2.3 и 1.6 раза соответственно (рис. 1г, д). В условиях засухи при 25°C, а также при повышенной температуре без обработки ПЭГ изменений в содержании  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в растениях обоих видов не наблюдалось. При действии засухи при 30°C достоверное снижение содержания  $\text{Na}^+$  наблюдалось только у растений *B. prostrata* (рис. 1г), а  $\text{K}^+$  только у растений *S. sedoides* (рис. 1д). Отношение  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  в побегах контрольных растений *S. sedoides* было в 1.6 ниже, чем в контрольных растениях *B. prostrata* (рис. 1е). Изменения в отношении ионов  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  наблюдались только в условиях засухи при 30°C как у растений *B. prostrata* (повышение в 1.5 раза относительно контрольных растений и выращенных при 30°C без обработки ПЭГ), так и у растений *S. sedoides* (снижение в 1.3 раза по сравнению с растениями, выращенными при 25°C) (рис. 1е).

#### Активность циклического транспорта электронов ФС I и эффективность функционирования ФС II

В контрольных условиях активность циклического транспорта электронов (ЦТЭ) ФС I у растений *S. sedoides* была ниже, чем у *B. prostrata* (рис. 2а). Засуха не оказала влияния на активность ЦТЭ при 25°C. Акклимация к повышенной температуре привела к усилению активности циклического транспорта электронов ФС I у растений *S. sedoides*, до значений, характерных для  $\text{C}_4$ -видов, уровень которого сохранился и при действии засухи (при 30°C). У растений *B. prostrata* активность ЦТЭ оставалась постоянной при всех видах воздействия (рис. 2а).

Эффективность максимального квантового выхода фотосинтеза ФС II у растений обоих видов снижалась при воздействии засухи: у *S. sedoides* достоверно при 25°C, у *B. prostrata* при 30°C, но не изменялась при выращивании при повышенной температуре без воздействия засухи (рис. 2б). Эффективность квантового выхода ( $\Phi_{\text{ФСII}}$ ), т.е. эффективность фотохимии ФС II при данной интенсивности освещения достоверно снижалась относительно контроля у обоих видов при действии засухи независимо от температуры выра-



**Рис. 3.** Результаты вестерн-блоттинга белков БС РБФК/О (большая субъединица) (а, б), ФЕПк (а, в) и экспрессии генов *rbcL* (БС РБФК/О) (г) и *PPDK* (пируватфосфатдикиназа) (д) в побегах растений *Sedobassia sedoides* и *Bassia prostrata*, выращенных при разных температурах и кратковременном действии ПЭГ-индуцированной засухи. (1) Контрольные растения, выращенные при 25°C без обработки ПЭГ; (2) растения, выращенные при 25°C и 4-дневной обработке ПЭГ; (3) растения, выращенные при 30°C без обработки ПЭГ; (4) растения, выращенные при 30°C и 4-дневной обработке ПЭГ.

щивания (рис. 2в). Нефотохимическое тушение флуоресценции ФС II (NPQ) значительно возросло в условиях засухи: у растений *S. sedoides* больше при 25°C, а у растений *B. prostrata* больше при 30°C (рис. 2г).

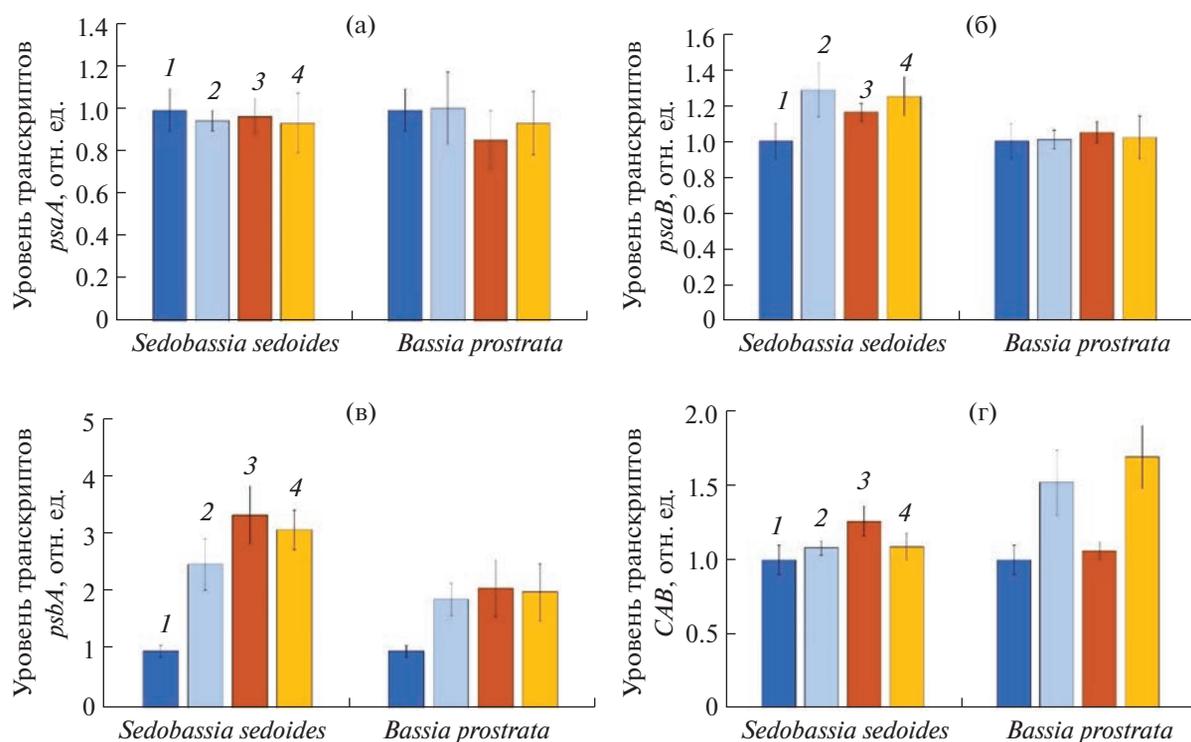
#### Содержание фотосинтетических ферментов

При воздействии засухи у растений *S. sedoides* содержание БС РБФК/О снижалось на 80–85% независимо от температуры выращивания. У растений *B. prostrata* воздействие засухи при 25°C приводило также к снижению содержания БС РБФК/О на 85%. При акклимации к повышенной температуре содержание БС РБФК/О снижалось на 20% у *S. sedoides* и 45% у *B. prostrata* (рис. 3а, б). В

условиях засухи при повышенной температуре содержание БС РБФК/О у *B. prostrata* оставалось таким же, как при выращивании при повышенной температуре без засухи (рис. 3а, б). Содержание ФЕПк у *S. sedoides* изменялось только в условиях засухи при 25°C, тогда как у *B. prostrata* содержание ФЕПк значительно снижалось при всех вариантах воздействия. Однако при воздействии засухи при повышенной температуре содержание ФЕПк оказалось в 2 раза выше, чем при действии данных факторов по отдельности (рис. 3а, в).

#### Экспрессия генов фотосинтетических белков

Засуха вызывала 8-кратное увеличение накопления транскриптов гена *rbcL* у растений *S. sedoides*



**Рис. 4.** Экспрессия генов *psaA* и *psaB* (апопротеины A1 и A2 ФС I) (а, б), *psbA* (белок D1 ФС II) (в) и *CAB* (хлорофилл *a/b*-связывающего белка LHCB/CAB ФС II) в побегах растений *Sedobassia sedoides* и *Bassia prostrata*, выращенных при разных температурах и кратковременном действии ПЭГ-индуцированной засухи. (1) Контрольные растения, выращенные при 25°C без обработки ПЭГ; (2) растения, выращенные при 25°C и 4-дневной обработке ПЭГ; (3) растения, выращенные при 30°C без обработки ПЭГ; (4) растения, выращенные при 30°C и 4-дневной обработке ПЭГ.

и незначительное повышение у растений *B. prostrata* независимо от температуры (рис. 3г). Акклимация к повышенной температуре привела к 6-кратному увеличению накопления транскриптов гена *rbcL* у *S. sedoides* и 70% накоплению у *B. prostrata*. Накопление транскриптов гена *PPDK* увеличилось в 6 раз при действии засухи и в 3 раза при акклимации к повышенной температуре у растений *S. sedoides* (рис. 3д). У *B. prostrata* количество транскриптов гена *PPDK* не изменялось при изменении условий. Количество транскриптов генов *psaA* и *psaB*, кодирующих апопротеины A1 и A2 ФС I соответственно, оставалось неизменным во всех вариантах эксперимента у обоих видов (рис. 4а, б). Количество транскриптов гена *psbA*, кодирующего белок D1 ФС II, у *S. sedoides* увеличивалось относительно контроля в среднем в 3 раза, а у *B. prostrata* в среднем в 2 раза при всех видах воздействия (рис. 4в). Накопление транскриптов гена *CAB* (хлорофилл *a/b*-связывающего белка LHCB/CAB ФС II) наблюдалось у *B. prostrata* при действии засухи, независимо от температуры, тогда как у *S. sedoides* оставалось неизменным (рис. 4г).

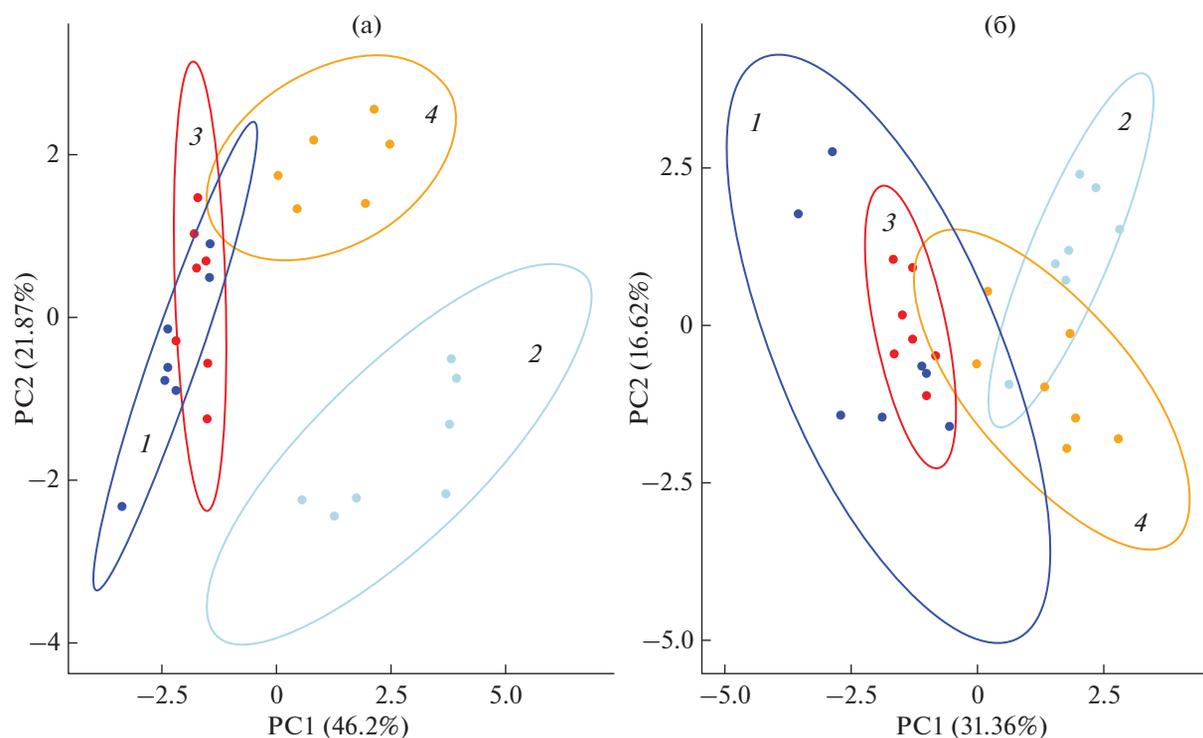
#### PCA анализ

Многофакторный анализ методом главных компонент (PCA) не показал значительных раз-

личий между растениями *S. sedoides*, выращенных при 25 и 30°C без воздействия засухи, но отделил от них растения, подвергнутые засухе первой основной компонентой (PC1), которая отражает 46.2% от общей вариации (рис. 5а). Основными элементами PC1 были эффективность ФС II и значения NPQ, а также содержание БС РБФК/О и пролина (табл. 1). PCA также показал четкое различие между эффектом засухи при 25 и 30°C на *S. sedoides* по второй основной компоненте (PC2), которая отражает 21.87% от общей вариации (рис. 5а). Основными элементами PC2 были эффективность ФС I (циклический транспорт), содержание  $K^+$ , отношения  $K^+/Na^+$  и содержание основного фермента  $C_4$ -цикла ФЕПк. Первых двух основных компонент достаточно для объяснения 68% изменений от общей вариации. Для *B. prostrata* многофакторный анализ методом главных компонент не показал четких различий между растениями при разных вариантах воздействия (рис. 5б).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Засуха является одним из самых распространенных факторов окружающей среды, ограничивающих фотосинтез и рост растений. У обоих изученных видов *S. sedoides* и *B. prostrata* в условиях



**Рис. 5.** Многофакторный анализ методом главных компонент (PCA) физиологических параметров, участвующих в процессе адаптации растений *Sedobassia sedoides* (а) и *Bassia prostrata* (б) к повышенной температуре и кратковременному действию ПЭГ-индуцированной засухи. (1) Контрольные растения, выращенные при 25°C без обработки ПЭГ; (2) растения, выращенные при 25°C и 4-дневной обработке ПЭГ; (3) растения, выращенные при 30°C без обработки ПЭГ; (4) растения, выращенные при 30°C и 4-дневной обработке ПЭГ.

**Таблица 1.** Факторные нагрузки физиологических параметров на главные компоненты (PC1 и PC2) многофакторного анализа (PCA) растений *Sedobassia sedoides* и *Bassia prostrata*, выращенных при разных температурах (25 и 30°C) и кратковременном действии ПЭГ-индуцированной засухи

Параметры	<i>Sedobassia sedoides</i>		<i>Bassia prostrata</i>	
	PC1	PC2	PC1	PC2
Содержание воды	-0.321	-0.225	-0.325	-0.226
Содержание пролина	<b>0.372</b>	-0.132	0.290	0.077
Содержание Na <sup>+</sup>	-0.288	-0.142	-0.194	0.629
Содержание K <sup>+</sup>	-0.218	<b>-0.489</b>	0.282	0.208
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	0.057	<b>-0.386</b>	0.356	-0.426
ЦТЭ (ФС I)	-0.013	<b>0.542</b>	0.093	0.333
ФС II	<b>-0.387</b>	-0.067	-0.238	0.053
NPQ	<b>0.391</b>	0.025	0.351	-0.270
Φ <sub>ФСII</sub>	-0.322	0.228	-0.391	-0.093
Содержание РБФК/О	<b>-0.379</b>	-0.021	-0.434	-0.260
Содержание ФЕПк	-0.270	<b>0.415</b>	-0.190	-0.244

Примечание. Полужирным шрифтом показаны наиболее значимые параметры. ЦТЭ (ФС I) – активность циклического транспорта электронов фотосистемы I; ФС II – максимальный квантовый выход флуоресценции фотосистемы II; NPQ – нефотохимическое тушение; Φ<sub>ФСII</sub> – эффективный квантовый выход фотохимии ФС II.

засухи при 25°C наблюдалось снижение биомассы и содержания воды в побегах (рис. 1). Однако различия между видами в увеличении содержания пролина (рис. 1), широко используемого в качестве маркера осмотического стресса [32], свидетельствуют о большем влиянии засухи на растения *S. sedoides*, чем *B. prostrata*. Фотосинтез рассматривается в числе первичных физиологических процессов, на которые влияет дефицит воды [9]. Наиболее чувствительной к стрессовым воздействиям является ФС II, что часто выражается в деградации белка D1 [5, 18]. У C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>-вида *S. sedoides* наблюдалось снижение эффективности ФС II на свету ( $\Phi_{\text{ФСII}}$ ) и 3.3-кратное усиление NPQ, что привело к достоверному снижению максимального квантового выхода ФС II (рис. 2). Повышение значений NPQ указывает на более высокое рассеивание (диссипацию) световой энергии в виде тепла при осмотическом стрессе [33]. При этом, наблюдалось значительное усиление экспрессии гена *psbA*, кодирующего D1 белок (рис. 4). Кроме того, значительный эффект засухи проявился в резком (на 85%) снижении содержания основного фермента цикла Кальвина РБФК/О у *S. sedoides* (рис. 3). Известно, что реакция растений на засуху видоспецифична и варьирует от незначительных изменений содержания и активности РБФК/О до их резкого снижения [9]. При этом у *S. sedoides* снижение содержания БС РБФК/О не было следствием снижения экспрессии гена *rbcL*, наоборот, наблюдалось 6-кратное увеличение его экспрессии, что характерно для некоторых C<sub>3</sub>-видов в условиях засухи [3, 10]. Данная диспропорция между содержанием транскриптов *rbcL* и белка БС РБФК/О может быть следствием посттранскрипционной регуляции [34] или усиления процессов деградации белка, вызванного стрессовыми условиями, когда РБФК/О активно расщепляется протеазами и направляется в другие органы растения для поддержания синтеза белков [11, 12]. Косвенным свидетельством усиления процесса деградации у *S. sedoides* может быть увеличение экспрессии гена *PPDK* в условиях засухи (рис. 4), так как *PPDK* участвует в ассимиляции азота и может играть важную роль в транспорте аминокислот и значительно ускорять мобилизацию азота из листьев [16].

У C<sub>4</sub>-НАДФ-вида *B. prostrata* засуха оказала менее негативное влияние на эффективность ФС II, что выражалось в меньшем изменении диссипации (NPQ) (рис. 2). При этом наблюдалось усиление экспрессии гена *SAB*, кодирующего хлорофилл *a/b*-связывающий белок (LHCB/SAB) ФС II, регуляция которого считается одним из важных механизмов регуляции функции хлоропластов в ответ на воздействие стрессовых факторов [18]. При схожем с *S. sedoides* снижении содержания БС РБФК/О, накопление транскриптов гена *rbcL* у

*B. prostrata* было значительно ниже, а экспрессия гена *PPDK* не изменилась, но происходило более значительное снижение содержания ФЕПк (рис. 3). Выявленные различия реакции ФЕПк и *PPDK* между видами, вероятно, связаны с различиями их функций: у C<sub>4</sub>-видов данные белки являются ключевыми фотосинтетическим ферментами, а у C<sub>3</sub>-видов и, возможно, у C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>-видов, при стрессе выполняют в основном защитные функции [35].

Акклимация к повышенной температуре привела к небольшому снижению содержания воды в побегах, что, однако, не отразилось на накоплении сухой биомассы у обоих видов (рис. 1). Выращивание при 30°C также не повлияло на эффективность ФС II у растений *S. sedoides* и *B. prostrata* (рис. 2), но вызвало 2–4-кратное увеличение накопления транскриптов гена *psbA* (рис. 4), в то время как количество транскриптов генов ФС I *psaA* и *psaB* у обоих видов оставалось неизменным. При этом у C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub>-вида *S. sedoides* наблюдалось увеличение активности ЦТЭ ФС I практически до уровня C<sub>4</sub>-НАДФ-вида *B. prostrata* (рис. 2). Считается, что увеличение ЦТЭ при высокой температуре может компенсировать протонную утечку тилакоидов, позволяя продолжать синтез АТФ [17]. Выращивание при 30°C привело к снижению содержания БС РБФК/О у обоих видов, но более значимо (в 2 раза) у *B. prostrata* (рис. 3). Вероятно, это связано с увеличением скорости фиксации CO<sub>2</sub> РБФК/О при повышении температуры, характерное для всех видов растений и, в особенности, для видов с малатным (НАДФ) C<sub>4</sub>-типом фотосинтеза [20, 21]. Свидетельством не стресс-индуцированного снижения содержания РБФК/О может быть сохранение накопления биомассы на уровне контрольных растений (рис. 1), а также результаты РСА (рис. 5). Так, многофакторный анализ не показал четкого разделения растений, выращенных при 25 и 30°C без воздействия засухи для обоих видов. На отсутствие значительного стресса указывает и снижение содержания пролина у *B. prostrata* по сравнению с контролем и относительно небольшое повышение этого показателя у *S. sedoides* (рис. 1). Более высокий уровень содержания БС РБФК/О у *S. sedoides* при повышенной температуре, чем у *B. prostrata*, вероятно, поддерживается более значительным усилением экспрессии гена *rbcL* (рис. 3). У *B. prostrata* при этом снижается содержание не только РБФК/О, но и C<sub>4</sub>-фермента ФЕПк, что позволяет поддерживать оптимальное для фотосинтеза соотношение РБФК/О/ФЕПк.

Несмотря на множественные свидетельства более негативного влияния на растения комбинированного стресса повышенной температуры и засухи, чем каждого из этих воздействий по отдельности [3, 36], у *S. sedoides* выращивание при 30°C смягчило негативное действие засухи на

ФС II, что выражалось в меньшей диссипации энергии (рис. 2г) и нивелировала негативный эффект на содержание ФЕПк (рис. 3). Однако данные изменения не отразились на накоплении биомассы при засухе (рис. 1), вероятно, в результате одинакового действия засухи на содержание БС РБФК/О и эффективность ФС II, независимо от температуры выращивания (рис. 2, 3). Таким образом, акклимация к повышенной температуре *S. sedoides* позволила избежать дополнительного негативного эффекта засухи, вызвав изменения в защитных реакциях процесса фотосинтеза и в поддержании водного баланса. При значительном снижении содержания воды в побегах *S. sedoides*, вызванном засухой, при 30°C наблюдалось значительно меньшее накопление пролина (в 2.5 раза по сравнению с контрольными растениями), снижение содержания калия и отношения  $K^+/Na^+$  (рис. 1, табл. 1). Это может свидетельствовать об уменьшении роли пролина в осморегуляции и изменении ионного баланса в пользу  $Na^+$ , что более характерно для галофитов [37] и, в частности, у *S. sedoides* большее накопление  $Na^+$  (в 3.5 раза) относительно  $K^+$  в контрольных условиях (рис. 1). Именно различия в активности ЦТЭ, содержании  $K^+$  и ФЕПк являются основными факторами четкого разделения второй главной компонентой РС2 растений  $C_3$ – $C_4$ -вида *S. sedoides*, выращенных при разной температуре в условиях засухи (рис. 5, табл. 1).

У  $C_4$ -НАДФ-вида *B. prostrata* так же, как у  $C_3$ – $C_4$ -вида *S. sedoides*, не наблюдалось дополнительного негативного влияния совместного действия повышенной температуры и засухи на накопление сухой биомассы, однако механизмы поддержания роста были другими. Засуха при 30°C привела к усилению диссипации энергии и, соответственно, к снижению максимальной эффективности ФС II (рис. 2), но, при этом, оказала менее негативный эффект на содержание фотосинтетических ферментов РБФК/О и ФЕПк (рис. 3). У  $C_4$ -видов марианской адаптации к стрессовым условиям связывают именно со значительной биохимической адаптацией: изменениями содержания РБФК/О и ферментов  $C_4$ -цикла, а также активацией осморегуляции [17, 38]. Значительный климатический ареал  $C_4$ -НАДФ-вида *B. prostrata* от южных полупустынь (Средняя Азия, Иран, Монголия, Китай) до северных лесостепей Евразии [39], вероятно, обусловлен именно широкой термоллабильностью фотосинтетических ферментов. Акклимация растений *B. prostrata* к повышенной температуре привела к восстановлению содержания пролина до уровня контрольных растений, снижению содержания натрия и повышению отношения  $K^+/Na^+$  в условиях засухи (рис. 1), то есть способствовала усилению роли ионов калия в водно-ионном балансе, что характерно для ксерофитных видов. О большей

засухоустойчивости  $C_4$ -НАДФ-вида *B. prostrata*, по сравнению с  $C_3$ – $C_4$ -видом *S. sedoides*, свидетельствует меньшее содержание воды и более высокое отношение  $K^+/Na^+$  в контрольных условиях (рис. 1), а также отсутствие четких различий в РСА анализе (рис. 5).

Таким образом,  $C_3$ – $C_4$ -вид *S. sedoides* оказался менее засухоустойчивым при обоих температурных режимах выращивания. Засуха негативно повлияла как на содержание основного фотосинтетического фермента, так и на эффективность ФС II, вызвав при этом значительное усиление экспрессии соответствующих генов *rbcL* и *psbA*. При этом акклимация растений *S. sedoides* к повышенной температуре привела к усилению активности циклического транспорта электронов ФС I, а также к смягчению негативного действия засухи на световые реакции фотосинтеза и содержание фермента ФЕПк на фоне сдвига ионного баланса в сторону натрия. У  $C_4$ -НАДФ-вида *B. prostrata* усилилась роль ионов калия в осморегуляции в условиях засухи при повышенной температуре. В целом, *B. prostrata* характеризуется более термоллабильными фотосинтетическими ферментами, изменения в содержании и соотношении которых позволяют данному виду поддерживать рост в условиях засухи при разной температуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 21-54-50006 ЯФ а) и в рамках государственного задания (тема № 122042700044-6).

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. IPCC. Future global climate: Scenario-based projections and near-term information // Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change / V. Masson-Delmotte, P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Pean, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekci, R. Yu, B. Zhou (Eds.). Cambridge University Press, 2021. P. 553.
2. Sonmez M.C., Ozgur R., Uzilday D., Turkan I., Ganie S.A. Redox regulation in  $C_3$  and  $C_4$  plants during climate change and its implications on food security // Food Energy Secur. 2022. V. 12: e387. <https://doi.org/10.1002/fes3.387>
3. Raja V., Qadir S.U., Alyemni M.N., Ahmad P. Impact of drought and heat stress individually and in combination on physio-biochemical parameters, antioxidant responses, and gene expression in *Solanum lycopersicum* // 3 Biotech. 2020. V. 10. P. 208. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02206-4>

4. Ripley B., Frole K., Gilbert M. Differences in drought sensitivities and photosynthetic limitations between co-occurring C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> (NADP-ME) Panicoid grasses // *Ann. Bot.* 2010. V. 105. P. 493. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp307>
5. Alyammahi O., Gururani M.A. Chlorophyll-*a* fluorescence analysis reveals differential response of photosynthetic machinery in melatonin-treated oat plants exposed to osmotic stress // *Agronomy.* 2020. V. 10. P. 1520. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101520>
6. Rakhmankulova Z.F., Shuyskaya E.V., Prokofieva M.Yu., Borovkov A.M., Voronin P.Yu. Comparative contribution of CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O exchange components to the process of adaptation to drought in xero-halophytes from the family Chenopodiaceae with different types of photosynthesis // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 494. <https://doi.org/10.1134/S102144372003019X>
7. Zhang Q., Huang J., Ke W., Cai M., Chen G., Peng C. Responses of *Sphagneticola trilobata*, *Sphagneticola calendulacea* and their hybrid to drought stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 11288. <https://doi.org/10.3390/ijms222011288>
8. da Silva M.C., Pinto P.I.S., Guerra R., Duarte A., Power D.M., Marques N.T. Gene transcripts responsive to drought stress identified in *Citrus macrophylla* bark tissue transcriptome have a modified response in plants infected by *Citrus tristeza virus* // *Sci. Hortic.* 2023. V. 307. P. 111526. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111526>
9. Galmés J., Aranjuelo I., Medrano H., Flexas J. Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors // *Photosynth. Res.* 2013. V. 117. P. 73. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9861-y>
10. Amoah J.N., Seo Y.W. Effect of progressive drought stress on physio-biochemical responses and gene expression patterns in wheat // *3 Biotech.* 2021. V. 11. P. 440. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02991-6>
11. He Y., Yu Ch., Zhou L., Chen Y., Liu A., Jin J., Hong J., Qi Y., Jiang D. Rubisco decrease is involved in chloroplast protrusion and Rubisco-containing body formation in soybean (*Glycine max.*) under salt stress // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 74: 118e124. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.008>
12. Yoshitake Y., Nakamura S., Shinozaki D., Izumi M., Yoshimoto K., Ohta H., Shimojima M. RCB-mediated chlorophagy caused by oversupply of nitrogen suppresses phosphate-starvation stress in plants // *Plant Physiol.* 2021. V. 185. P. 318. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab030>
13. AbdElgawad H., Avramova V., Baggerman G., Van Raemdonck G., Valkenbrog D., Van Ostade X., Guisez Y., Prinsen E., Asard H., Ende W., Beemster G. Starch biosynthesis is crucial for maintaining photosynthesis and leaf growth under drought stress // *Authorea.* 2020. <https://doi.org/10.22541/au.158498002.27084474>
14. Hussain T., Koyro H.-W., Zhang W., Liu X., Gul B. Liu X. Low salinity improves photosynthetic performance in *Panicum antidotale* under drought stress // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 481. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00481>
15. Jeanneau M., Vidal J., Gousset-Dupont A., Lebouteiller B., Hodges M., Gerentes D., Perez P. Manipulating PEPC levels in plants // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf061>
16. Yadav S., Rathore M.S., Mishra A. The pyruvate-phosphate dikinase (C<sub>4</sub>-SmPPDK) gene from *Suaeda monoica* enhances photosynthesis, carbon assimilation, and abiotic stress tolerance in a C<sub>3</sub> plant under elevated CO<sub>2</sub> conditions // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 345. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00345>
17. Yamori W., Hikosaka K., Way D.A. Temperature response of photosynthesis in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation // *Photosynth. Res.* 2014. V. 119. P. 101. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9874-6>
18. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Fomina I.R., Los D.A., Klimov V.V., Mimuro M., Mohanty P., Carpentier R. Inactivation and repair of photosynthetic machinery under heat stress // *Photosynthesis: overviews on recent progress and future perspective.* IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 2012. P. 189
19. Cavanagh A.P., Kubien D.S. Can phenotypic plasticity in Rubisco performance contribute to photosynthetic acclimation? // *Photosynth. Res.* 2014. V. 119. P. 203. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9816-3>
20. Sharwood R.E., Ghannoum O., Kapralov M.V., Gunn L.H., Whitney S.M. Temperature responses of Rubisco from Paniceae grasses provide opportunities for improving C<sub>3</sub> photosynthesis // *Nat. Plants.* 2016. V. 2. P. 16186. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.186>
21. Moore C.E., Meacham-Hensold K., Lemonnier P., Slatery R.A., Benjamin C., Bernacchi C.J., Lawson T., Cavanagh A.P. The effect of increasing temperature on crop photosynthesis: from enzymes to ecosystems // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 2822. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab090>
22. Danilova M.N., Kudryakova N.V., Andreeva A.A., Doroshenko A.S., Pojidaeva E.S., Kusnetsov V.V. Differential impact of heat stress on the expression of chloroplast-encoded genes // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 129. P. 90. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.023>
23. Lundgren M.R., Christin P.-A. Despite phylogenetic effects, C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub> lineages bridge the ecological gap to C<sub>4</sub> photosynthesis // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 241. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw451>
24. Munekage Y.N., Taniguchi Y.Y. A scheme for C<sub>4</sub> evolution derived from a comparative analysis of the closely related C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>–C<sub>4</sub> intermediate, C<sub>4</sub>-like, and C<sub>4</sub> species in the genus *Flaveria* // *Plant Mol. Biol.* 2022. V. 110. P. 445. <https://doi.org/10.1007/s11103-022-01246-z>
25. Sage R.F., Khoshravesh R., Sage T.L. From proto-Kranz to C<sub>4</sub> Kranz: building the bridge to C<sub>4</sub> photosynthesis // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 3341. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru180>
26. Lundgren M.R. C<sub>2</sub> photosynthesis: a promising route towards crop improvement? // *New Phytol.* 2020. V. 228. P. 1734. <https://doi.org/10.1111/nph.16494>
27. Walsh C.A., Bräutigam A., Roberts M.R., Lundgren M.R. Evolutionary implications of C<sub>2</sub> photosynthesis: how complex biochemical trade-offs may limit C<sub>4</sub> evolu-

- tion // J. Exp. Bot. 2023. V. 74. P. 707.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erac465>
28. *Rakhmankulova Z.F., Shuyskaya E.V., Khalilova L.A., Orlova Y.V., Burundukova O.L., Velivetskaya T.A., Ignat'ev A.V.* Ultra- and mesostructural response to salinization in two populations of  $C_3$ – $C_4$  intermediate species *Sedobassia sedoides* // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 835.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720040135>
29. *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.  
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
30. *Пождаева Е.С.* Вестерн-блот-гибридизация // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бином. Лаборатория знаний. 2011. С. 228.
31. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
32. *Szabados L., Savoure A.* Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 89.
33. *Brestic M., Zivcak M.* PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications // Molecular stress physiology of plants / Eds. G.R. Rout, A.B. Das. Dordrecht: Springer, 2013. P. 87.  
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-0807-5>
34. *Kusnetsov V.V.* Chloroplasts: structure and expression of the plastid genome // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 465.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443718030044>
35. *Singh J., Garai S., Das S., Thakur J.K., Tripathy B.C.* Role of  $C_4$  photosynthetic enzyme isoforms in  $C_3$  plants and their potential applications in improving agronomic traits in crops // Photosynth. Res. 2022. V. 154. P. 233.  
<https://doi.org/10.1007/s11120-022-00978-9>
36. *Xu Z.Z., Zhou G.S.* Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis* // Planta. 2006. V. 224. P. 1080.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-006-0281-5>
37. *Flowers T.J., Colmer T.D.* Plant salt tolerance: adaptation in halophytes // Ann. Bot. 2015. V. 115. P. 327.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu267>
38. *Liu H., Osborne C.P.* Water relations traits of  $C_4$  grasses depend on phylogenetic lineage, photosynthetic pathway, and habitat water availability // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 761.
39. *Dzyubenko N.I., Soskov Yu.D., Khusainov S.Kh., Agaev M.G.* Morphology and geography of the ecotypes *Kochia prostrata* (L.) Schrad. from Middle Asia, Kazakhstan and Mongolia // Sel'skokhozyaistvennaya Biol. 2009. V. 44 (5). P. 25.

## РОЛЬ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОК В АДАПТАЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ К НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

© 2023 г. Ю. В. Венжик<sup>а</sup>, \*, И. Е. Мошков<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: jul.venzhik@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 28.03.2023 г.

На проростках морозостойкого сорта озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) изучали изменения ультраструктурной организации клеток мезофилла, происходящие в процессе низкотемпературной адаптации (4°C, 7 сут). Установлено, что под влиянием низкой закалывающей температуры клетки листьев пшеницы увеличивались в размерах, при этом возрастала площадь цитоплазмы, в то время как размеры вакуоли уменьшались. Электронная плотность цитоплазмы визуально увеличивалась, в ней появлялись многочисленные везикулы. Кроме того, увеличивались размеры хлоропластов, а также количество хлоропластов, митохондрий и пероксисом на единицу площади среза клетки. Скопления митохондрий и пероксисом в виде цепочек были отмечены около хлоропластов в клетках закаленных проростков, а сами митохондрии изменяли свою форму с округлой на вытянутую или гантелевидную. Низкая температура также влияла на форму хлоропластов, которые из линзовидных становились более округлыми, в них обнаруживались выросты (стромулы). Значительные изменения под влиянием низкой температуры происходили в ультраструктуре хлоропластов: увеличивалось количество и размеры пластогбул, полностью исчезали крахмальные включения, снижались количество гран, среднее число тилакоидов в гране, высота и площадь грани, плотность фотосинтетических мембран в хлоропласте коэффициент его гранальности (отношение длины мембран тилакоидов в гранях к длине мембран стромальных тилакоидов). При этом в процессе низкотемпературного закалывания формировалась повышенная морозоустойчивость пшеницы, которую анализировали по выживаемости проростков и выходу электролитов из тканей листа после тестирующего промораживания. Показана взаимосвязь обнаруженных структурных трансформаций в клетках листьев пшеницы с функциональными и физиолого-биохимическими изменениями, происходящими у холодостойких растений в процессе низкотемпературной адаптации. Предполагается, что наблюдаемая ультраструктурная реорганизация клеток является одним из важных компонентов в сложной программе адаптации, а также звеном, необходимым для формирования повышенной устойчивости озимых злаков к низкой температуре.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, адаптация, вакуоль, мезофилл, митохондрии, низкая температура, пероксисомы, ультраструктура, устойчивость, хлоропласты, цитоплазма

DOI: 10.31857/S0015330323600250, EDN: WXBJLW

### ВВЕДЕНИЕ

Большая часть регионов Российской Федерации относится к территориям с неблагоприятными климатическими условиями, в первую очередь температурными, что является причиной существенных потерь урожая важных сельскохозяйственных культур. Климатическая нестабильность диктует необходимость изучения всех возможных механизмов и стратегий адаптации растений к изменениям температуры. Особую актуальность имеют исследования процессов низкотемпературной адаптации

холодостойких растений, например озимых злаков, поскольку такие исследования позволяют анализировать адаптивный потенциал растительного организма в целях дальнейшей селекции видов и сортов, наиболее устойчивых к охлаждению и способных акклиматизироваться в северных широтах.

Механизмы холодоустойчивости реализуются на разных уровнях организации растительного организма — от структурного до молекулярно-генетического. Под влиянием низких температур метаболизм растений, устойчивых к холоду, полностью изменяется: “включаются” гены холодового ответа [1–3]; в клетках и тканях накаплива-

**Сокращения:** АОС — антиоксидантная система, ФСА — фотосинтетический аппарат.

ются белки, углеводы и аминокислоты, выполняющие функции осмолитиков и криопротекторов [4–6]. Кроме того, изменяется биохимический состав мембран, в которых увеличивается соотношение липиды/белки и возрастает количество ненасыщенных жирных кислот [1, 2, 4, 7, 8]. Важную роль в процессе низкотемпературной адаптации растений играет антиоксидантная система (АОС), представленная антиоксидантными ферментами и низкомолекулярными соединениями [5, 8, 9].

Определенное место в программе адаптации растений к низкой температуре занимает и ультраструктурная реорганизация клеток, которая, в зависимости от вида растения и степени охлаждения, может в разной степени затрагивать основные органеллы [4, 10–12]. Особый интерес представляет изучение адаптивных структурных изменений клеток листа, как основного фотосинтезирующего органа растений. Однако экспериментальные данные по этому вопросу достаточно противоречивы, и даже среди холодостойких растений разброс по структурным реакциям на охлаждение может быть достаточно большим [13]. Прежде всего, это связано с тем обстоятельством, что характер любых изменений, происходящих в растительном организме при длительных низкотемпературных воздействиях, существенно зависит от диапазона используемых температур. Согласно гипотезе о зональном влиянии температуры на растения [14], озимая пшеница относится к морозостойким культурам, способным выдерживать без повреждений даже действие температур близких к 0°C. Зона низких закаливающих температур, вызывающих увеличение ее морозоустойчивости, находится в диапазоне от 0 до 14°C. Температуры ниже 0°C относятся к повреждающим, а температуры в диапазоне от 14 до 28°C – к “фоновым”, то есть физиологически нормальным [14]. Как показали наши предыдущие исследования, существует зависимость степени и характера проявления адаптивных функциональных и физиолого-биохимических изменений в клетках и тканях озимой пшеницы от интенсивности закаливающей температуры: наиболее быстрые и заметные адаптивные изменения происходили при температуре 4°C, вызывающей наибольший прирост морозоустойчивости, который развивался к 6–7 сут закаливания [15]. С целью показать роль ультраструктурной реорганизации клеток в низкотемпературной адаптации озимых злаков, мы изучили комплекс ультраструктурных изменений, происходящих в клетках мезофилла у проростков озимой пшеницы в процессе низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали недельные проростки озимой пшеницы (*Triticum*

*aestivum* L.) морозостойкого сорта Московская 39, выращенные в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, относительной влажности 60–70%, освещенности 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) и 16-часовом фотопериоде. Растения закаляли в климатической камере KBW-240 (“Binder”, Германия) при 4°C в течение 7 сут, сохраняя прочие условия неизменными. В качестве контроля использовали 7-дневные проростки, выращенные при 22°C.

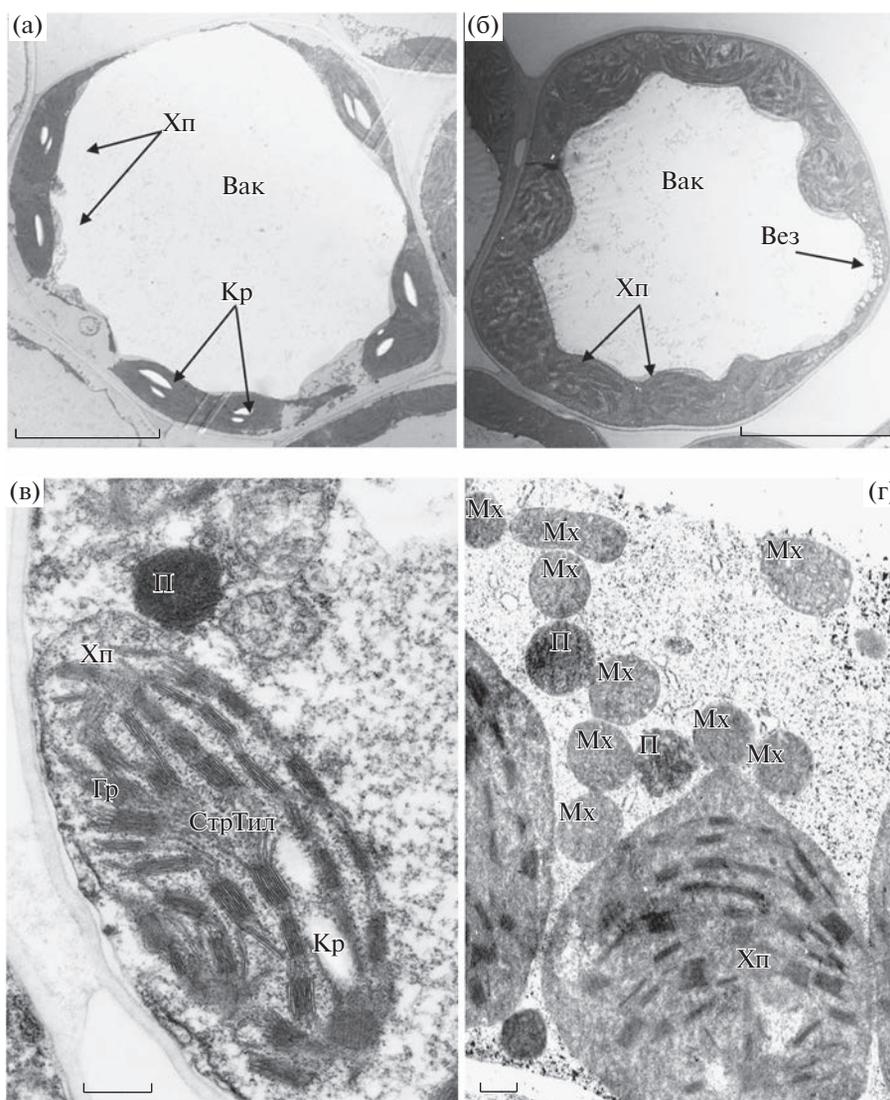
Для электронно-микроскопического исследования высечки листа фиксировали по стандартной методике: 2% глутаральдегидом на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) при температуре 0–4°C с постфиксацией в 2% растворе OsO<sub>4</sub> [16]. После стандартной процедуры обезвоживания в серии спиртов и ацетона материал заливали в смесь эпоксидных смол. Срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 (“LKB”, Швеция) и просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (“JEOL Ltd.”, Япония). Морфометрический анализ ультраструктуры проводили с использованием компьютерных программ ITEM 5.0. и AxionVision 4.8.

Устойчивость пшеницы к низкой температуре оценивали методом прямого промораживания проростков (по выживаемости) и по выходу электролитов из тканей. В каждом варианте опыта (контрольные и закаленные проростки) брали по 30 растений и промораживали их в бумажных конвертах в климатической камере MIR-153 (“Sanyo”, Япония) с интервалом в 24 ч и шагом в 2°C. Пробы отбирали при постепенном снижении температуры: при –3, –5, –7 и –9°C. Затем растения 24 ч выдерживали при 4°C в темноте, после чего переносили в обычные условия (22°C, дневной свет) на 72 ч. О выживаемости судили по количеству неповрежденных проростков в процентах от общего числа промороженных растений. Выход электролитов из тканей листа оценивали по стандартной процедуре [17] после их 24 ч промораживания в климатической камере MIR-153 (“Sanyo”, Япония) при температурах –3, –5, –7 и –9°C. Электропроводность водных экстрактов определяли при помощи кондуктометра SG7-ELK (“Mettler Toledo”, Швейцария). Выход электролитов из тканей листьев (*V*, в %) рассчитывали по формуле:

$$V = 100(L_0/L_k),$$

где  $L_0$  – электропроводность исследуемого образца до или после холодовой экспозиции,  $L_k$  – электропроводность того же образца после кипячения.

Все измерения проводили на первом листе проростков пшеницы. Ультраструктурные показатели изучали на 50–100 снимках для каждого варианта опыта. Повторность при оценке устойчивости была 3–6-кратная. В таблицах и на графиках приведены средние арифметические зна-



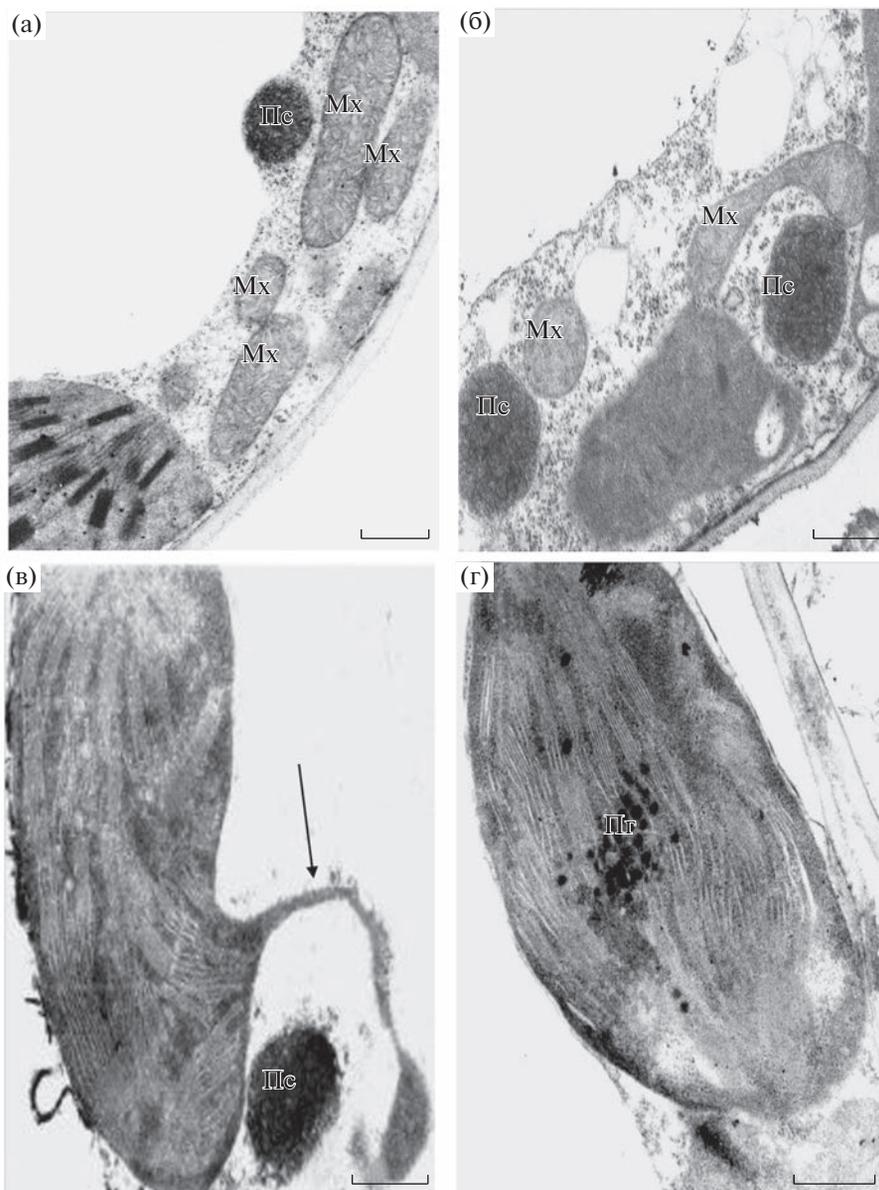
**Рис. 1.** Ультраструктура клеток мезофилла у контрольных (а, в) и закаленных ( $4^{\circ}\text{C}$ , 7 сут) (б, г) проростков пшеницы. Вак – вакуоль, Хп – хлоропласт, Мх – митохондрия, Пс – пероксисома, Вез – везикулы, Кр – крахмальные включения, Гр – граны, СтрТил – тилакоиды стромы. Масштабная линейка 5 мкм (а, б) и 0.5 мкм (в, г).

чения и их стандартные ошибки. Достоверности отличий между средними значениями оценивали по *t*-критерию Стьюдента при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование показало, что клетки мезофилла незакаленных проростков пшеницы имели типичную структуру. В тонком пристенном слое цитоплазмы располагались хлоропласты линзовидной формы, в которых хорошо видны крахмальные включения, а центральная часть клетки занята прозрачной вакуолью (рис. 1а). После низкотемпературного закаливания в структуре клеток пшеницы обнаружен ряд отличий. В частности, цитоплазма клеток несколько разрасталась, в ней увеличивалось количество хлоропластов, ко-

торые по размерам были больше контрольных, причем в них полностью исчезали крахмальные включения (рис. 1б). Кроме того, визуально увеличивалась плотность цитоплазмы, в ней появлялись скопления везикул (рис. 1б, г). Около хлоропластов отмечено появление “цепочек” из митохондрий и пероксисом (рис. 1г). Сами митохондрии нередко меняли свою форму, становясь из округлых более вытянутыми или гантелевидными (рис. 2а, б). Зафиксировано также увеличение электронной плотности стромы хлоропластов (рис. 1г) по сравнению с хлоропластами контрольных растений (рис. 1в). Заметно, что хлоропласты закаленных растений были более округлыми (рис. 1б, г), в них обнаруживались выросты, так называемые – стромулы. Нередко эти стромулы формировали “карманоподобные” образования с пероксисомами

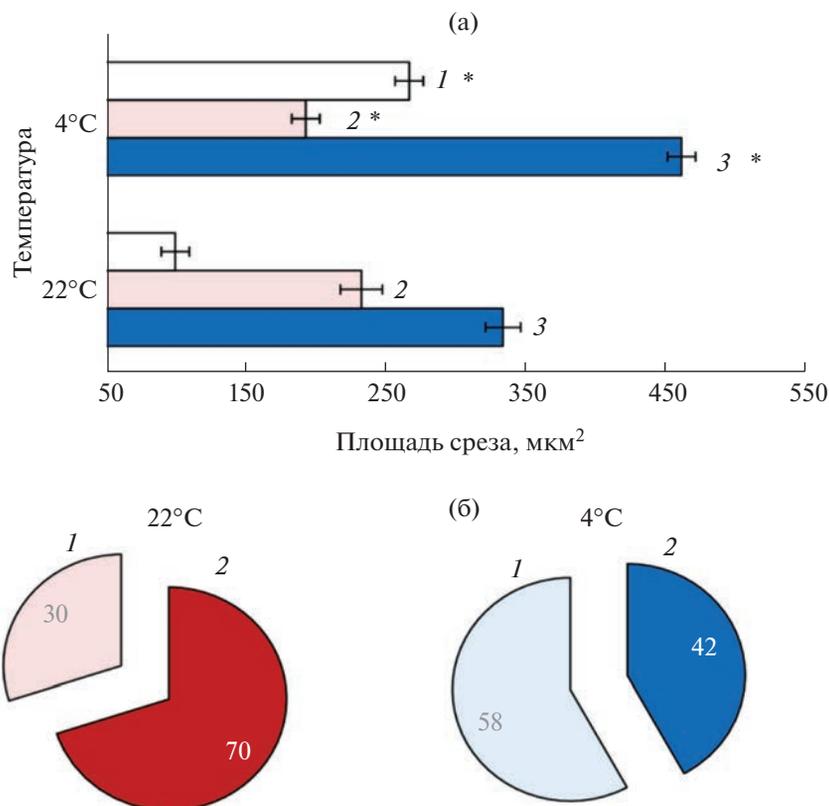


**Рис. 2.** Ультраструктура клеток мезофилла у закаленных (4°C, 7 сут) проростков пшеницы. Мх – митохондрия, Пг – пластоглобулы, Пс – пероксисома. На рис. 2в стрелкой показана струма. Масштабная линейка 0.5 мкм.

или митохондриями внутри (рис. 2в). Достаточно часто в хлоропластах закаленных проростков наблюдали искривленные тилакоиды с расширенным люменом (внутритилакоидным пространством) (рис. 2г). Действие низких температур приводило также к увеличению в хлоропластах размеров и количества пластоглобул, которые иногда образовывали “гроздеподобные” кластеры, хорошо заметные в центральной части пластид (рис. 2г).

Морфометрический анализ подтвердил, что в процессе низкотемпературного закаливания в клетках мезофилла пшеницы происходит ряд структурных изменений. Так, под влиянием низкой температуры увеличивались площади срезов клетки

и цитоплазмы (рис. 3а). При этом, размеры вакуоли, наоборот, уменьшались, и в процентах по отношению к площади клетки это снижение составило 30% (рис. 3б). Кроме того, в условиях низкотемпературного закаливания увеличилось число хлоропластов, митохондрий и пероксисом на единицу площади среза клетки (рис. 4), а также значительно возрастали размеры хлоропластов, хотя площади срезов митохондрий и пероксисом не изменялись (табл. 1). Так, площадь среза хлоропласта увеличивалась в процессе закаливания более чем в два раза, причем как длинная, так и короткая ось хлоропластов были заметно больше, чем у контрольных растений (табл. 1). Однако соотноше-



**Рис. 3.** Влияние низкой температуры (4°C, 7 сут) на размеры (а) цитоплазмы (1), вакуоли (2) и клетки (3) и соотношение (б) площадей цитоплазмы (1) и вакуоли (2) в % от площади клетки у проростков пшеницы. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при  $P < 0.05$ .

ние длинной оси хлоропласта к короткой снижалось (табл. 1), что говорит о потере хлоропластами линзовидной формы и некотором их округлении (рис. 1б, г). Увеличение количества и размеров хлоропластов приводило к возрастанию их суммарной площади в клетке на 15% по сравнению с контрольными значениями (табл. 2).

Существенные отличия были зафиксированы и в ультраструктуре хлоропластов закаленных и незакаленных растений. У контрольных проростков, выращенных при 22°C, хлоропласты облада-

ли типичной структурой: имели правильную линзовидную форму, хорошо развитую тилакоидную систему и мелкозернистую плотную строму, в которой располагались граны, тилакоиды стромы и крахмальные включения (рис. 1в). При 4°C в хлоропластах листьев пшеницы происходил ряд структурных изменений: существенно (на 25%) снижалось число гран на единице площади хлоропласта, уменьшалось и среднее число тилакоидов в гране (табл. 2). О заметном уменьшении размеров гран свидетельствует также снижение как

**Таблица 1.** Влияние низкой температуры (4°C, 7 сут) на размеры органелл в клетках мезофилла у проростков пшеницы

Показатели	22°C	4°C
Площадь среза пероксисомы, мкм <sup>2</sup>	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Площадь среза митохондрии, мкм <sup>2</sup>	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Площадь среза хлоропласта, мкм <sup>2</sup>	7.9 ± 0.4	16.1 ± 0.6*
Длинная ось хлоропласта, мкм	4.6 ± 0.2	5.9 ± 0.2*
Короткая ось хлоропласта, мкм	1.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1*
Длинная/короткая ось хлоропласта	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1*

Примечание. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при  $P < 0.05$ .

средней, так и максимальной высоты грани и ее площади (табл. 2). Достоверных изменений в величине люмена (расстояния между тилакоидами в грани) не обнаружено (табл. 2). Снижение плотности фотосинтетических мембран (то есть длины мембран тилакоидов, рассчитанной на 10 мкм<sup>2</sup> площади среза хлоропласта) происходило, прежде всего, за счет уменьшения длины гранальных мембран (табл. 2). Вследствие этого у закаленных растений коэффициент гранальности, представляющий отношение длины мембран гранальных тилакоидов к длине стромальных мембран, был заметно снижен по сравнению с контрольными значениями (табл. 2). Этот факт свидетельствует о преобладании в хлоропластах закаленных растений мембран стромальных тилакоидов над мембранами тилакоидов в гранах.

В процессе низкотемпературного закаливания пшеницы происходила не только структурная реорганизация клеток мезофилла, но и формировалась повышенная морозоустойчивость. В опытах с прямым промораживанием растений показано, что 90% незакаленных проростков полностью погибали уже при -7°C, в то время как 40% закаленных растений выдерживали промораживание даже при -9°C (табл. 3). Данные по определению выхода электролитов из тканей после промораживания также свидетельствуют об увеличении морозоустойчивости пшеницы в процессе закаливания (табл. 3). Согласно этим данным, устойчивость закаленных растений была приблизительно в три раза выше, чем у контрольных проростков. Так, выход электролитов из тканей контрольных проростков, замороженных при -7°C, составил 70%,

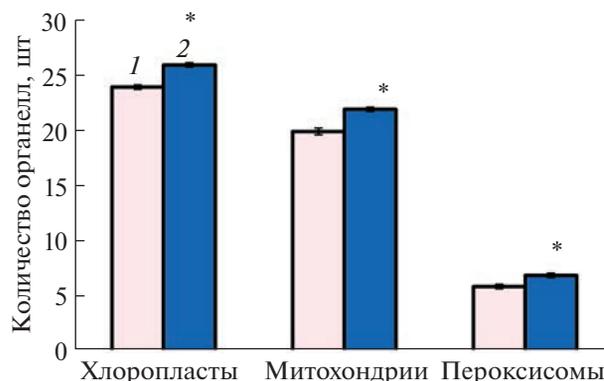


Рис. 4. Влияние низкой температуры (4°C, 7 сут) на количество органелл на 10<sup>3</sup> мкм<sup>2</sup> площади среза клетки у проростков пшеницы: 1 – 22°C, 2 – 4°C. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при P < 0.05.

что свидетельствует о гибели большинства растений. У закаленных проростков выход электролитов после промораживания при этой же температуре был лишь 20%, а при снижении температуры до -9°C составил 35% (табл. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Холодостойкие растения в процессе эволюции сформировали широкий спектр адаптивных структурно-функциональных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических изменений, способствующих выживанию в условиях действия пониженных температур. Эти изменения касаются,

Таблица 2. Влияние низкой температуры (4°C, 7 сут) на ультраструктуру хлоропластов в клетках мезофилла у проростков пшеницы

Показатели	22°C	4°C
Суммарная площадь хлоропластов, %	21 ± 3	35 ± 3*
Число гран на 10 мкм <sup>2</sup> среза хлоропласта, шт	37 ± 2	28 ± 3*
Среднее число тилакоидов в грани, шт	7 ± 0.2	6 ± 0.2*
Средняя высота грани, мкм	0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01*
Наибольшая высота грани, мкм	0.40	0.23
Ширина люмена, мкм <sup>а</sup>	0.018 ± 0.001	0.021 ± 0.001
Площадь грани, мкм <sup>2</sup>	0.05 ± 0.003	0.03 ± 0.003*
Плотность гранальных мембран, мкм <sup>б</sup>	124.2 ± 19.8	70.0 ± 9.2*
Плотность стромальных мембран, мкм	92.8 ± 15.0	66.9 ± 10.2
Общая плотность фотосинтетических мембран, мкм	217.0 ± 23.6	136.9 ± 14.9*
Коэффициент гранальности хлоропласта <sup>в</sup>	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1*

Примечание. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при P < 0.05; а – ширину люмена (расстояние между тилакоидами в грани) рассчитывали как отношение высота грани/среднее число тилакоидов в грани; б – плотность мембран рассчитывали как длину (протяженность) мембран на 10 мкм<sup>2</sup> среза хлоропласта; в – коэффициент гранальности рассчитывали как отношение длины гранальных мембран к длине мембран, контактирующих со стромой.

**Таблица 3.** Морозоустойчивость проростков пшеницы к низкой температуре до и после закаливания (4°C, 7 сут)

Температура промораживания	Выживаемость, %		Выход электролитов, %	
	незакаленные проростки	закаленные проростки	незакаленные проростки	закаленные проростки
-3°C	35 ± 5	65 ± 5*	35.4 ± 5.0	11.0 ± 1.2*
-5°C	10 ± 4	55 ± 5*	57.7 ± 3.3	16.3 ± 0.3*
-7°C	0	50 ± 4*	70.3 ± 3.1	20.3 ± 1.2*
-9°C	0	40 ± 5*	—	35.2 ± 1.2*

Примечание. Звездочкой обозначены отличия закаленных растений от контрольных, статистически значимые при  $P < 0.05$ .

в том числе, и ультраструктуры клеток, которая в процессе низкотемпературной адаптации претерпевает значительную реорганизацию. В нашем исследовании, проведенном на проростках озимой пшеницы, установлено, что в процессе низкотемпературного закаливания (4°C, 7 сут) в клетках мезофилла происходит целый комплекс структурных изменений, касающихся практически всех элементов клетки. В частности, значительно увеличивались размеры самих клеток мезофилла, в которых возрастала площадь и электронная плотность цитоплазмы, в ней появлялись многочисленные везикулы, увеличивались число хлоропластов, митохондрий и пероксисом, а также размеры хлоропластов (табл. 1, рис. 1–4). Скопления митохондрий и пероксисом наблюдались около хлоропластов, в самих хлоропластах отмечены выросты – стромулы, в них увеличивались размеры и количество пластоглобул, но практически полностью исчезали крахмальные включения (рис. 1, 2). Кроме того, в хлоропластах появлялись признаки снижения гранальности – уменьшались число и размеры гран, плотность фотосинтетических мембран снижалась за счет уменьшения гранального компонента, мембраны стромальных тилакоидов преобладали над мембранами гран (табл. 2). При этом, в процессе ультраструктурной реорганизации клеток мезофилла под влиянием низкой температуры формировалась повышенная морозоустойчивость пшеницы (табл. 3).

В предыдущем исследовании нами показано, что при низкотемпературном закаливании озимой пшеницы происходит “перепрограммирование” метаболизма, включающее адаптивные изменения роста, водного обмена, интенсивности окислительных процессов и работы фотосинтетического аппарата (ФСА) [15]. Большой интерес представляют исследования не только функциональных и физиолого-биохимических, но и структурных механизмов адаптации растений к действию низких температур, однако таких работ явно недостаточно [13, 18, 19]. Прежде всего, это связано с тем обстоятельством, что для структурных признаков четкие критерии их адаптивности на сегодняшний день не определены. На наш взгляд, оценить зна-

чимось того или иного структурного признака для клетки вполне возможно, проведя анализ тех функциональных и/или физиолого-биохимических изменений, которые сопровождают структурные перестройки. Добавим, что в таких исследованиях необходим и параллельный контроль устойчивости, как интегрального показателя, величина которого обеспечена реализацией комплекса адаптивных изменений. Вполне можно предполагать, что изменения структуры, сопровождающие рост холодоустойчивости, в большинстве своем, адаптивны. С целью подтвердить адаптивное значение происходящих под влиянием низкой температуры структурных перестроек, мы систематизировали литературные данные, касающиеся наиболее часто регистрируемых физиолого-биохимических изменений в клетках и тканях холодостойких растений, и сопоставили их с теми структурными трансформациями, которые обнаружили в своем исследовании (табл. 4).

Прежде всего, растения в условиях охлаждения подвергаются риску дегидратации из-за сниженного поглощения воды корнями и закрытия устьиц. Поэтому в клетках холодоустойчивых растений происходит перераспределение воды – она транспортируется из вакуоли в цитоплазму и межклеточное пространство [20]. Одновременно в клетке активируется синтез белков, липидов, моносахаров, низкомолекулярных антиоксидантов и ферментов, которые локализуются в цитоплазме [4]. Эти вещества, с одной стороны, увеличивают осмотическое давление клеточного сока, предотвращая потери клетки от дегидратации, а с другой стороны, защищают мембраны клетки от окислительного стресса и служат резервными веществами, необходимыми для поддержания роста в условиях охлаждения [20]. Визуальным отражением перечисленных физиологических и биохимических процессов являются увеличение объема цитоплазмы и ее электронной плотности, образование в ней многочисленных везикул. Везикуляция – образование мембранных пузырьков в цитоплазме, часто рядом с плазмалеммой, является структурным отражением усиленного транспорта синтезированных защитных веществ между органеллами

**Таблица 4.** Взаимосвязь физиолого-биохимических и структурных изменений в клетках холодостойких растений под влиянием низких температур

Физиолого-биохимические изменения и их значение	Структурные изменения
Снижение абсорбции воды корнями, закрытие устьиц, перераспределение воды в клетках, направленное на предотвращение рисков дегидратации и образования внутриклеточного льда	Увеличение площади цитоплазмы, уменьшение размеров вакуоли
Синтез и аккумуляция в цитоплазме белков, липидов, углеводов, антиоксидантов и экзимов; усиление транспорта этих защитных веществ между органеллами клетки	Увеличение электронной плотности цитоплазмы, появление в ней многочисленных везикул
Снижение интенсивности фотосинтеза, дыхания, обмена веществ и всех основных физиологических процессов в растительных клетках и, как следствие, компенсаторное увеличение числа органелл, и контактов между ними	Увеличение числа органелл, полиморфизм митохондрий, скопления митохондрий и пероксисом около хлоропластов, стромулы в хлоропластах
Усиление распада крахмала до моносахаров, синтез и аккумуляция в стромах белков, энзимов и других веществ, обладающих осмо- и криопротекторными свойствами	Увеличение размеров хлоропластов, плотности стромы, исчезновение крахмальных включений
А) Снижение вязкости мембран, интенсивности фотосинтеза, накопление АФК, и в итоге, ингибирование ФС II; Б) образование большого количества продуктов распада мембран вследствие их быстрой перестройки	А) Формирование хлоропластов с мембранной системой “светового типа”; Б) увеличение размеров и числа пластоглобул

клетки и между клетками. Есть мнение, что за счет увеличения количества везикул в цитоплазме клетка поддерживает тонус в условиях охлаждения, накапливая мембранные липидосодержащие структуры [21]. Поэтому перечисленные структурные изменения (увеличение размеров цитоплазмы, уменьшение объема вакуоли, везикуляция) – это важный криозащитный механизм, реализующийся на уровне ультраструктуры клетки (табл. 4).

Серьезные последствия низкотемпературного воздействия на растения, как правило, связаны с замедлением всех физиологических процессов – фотосинтеза, дыхания, водного обмена и обмена веществ [8, 22]. Однако у холодостойких растений в условиях охлаждения срабатывает “количественная стратегия”, когда снижение интенсивности физиологического процесса поддерживается за счет увеличения количества структур [23, 24]. Поэтому количество хлоропластов, митохондрии и пероксисом в клетках холодостойких растений, как правило, увеличивается в условиях охлаждения. Попутно отметим, что увеличение размеров самих клеток мезофилла под влиянием низкой температуры – это типичная структурная реакция, связанная с перечисленными выше структурно-функциональными изменениями [4, 10]. Как известно, пониженные температуры, ингибируя деление клеток, слабо влияют на их рост растяжением. Вследствие этого под влиянием холода формируются крупные клетки мезофилла, богатые органеллами, пролиферация которых усиливается, обеспечивая тем самым возможность поддержания основных

физиологических процессов, прежде всего фотосинтеза и дыхания [23].

Форма митохондрий считается высокодинамичным структурным показателем [24, 25]. У теплолюбивых растений изменение формы митохондрий сопровождается “высвечиванием” матрикса и исчезновением крист, что рассматривается в качестве симптома повреждения [13, 26]. У холодостойких растений, таких как *Arabidopsis* или озимые злаки, изменение формы митохондрий на вытянутую или гантелевидную носит обратимый характер [27]. Предполагается, что такая форма органелл способствует увеличению площади их поверхности и облегчает обмен метаболитами с цитоплазмой [24, 26, 27].

Учитывая, что охлаждение замедляет все физиологические процессы и реакции в клетках, с большой вероятностью можно предполагать адаптивное значение еще одного структурного признака. Так, считается, что скопления митохондрий и пероксисом около хлоропластов способствуют установлению более тесных контактов между органеллами [28]. Известно, что именно в пероксисомах в процессе фотодыхания происходит инактивация АФК, поэтому близость пероксисом к митохондриям и хлоропластам может быть структурной визуализацией процесса усиленной защиты их мембран от окислительного стресса [28].

Еще одно интересное явление, характерное для хлоропластов холодостойких растений в условиях действия низких температур – появление в них стромул, то есть выростов, заполненных стро-

мой. Считается, что выросты увеличивают поверхность хлоропластов, связывают их между собой, способствуя более интенсивному транспорту метаболитов и сигнальных молекул между пластидами, цитоплазмой и другими органеллами клетки [29, 30]. Одной из возможных причин выростов и инвагинаций хлоропластов могут также являться изменения актинового и тубулинового цитоскелета, наблюдаемые при охлаждении [22]. Например, Holzinger с соавт. [29] показали, что плотная сеть микротрубочек в клетках мезофилла *Arabidopsis* принимает участие в образовании и функционировании выростов в хлоропластах, которые необходимы для адаптации ФСА к стрессам.

Наиболее интенсивные изменения под влиянием низкой температуры касались ультраструктуры хлоропластов. Их “округление” и потеря линзовидной формы, с одной стороны, связаны с поступлением в строму воды из цитоплазмы, замедлением оттока ассимилятов из хлоропласта и общим ингибированием флоэмного потока под влиянием низких температур [13, 20]. С другой стороны, у холодостойких растений этот признак также связывают с накоплением в строме веществ с криопротекторными функциями [13]. Как правило, увеличение размеров хлоропластов у озимых злаков сопровождается гидролизом крахмальных зерен до моносахаров [4, 13] и синтезом *de novo* совместимых осмолитов — моносахаров, аминокислот, белков и др. [22]. Растворимые осмолиты, такие как глюкоза, пролин, глицинбетаин, накапливаясь в строме, не только снижают ее водный потенциал, предотвращая дегидратацию тканей, но и выступают в качестве “криопротекторов”, защищающих от инактивации белки, а липиды мембран от перекисидации [4].

Кроме того, снижение интенсивности фотосинтеза и связанные с ним риски развития окислительного стресса в условиях охлаждения приводят к необходимости структурной перестройки тилакоидных мембран в хлоропластах. Структурные изменения мембранной системы хлоропластов холодостойких растений, возникающие под влиянием низкой температуры, свидетельствуют об интенсивных процессах направленных на защиту компонентов ФС II, наиболее чувствительной к фотоингибированию [31]. Как известно, ФС II в основном локализована в мембранах гран, в то время как более устойчивая ФС I преобладает в мембранах тилакоидов, граничащих со стромой [31, 32]. Под влиянием низких температур в листьях холодостойких растений формируются хлоропласты со сниженной гранальностью, то есть хлоропласты “светового типа” [32, 33]. В них преобладают мелкие граны, содержащие небольшое число тилакоидов, причем мембраны тилакоидов стромы в таких пластидах преобладают над мембранами тилакоидов гран [34]. Подобного рода перестройка, скорее всего, отражает перераспре-

деление фотосистем в мембранах тилакоидов, направленное на дополнительную защиту ФС II от фотоингибирования. Кроме того, изменение биохимической композиции мембран, связанное с увеличением соотношения липиды/белки, ненасыщенные/насыщенные жирные кислоты, также обеспечивает холодостойкость растений [35]. Отметим, что мембраны тилакоидов гран по своей биохимической композиции менее приспособлены к охлаждению, поскольку имеют большую плотность упаковки липидов, а также содержат почти в два раза больше белков по отношению к липидам, чем мембраны тилакоидов стромы [36]. Таким образом, мембраны гран имеют более жесткую структуру, а мембраны стромы — более лабильную, и, следовательно, более приспособленную к реакциям на действие холода. Перераспределение мембран гранальных и стромальных тилакоидов в хлоропласте под влиянием низких температур имеет решающее значение, и наравне с биохимической их трансформацией, определяет устойчивость растений к холоду.

Еще один структурный признак холодоустойчивых растений в условиях охлаждения — расширение межтилакоидного пространства (люмена), является осмотической реакцией на усиление трансмембранного градиента ионов и увеличение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Cl}^-$  в люмене [31], а также связан с усилением транспорта органических кислот и энзимов, важных для процесса фотосинтеза, из люмена в строму и обратно [31, 37]. Известно, что при фотоингибировании, вызванным генерацией АФК и последующим развитием окислительного стресса, тормозится синтез *de novo* белка D1 — ключевого элемента репарации ФС II [9]. Поврежденные единицы протеина D1 мигрируют из мембран гран в мембраны тилакоидов стромы, где происходит их деградация и замена на новые копии [31]. Расширение люмена способствует диффузии люменальных протеаз к местам репарации протеина D1, и, по сути, является структурной визуализацией основного молекулярного механизма защиты ФС II от окислительного стресса.

Как правило, отмеченная выше перестройка мембранной системы хлоропластов сопровождается увеличением количества и размеров пластоглобул. Вероятно, это связано с тем обстоятельством, что освобождающиеся при перестройке системы тилакоидных мембран белки и липиды накапливаются именно в пластоглобулах, размер и количество которых, соответственно, возрастают. По этой причине увеличение пластоглобул считают неспецифическим признаком, связанным с перестройкой мембранной системы хлоропластов в любых стрессовых условиях [13, 38].

Таким образом, ультраструктурная реорганизация клеток мезофилла у озимых злаков является

одним из важнейших звеньев, необходимых для реализации стратегии, позволяющей им существовать в изменяющихся условиях среды. Основными задачами такой адаптивной структурной реорганизации клеток в условиях охлаждения являются поддержание интенсивности физиологических процессов, ингибированных низкой температурой, а также защита клеток и тканей от дегидратации и окислительного стресса, являющихся основными причинами гибели растений от холода. У холодостойких растений, и в частности у озимых злаков, под влиянием низких субповреждающих температур срабатывает единая адаптивная стратегия структурной, метаболической и физиолого-биохимической реорганизации клеток и тканей, которая сводит к минимуму риски холодового стресса, позволяя растениям длительно функционировать в условиях охлаждения.

Авторы выражают благодарность Астаховой Н. В. и Поспеловой В. Н. за помощь и участие в работе по фиксации образцов, получению срезов листа и фотоснимков клеток в электронном микроскопе.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700044-6).

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen L.-J., Xiang H.-Z., Miao Y., Zhang L., Guo Z.-F., Zhao X.-H., Lin J.-W., Li T.-L. An overview of cold resistance in plants // *J. Agr. Crop. Sci.* 2014. V. 200. P. 237. <https://doi.org/10.1111/jac.12082>
2. Ding Y., Shi Y., Yang S. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants // *New Phytol.* 2019. V. 222. P. 1690. <https://doi.org/10.1111/nph.15696>
3. Ritonga F.N., Chen S. Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants // *Plants.* 2020. V. 9. P. 560. <https://doi.org/10.3390/plants9050560>
4. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
5. John R., Anjum N.A., Sopory S.K., Akram N.A., Ashraf M. Some key physiological and molecular processes of cold acclimation // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 603. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0648-9>
6. Deryabin A.N., Trunova T.I. Colligative effects of solutions of low-molecular sugars and their role in plants under hypothermia // *Biol. Bull.* 2021. V. 48. P. 29. <https://doi.org/10.1134/S1062359021060042>
7. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // *Вестник РАН.* 2005. Т. 75. С. 338.
8. Theocharis A., Clement Ch., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperature // *Planta.* 2012. V. 235. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
9. Kreslavski V.D., Los D. A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.I. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
10. Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Relationship between plant cold tolerance, photosynthesis and ultrastructural modifications of cells and chloroplasts // *Russ. J. Plant Physiol.* 1997. V. 44. P. 759.
11. Astakhova N.V., Popov V.N., Selivanov A.A., Burakhanova E.A., Alieva G.P., Moshkov I.E. Reorganization of chloroplast ultrastructure associated with low-temperature hardening of *Arabidopsis* plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 744. <https://doi.org/10.1134/S102144371406003X>
12. Popov V.N., Astakhova N.V. Ultrastructural changes in chloroplasts of *Cucumis sativus* L. and *Secale cereale* L. during low-temperature hardening // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 678. <https://doi.org/10.1134/S1021443721040130>
13. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // *Plant Cell Environ.* 2002. V. 23. P. 337. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00560.x>
14. Тумов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. Москва: Наука, 2006. 143 с.
15. Venzhik Yu.V., Talanova V.V., Ignatenko A.A., Repkina N.S., Kholoptseva E.S., Titov A.F. Features of wheat adaptation to frost under low-temperature exposure of different intensity // *Russ. J. Plant Phys.* 2022. V. 69. P. 105. <https://doi.org/10.1134/S1021443722040173>
16. Sabatini D.D., Bensch K., Barrnett R.J. Cytochemistry and electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 19. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.19>
17. Hepburn H.A., Naylor R.E.L., Stokes D.T. Electrolyte leakage from winter barley tissue as an indicator of winter-hardiness // *Ann. Appl. Biol.* 1986. V. 108. P. 164. <https://doi.org/10.1111/aab.1986.108.s1.164>
18. Liu X., Zhou Yu., Xiao J., Bao F. Effects of chilling on the structure, function and development of chloroplasts // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01715>
19. Bilyavska N.O., Fediuk O.M., Zolotareva E.K. Chloroplasts of cold-tolerant plants // *Plant Sci. Today.* 2019. V. 6. P. 407. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.4.584>
20. Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafsson P., Gardeström P., Stitt M. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 1387. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1387>
21. Yamazaki T., Kawamura Yu., Uemura M. Cryobehavior of the plasma membrane in protoplasts isolated from cold-acclimated *Arabidopsis* leaves is related to surface area regulation // *Plant Cell Physiol.* 2008. V. 49. P. 944. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn068>

22. *Ruelland E., Zachowsky A.* How plant sense temperature // *Environ. Exp. Bot.* 2010. V. 69. P. 225. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.011>
23. *Мирславов Е.А.* Структурная адаптация растений к холодному климату // *Ботанический журнал.* 1994. Т. 79. С. 20.
24. *Armstrong A.F., Logan D.C., Tobin A.K., O'Toole P., Atkin O.K.* Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves // *Plant Cell Environ.* 2006. V. 29. P. 940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01475.x>
25. *Logan D.C., Leaver C.J.* Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. P. 865. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.346.865>
26. *Ishikawa H.A.* Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suppression-cultured mung bean cells // *Am. J. Bot.* 1996. V. 83. P. 825.
27. *Vella N.G.F., Joss T.V., Roberts Th.H.* Chilling-induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming // *Protoplasma.* 2012. V. 249. P. 1137. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0363-5>
28. *Giełwanowska I., Pastorczyk M., Kellmann-Sopyła W., Górniak D., Górecki R.J.* Morphological and ultrastructural changes of organelles in leaf mesophyll cells of the arctic and antarctic plants of *Poaceae* family under cold influence // *Arct. Antarct. Alp. Res.* 2015. V. 47. P. 17. <https://doi.org/10.1657/AAAR0014-019>
29. *Holzinger A., Wasteneys G.O., Lütz C.* Investigating cytoskeletal function in chloroplast protrusion formation in the arctic-alpine plant *Oxyria digyna* // *Plant Biol.* 2007. V. 9. P. 400. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924727>
30. *Gray C.G., Hansen M.R., Shau D.J., Graham K., Dale R., Natesan S.K.A., Newell C.A.* Plastid stromules are induced by stress treatments acting through abscisic acid // *Plant J.* 2012. V. 69. P. 387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04800.x>
31. *Pribil M., Labs M., Leister D.* Structure and dynamics of thylakoids in land plants // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 1955. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru090>
32. *Suorsa M., Rantala M., Mamedov F., Lespinasse M., Trotta A., Grieco M., Vuorio E., Tikkanen M., Järvi S., Aro E.-M.* Light acclimation involves dynamic re-organization of the pigment-protein megacomplexes in non-appressed thylakoid domains // *Plant J.* 2015. V. 84. P. 360. <https://doi.org/10.1111/tpj.13004>
33. *Venzhik Yu.V., Shchyogolev S.Yu., Dykman L.A.* Ultrastructural reorganization of chloroplasts during plant adaptation to abiotic stress factors // *Russ. J. Plant Phys.* 2019. V. 66. P. 850. <https://doi.org/10.1134/S102144371906013X>
34. *Anderson J.M.* Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective // *Aust. J. Plant Physiol.* 1999. V. 26. P. 325. <https://doi.org/10.1071/PP99070>
35. *Uemura M., Tominaga Y., Nakagawara Ch., Shigematsu S., Minami A., Kowamura Y.* Responses of the plasma membrane to low temperature // *Physiol. Plant.* 2006. V. 126. P. 81. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00594.x>
36. *Yeagle P.L.* Membrane fusion intermediates // *Curr. Top. Membr.* 1997. V. 44. P. 375. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60214-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60214-2)
37. *Ma S., Lin C., Chen Y.* Comparative studies of chilling stress on alterations of chloroplast ultrastructure and protein synthesis in the leaves of chilling-sensitive (mungbean) and -insensitive (pea) seedlings // *BBAS.* 1990. V. 31. P. 263.
38. *Arzac M.I., Fernández-Marín B., García-Plazaola J.I.* More than just lipid balls: quantitative analysis of plastoglobule attributes and their stress-related responses // *Planta.* 2022. V. 255. P. 62. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03848-9>

УДК 581.1

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИОНООБМЕННЫХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА КЛЕТОЧНЫХ СТенок ГАЛОФИТА И ГЛИКОФИТА ИЗ СЕМЕЙСТВА AMARANTHACEAE-CHENOPODIACEAE

© 2023 г. Н. Р. Мейчик<sup>а</sup>, \*, Ю. И. Николаева<sup>а</sup>, М. А. Кушунина<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

\*e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 17.04.2023 г.

Принята к публикации 17.04.2023 г.

Исследованы ионообменные свойства полимерного матрикса клеточных стенок, которые были выделены из листьев 55-дневных растений *Spinacia oleracea* L. сорта Матадор, выращенных на питательном растворе в присутствии 0,5, 150 и 250 мМ NaCl и листьев растений *Suaeda altissima* (L.) Pall того же возраста, которые росли в присутствии 0,5, 250 и 750 мМ NaCl. Ионообменная способность клеточных стенок оценена при разных значениях pH и ионной силы раствора. Получены данные о существовании в структуре клеточной стенки листьев трех типов катионообменных групп: двух карбоксильных, первая из которых принадлежит остатку галактуроновой кислоты, и фенольных ОН-групп. Определено количество групп каждого типа и константы их ионизации и показано, что качественный состав ионообменных групп в клеточных стенках листьев этих растений одинаков и не зависит от условий питания. Однако в зависимости от концентрации соли в среде выращивания в клеточных стенках и гликофита, и галофита изменяется количество карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты. Отмечено, что такое изменение в составе функциональных групп полимеров клеточной стенки у галофита выражено более ярко и, вероятно, является одной из ответных реакций этих растений на засоление. Показано, что резкое повышение концентрации NaCl в среде приводит к снижению pH в экстраклеточном водном пространстве вследствие реакций обмена между ионами натрия, поступающими из внешнего раствора, и протонами карбоксильных групп клеточных стенок. Результаты проанализированы с точки зрения участия клеточных стенок листьев в ответных реакциях на засоление.

**Ключевые слова:** *Spinacia oleracea*, *Suaeda altissima*, засоление, ионообменные свойства, клеточная стенка, листья, сведа, шпинат

DOI: 10.31857/S0015330323600316, EDN: QXIQUP

### ВВЕДЕНИЕ

Преодоление неблагоприятного воздействия засоления почв на растения представляет серьезную проблему, над решением которой работают специалисты разного профиля. В настоящее время известно, что одна из основных стратегий в адаптации растений к высоким концентрациям солей, проявляющаяся на клеточном уровне, состоит в поддержании низких концентраций ионов Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в цитоплазме. Это достигается за счет селективности (ионной избирательности) транспортных систем плазмалеммы, через которые K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup> поступают в клетки, и экспорта натрия из цитоплазмы. Активность этих транспортных систем вносит существенный вклад в определение цитоплазматического отношения K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>,

являющегося одним из показателей солеустойчивости растений [1, 2]. Кроме того, клетки поддерживают осмотический потенциал, обеспечивающий поглощение воды в условиях засоления за счет синтеза осмолитов в цитоплазме и процессов компартментации Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в вакуоли [3].

Солеустойчивость растений зависит от распределения ионов Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> по органам и тканям, активности ион-транспортующих систем в разных тканях и, что особенно важно, от путей передвижения ионов Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в целом растении [4]. На уровне целого организма солеустойчивость проявляется в поддержании градиента водного потенциала в системе почва–корень–побег, а также низких концентраций ионов натрия и хлорида в молодых, активно метаболизирующих частях растений, в первую очередь, в меристеме и генеративных органах [5].

**Сокращения:** ГKK – гидроксикоричные кислоты, КС – клеточная стенка, ПГK – полигалактуроновая кислота.

Высокая солеустойчивость двудольных галофитов, например, из семейства *Amaranthaceae*–*Chenopodiaceae*, основывается на поддержании низких концентраций ионов натрия и хлорида в цитозоле, компартментации этих ионов в вакуоли и использовании  $\text{Na}^+$  для поддержания тургора. Накопление ионов в вакуолях позволяет избежать токсического действия больших концентраций  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  и обеспечивает поддержание более низкого водного потенциала в этом компартменте по сравнению с почвенным раствором [6, 7]. В условиях засоления у галофитов наблюдается усиление роста, вызванное стимулирующим влиянием натрия на рост клеток растяжением и водный баланс растения. Однодольные галофиты поглощают меньше  $\text{Na}^+$  по сравнению с двудольными и способны поддерживать высокую концентрацию  $\text{K}^+$  в тканях надземных органов. В этом случае необходимое осмотическое давление и тургор в клетках в большей степени достигается за счет синтеза органических кислот и сахаров, а также накопления ионов калия [8].

У гликофитов большое значение в формировании солерезистентности имеет ограничение входящих потоков натрия и хлорида в корни и их транспорта к надземным органам [9]. На примере большого числа сельскохозяйственных культур было показано, что более устойчивые виды обладают большей способностью исключать  $\text{Na}^+$  из клеток тканей листьев и поддерживать высокий уровень  $\text{K}^+$  в них [10]. При засолении скорость роста листьев большинства злаковых культур была обратно пропорциональна содержанию  $\text{Na}^+$  в клетках листьев. Однако, в отличие от однодольных, для двудольных видов не всегда была характерна подобная корреляция. Например, солеустойчивый дикий вид томата *Lycopersicon peruvianum* накапливал больше  $\text{Na}^+$  в тканях надземных органов по сравнению с культурным видом *L. esculentum* [10].

Описанные выше стратегии выживания растений в условиях повышенной солености в той или иной степени свойственны как галофитам, так и гликофитам [4]. Существует мнение, что физиологические функции и биохимические процессы у двух групп растений различаются скорее в количественном отношении, чем в качественном [11]. Вероятно, это отличие заключается в разной степени использования сходных клеточных механизмов, которые у галофитов приводят к более эффективной работе систем поддержания водного и ионного гомеостаза по сравнению с гликофитами (синтеза осмолитов, ионного гомеостатирования и детоксикации).

Исследованию особенностей функционирования клеточных стенок (КС) корней растений как природных ионообменников в условиях засоления посвящены немногочисленные публикации [12–15]. Сравнительные исследования такого плана,

проведенные на листьях галофитов и гликофитов, в литературе отсутствуют, хотя изучение особенностей КС этих органов крайне важно для выявления механизмов солеустойчивости. В настоящей работе определены ионообменные свойства КС листьев галофита и гликофита, которые обуславливаются в связи с возможным вкладом указанных свойств в адаптацию растений к условиям солевого стресса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 55-дневные растения галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. (сведа) и гликофита *Spinacia oleracea* L. сорта Матадор (шпинат). Семена растений в течение двух недель проращивали во влажном песке (сведа) или вермикулите (шпинат), а затем проростки пересаживали на питательный раствор [16]. Растения росли в оранжерее при дневной температуре воздуха  $25^\circ\text{C}$  и ночной  $18^\circ\text{C}$ , при естественном освещении с подсветкой лампами ДРЛ-1000, при освещенности 25–30 кЛюкс. Четырехнедельные растения подвергали засолению, внося в питательный раствор  $\text{NaCl}$  каждые 2–3 дня таким образом, чтобы концентрация  $\text{NaCl}$  в сосуде увеличивалась не более чем на 50 мМ. Конечная концентрация хлористого натрия в питательной среде для шпината составляла – 0,5, 150, 250 мМ, для сведа – 0,5, 250, 750 мМ (по 5 растений в 10 повторностях на вариант). У 55-дневных растений отделяли листья, определяли их сырую массу, фиксировали в течение 5 мин при  $105^\circ\text{C}$ , а затем высушивали при  $60^\circ\text{C}$  до постоянного веса и определяли сухую массу. Листья у растений шпината разделяли на две части – нижнюю (первые 4 листа) и верхнюю (остальные листья).

Оводненность листьев растений ( $K_{\text{H}_2\text{O}}$ ) рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{H}_2\text{O}} = (m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) / m_{\text{сух}}, \quad (1)$$

где  $m_{\text{сыр}}$  и  $m_{\text{сух}}$  – сырая и сухая масса листьев (г), соответственно.

Выделение КС проводили из высушенных листьев по описанному ранее методу [17]. Навески растительного материала (~1,5 г) помещали в колбы и промывали последовательно 90% этанолом (0,1 л на колбу, в течение 48 ч, при постоянном перемешивании), 1% раствором  $\text{NaOH}$  (~0,6 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании),  $\text{H}_2\text{O}$  (~2 л), 1% раствором  $\text{HCl}$  (~0,6 л, в течение 24 ч, при постоянном перемешивании) и дистиллированной водой до исчезновения в промытых водах хлорид-ионов. Затем определяли сырую и сухую (после высушивания при  $60^\circ\text{C}$ ) массу препарата КС. Данный метод выделения позволяет получить препараты КС, в которых сохранена архитектура тканей, но удалено внутриклеточное со-

держимое, при этом все катионообменные группы полимеров КС присутствуют в  $H^+$ -форме, анионообменные (аминогруппы) – в форме свободного амина [17]. Долю сухой массы КС ( $G_{КС}$ ) в сухой массе листьев (%) определяли по формуле (2):

$$G_{КС} = (m_{КС} / m_{Л}) \times 100, \quad (2)$$

где  $m_{Л}$  и  $m_{КС}$  – сухие массы листьев растений и выделенных из них КС соответственно (г).

Набухание КС в воде и растворах ( $K^{cw}$ ) определяли, измеряя сырую и сухую массу препаратов, и рассчитывали коэффициент набухания по формуле:

$$K^{cw} = (G_F^{cw} - G_D^{cw}) / G_D^{cw}, \quad (3)$$

где  $G_F^{cw}$  и  $G_D^{cw}$  – сырая и сухая масса препаратов КС (г).

Определение качественного и количественного состава ионообменных групп полимерного матрикса КС проводили с использованием потенциометрического титрования, которое осуществляли методом отдельных навесок [18]. Сухие навески образцов КС ( $40 \pm 0.1$  мг) помещали в шлифованные конические колбы (50 мл) с притертой пробкой и заливали 12.5 мл раствора КОН или HCl различной концентрации, но с постоянной ионной силой, которую создавали соответствующими растворами NaCl. Диапазон изменения концентраций кислоты и щелочи составлял 0–10 мМ. По истечении 24 ч КС отделяли от раствора, в котором определяли рН (“Jenway” 3320 рН Meter, Великобритания) и концентрацию оставшейся кислоты или щелочи титрованием с индикатором бромтимоловым синим. По изменению концентрации  $H^+$  или  $OH^-$  рассчитывали сорбционную способность КС при фиксированном значении  $pH_i$  по формуле:

$$S_i = (C^{in} - C^{eq}) \times V / g, \quad (4)$$

где  $S_i$  – сорбционная емкость КС по катионам или анионам (мкмоль/г сухой массы) при соответствующем значении  $pH_i$ ;  $C^{in}$  и  $C^{eq}$  – исходная и равновесная концентрации NaOH или HCl в растворе (мМ);  $V$  – объем раствора (мл);  $g$  – навеска образца (г).

Для КС листьев сведы потенциометрические кривые получены при ионной силе раствора 10, 250 и 750 мМ, а для шпината – 10, 150 и 250 мМ.

Расчет кривых титрования проводили, как описано ранее [17, 18]. Количество функциональных групп каждого типа, а также значения рН, отвечающие началу и концу их ионизации, определяли, анализируя экспериментальные кривые зависимости сорбционной способности КС от рН как описано ранее.

Для определения ионообменной способности КС при разной концентрации хлористого натрия в растворе сухие навески образцов КС ( $40 \pm 0.1$  мг) помещали в шлифованные бюксы с притертой пробкой и заливали 12.5 мл раствора NaCl различной концентрации. По истечении 48 ч образцы отделяли от раствора. В растворах определяли рН до и после контакта с образцами. По изменению концентрации  $H^+$  в растворе рассчитывали сорбционную способность КС при  $pH_i$  по формуле:

$$S = [(10^{(-pH^f)} - 10^{(-pH^{in})}) \times 1000V] / g, \quad (5)$$

где  $S$  – сорбционная емкость образцов КС (мкмоль/г сухой массы);  $pH^f$  и  $pH^{in}$  – исходная и соответствующая равновесная концентрации HCl в растворе (мМ);  $V$  – объем раствора (мл);  $g$  – навеска образца (г).

Опыты проводили в 3 (потенциометрическое титрование) – 10 (определение массы органов) биологических повторениях для каждого варианта выращивания. Обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Приведены средние значения и их стандартные отклонения или ошибки. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Кривые потенциометрического титрования имели сложную полисигмоидную форму, что свидетельствует о наличии в структуре полимерного матрикса КС исследуемых растений нескольких типов функциональных групп [17]. Разделение кривых на моносигмоидные участки проводили согласно дифференциальным кривым ( $dS_i/dpH_i$ ) =  $f(pH_i)$ , имеющим ряд минимумов, которые соответствуют началу (степень диссоциации ( $\alpha$ ) = 0) и концу ( $\alpha$  = 1) ионизации функциональной группы  $j$ -типа [18]. В соответствии с дифференциальными кривыми, полученными из экспериментальных потенциометрических кривых, определили количество ионогенных групп каждого типа, содержащихся в полимерном матриксе КС (табл. 1, 2, подробно см. в [17, 18]).

Для расчета величин констант ионизации ионогенных групп применено модифицированное Грегором уравнение Хендерсона-Хассельбаха [19]:

$$pH = pK_a + n \log_{10} \left( \frac{\alpha}{1 - \alpha} \right), \quad (6)$$

где  $pK_a$  – кажущаяся константа ионизации ионогенной группы полимера,  $\alpha$  – степень диссоциации,  $n$  – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона.

**Таблица 1.** Влияние концентрации хлористого натрия в среде выращивания ( $C^{\text{NaCl}}$ , мМ) на содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты ( $S^1$ ), карбоксильных групп гидроксикоричных кислот ( $S^2$ ) и фенольных ОН-групп ( $S^3$ ) в полимерном матриксе клеточных стенок листьев растений сведы

$C^{\text{NaCl}}$	$S^1$	$S^2$	$S^3$	$S_t^{\text{cat}} = S^1 + S^2 + S^3$
0.5	350 ± 30	650 ± 40	920 ± 11	1820 ± 100
250	720 ± 30	380 ± 15	880 ± 100	1980 ± 140
750	400 ± 13	600 ± 70	800 ± 90	1800 ± 150

Примечание:  $S_t^{\text{cat}}$  – максимальная катионообменная способность полимерного матрикса клеточных стенок, равная ( $S^1 + S^2 + S^3$ ). Все значения выражены в мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

**Таблица 2.** Влияние концентрации хлористого натрия в среде выращивания ( $C^{\text{NaCl}}$ , мМ) на содержание карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты ( $S^1$ ), карбоксильных групп гидроксикоричных кислот ( $S^2$ ) и фенольных ОН-групп ( $S^3$ ) в полимерном матриксе клеточных стенок, изолированных из листьев шпината

$C^{\text{NaCl}}$		$S^1$	$S^2$	$S^3$	$S_t^{\text{cat}} = S^1 + S^2 + S^3$
0.5	Нижние листья	395 ± 34	445 ± 10	630 ± 71	1470 ± 85
	Верхние листья	352 ± 12	387 ± 11	630 ± 71	1369 ± 76
150	Нижние листья	465 ± 16	625 ± 23	465 ± 21	1555 ± 145
	Верхние листья	355 ± 35	465 ± 49	640 ± 14	1460 ± 120
250	Нижние листья	805 ± 50	710 ± 65	390 ± 45	1905 ± 148
	Верхние листья	560 ± 56	720 ± 40	510 ± 49	1790 ± 136

Примечание:  $S_t^{\text{cat}}$  – максимальная катионообменная способность полимерного матрикса клеточных стенок, равная ( $S^1 + S^2 + S^3$ ). Все значения выражены в мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Анализ экспериментальных данных показал, что во всех случаях между соответствующими величинами  $\text{pH}_i$  и  $\log_{10}(\alpha_i/(1 - \alpha_i))$  существует статистически значимая прямолинейная зависимость. С помощью метода регрессионного анализа по уравнению (6) рассчитаны значения  $\text{p}K_a^j$  для каждой ступени ионизации (табл. 3) ионогенных групп КС, изолированных из листьев исследуемых растений, выращенных при разных концентрациях NaCl в питательном растворе. Анализ рассчитанных значений  $\text{p}K_a$  показывает, что КС листьев галофита и гликофита имеют одинаковый качественный состав ионообменных групп.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_{\text{расч}} = B \times S_{\text{эксп}} + A, \quad (7)$$

где  $S_{\text{эксп}}$  и  $S_{\text{расч}}$  – экспериментально полученная и рассчитанная ионообменная способность при соответствующем значении  $\text{pH}$  (мкмоль/г сухой массы КС);  $A$  и  $B$  – параметры регрессии.

Расчеты показали, что выбранная модель полностью соответствует полученным в настоящей работе экспериментальным данным, о чем свиде-

тельствуют величины коэффициентов корреляции ( $r^{\text{ког}}$ ) зависимостей  $S_{\text{расч}} = f(S_{\text{эксп}})$ , а также значения коэффициентов  $A$  и  $B$  в уравнения (7). Во всех вариантах  $r^{\text{ког}} \rightarrow 1$ , значение  $A$  не превышает погрешности эксперимента, а  $B \rightarrow 1$  (данные не показаны).

Содержание воды в тканях ( $K_{\text{H}_2\text{O}}$ ) и КС ( $K^{\text{cw}}$ ) листьев сведы зависело от концентрации соли в среде выращивания, причем оба эти показателя у растений при 250 мМ NaCl в среде были выше, чем у растений, выращенных при 0.5 и 750 мМ NaCl (табл. 4). У шпината и  $K_{\text{H}_2\text{O}}$ , и  $K^{\text{cw}}$  мало зависели от уровня засоления среды выращивания, но для этого растения значения обоих показателей выше у нижних листьев по сравнению с верхними (табл. 5).

Доля КС ( $G_{\text{КС}}$ ) в сухой массе листьев сведы составляла ~38% в вариантах 0.5 и 250 мМ NaCl, но при увеличении уровня засоления среды до 750 мМ  $G_{\text{КС}}$  снижалась в 2 раза (табл. 4). У шпината значение  $G_{\text{КС}}$  слабо зависело от условий выращивания и у верхних, и у нижних листьев (табл. 5) в интервале уровня засоления среды от 0.5 до 250 мМ NaCl.

Важной характеристикой структуры полимерного матрикса КС является коэффициент набухания КС в воде и растворах. Полученные в работе

**Таблица 3.** Средние значения  $pK_a^j$  ионообменных групп клеточных стенок листьев сведы и шпината, рассчитанные по данным потенциометрического титрования клеточных стенок растений, выращенных при разных концентрациях NaCl в питательном растворе

Растение	Тип группы	I		
		10	250	750
		$pK_a^j$		
Шпинат н.л.	ПГК	4.38 ± 0.07	3.74 ± 0.10	–
Шпинат в.л.		4.49 ± 0.01	3.81 ± 0.24	
Сведа		4.50 ± 0.13	3.73 ± 0.15	3.34 ± 0.02
Шпинат н.л.	ГКК	7.22 ± 0.11	6.78 ± 0.24	–
Шпинат в.л.		7.18 ± 0.25	6.89 ± 0.17	
Сведа		7.01 ± 0.22	7.32 ± 0.10	7.12 ± 0.28
Шпинат н.л.	Фен-ОН	10.10 ± 0.14	10.17 ± 0.15	
Шпинат в.л.		10.20 ± 0.28	9.70 ± 0.31	
Сведа		10.2 ± 0.13	9.65 ± 0.12	9.60 ± 0.44

Примечание: ПГК – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; ГКК – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; Фен-ОН – фенольные ОН-группы; I – ионная сила растворов при потенциометрическом титровании (мМ); н.л. – нижние листья; в.л. – верхние листья. Приведены средние значения и их стандартные отклонения. Средние значения  $pK_a^j$  рассчитаны по данным потенциометрического титрования листьев сведы, выращенной при концентрации NaCl в питательном растворе 0.5, 250 и 750 мМ, и шпината, выращенного при концентрации NaCl в питательном растворе 0.5, 150 и 250 мМ.

**Таблица 4.** Оводненность листьев ( $K_{H_2O}$ ), коэффициент набухания клеточных стенок листьев в воде ( $K^{cw}$ ) и их доля в сухой массе листьев ( $G_{КС}$ , %) у растений сведы в зависимости от концентрации NaCl в среде выращивания ( $C^{NaCl}$ , мМ)

$C^{NaCl}$	Листья	Клеточная стенка	
	$K_{H_2O}$	$K^{cw}$	$G_{КС}$
0.5	5.6 ± 0.5	5.2 ± 0.2	39 ± 2
250	7.3 ± 0.4	7.0 ± 0.3	37 ± 2
750	6.6 ± 0.2	6.4 ± 0.4	19 ± 1

Примечание:  $K_{H_2O}$  и  $K^{cw}$  выражены в г  $H_2O$ /г сухой массы листа или клеточных стенок соответственно. Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

данные о набухании КС листьев сведы и шпината показали, что во всех вариантах выращивания степень набухания возрастает с увеличением степени диссоциации карбоксильных групп и уменьшается с возрастанием ионной силы раствора (рис. 1, 2).

Определена ионообменная способность КС ( $S$ ) при изменении концентрации NaCl в растворе и установлено, что независимо от уровня засоления среды выращивания значение этого показателя увеличивалось с ростом концентрации NaCl в среде инкубации КС как для листьев галофита, так и гликофита (рис. 3, 4).

У шпината с увеличением уровня засоления среды от 0.5 до 250 мМ значение  $S$  возрастало и в варианте выращивания 250 мМ достигало 200

(верхние листья) и 250 (нижние листья) мкмоль/г сухой массы КС при  $pNa = 0$  в среде инкубации. Следует отметить, что при любых условиях ионообменная способность КС нижних листьев была больше, чем аналогичный показатель верхних листьев (рис. 1). У сведы самым высоким значением ионообменной способности, которое составляло 350 мкмоль/г сухой массы при  $pNa = 0$ , характеризовались КС листьев растений 250 мМ варианта выращивания (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

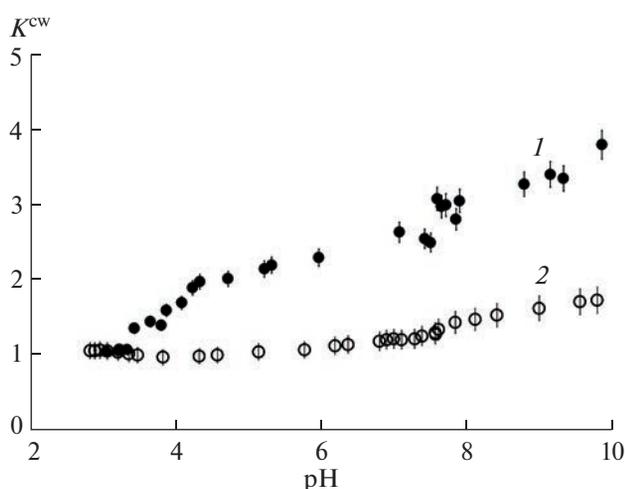
В структуре полимерного матрикса КС листьев гликофита, как и галофита, присутствуют ионогенные группы четырех типов, способные

**Таблица 5.** Оводненность листьев ( $K_{H_2O}$ ), коэффициент набухания клеточных стенок листьев в воде ( $K^{cw}$ ) и их доля в сухой массе листьев ( $G_{KC}$ , %) у растений шпината в зависимости от концентрации NaCl в среде выращивания ( $C^{NaCl}$ , мМ)

$C^{NaCl}$	Листья	Клеточная стенка	
	$K_{H_2O}$	$K^{cw}$	$G_{KC}$
0.5 (в.л.)	$10.7 \pm 0.3$	$7.9 \pm 0.3$	$38 \pm 5$
150 (в.л.)	$10.6 \pm 0.4$	$7.8 \pm 0.5$	$32 \pm 1$
250 (в.л.)	$9.4 \pm 0.7$	$8.0 \pm 0.4$	$34 \pm 3$
0.5 (н.л.)	$14.7 \pm 0.9$	$9.2 \pm 0.6$	$36 \pm 3$
150 (н.л.)	$12.6 \pm 0.3$	$9.9 \pm 0.7$	$31 \pm 1$
250 (н.л.)	$11.6 \pm 0.8$	$9.5 \pm 0.7$	$31 \pm 2$

Примечание:  $K_{H_2O}$  и  $K^{cw}$  выражены в г  $H_2O$ /г сухой массы листьев или клеточных стенок соответственно. н.л. – нижние листья; в.л. – верхние листья. Приведены средние значения и их стандартные ошибки.

участвовать в обменных реакциях с ионами внешней среды при соответствующих условиях: три из них – катионообменные (табл. 1, 2), а четвертая обменивает анионы. Во всех вариантах содержание анионообменных групп ( $S_t^{an}$ ) изменяется от 60 до 150 (данные не приведены), а общее количество катионообменных ( $S_t^{cat}$ ) – от 1200 до 1800 мкмоль/г сухой массы КС (табл. 1, 2). Эти данные показывают, что КС листьев исследуемых растений, как и стенки их корней [13], являются природными катионообменниками, т.к. значения  $S_t^{cat}$  более чем в 10 раз превышают значения  $S_t^{an}$ .



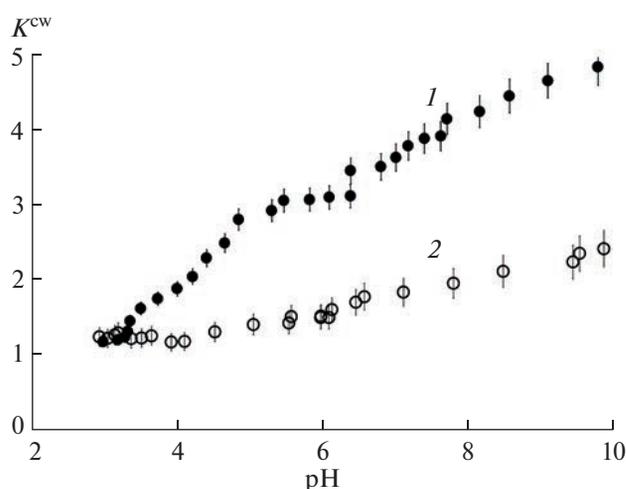
**Рис. 1.** Влияние pH и ионной силы (I) на коэффициент набухания клеточных стенок ( $K^{cw}$ ), изолированных из листьев растений сведы, выращенных при 0.5 мМ NaCl в питательном растворе. 1 – I = 10 мМ, 2 – I = 750 мМ.

На основании рассчитанных значений  $pK_a^j$ , данных по химическому составу КС [20] и результатов потенциометрического титрования КС корней растений [17, 18] можно полагать, что ионогенные группы с  $pK_a$  3–5 являются карбоксильными группами полигалактуроновой кислоты (ПГК), группы с  $pK_a \sim 7$  – карбоксильными группами гидроксикоричных кислот (ГКК), а группы с  $pK_a \sim 9.6$ –10 – фенольными ОН-группами. Анализ рассчитанных значений  $pK_a$  показывает, что КС листьев галофита и гликофита имеют одинаковый качественный состав ионообменных групп (табл. 3) независимо от уровня засоления среды.

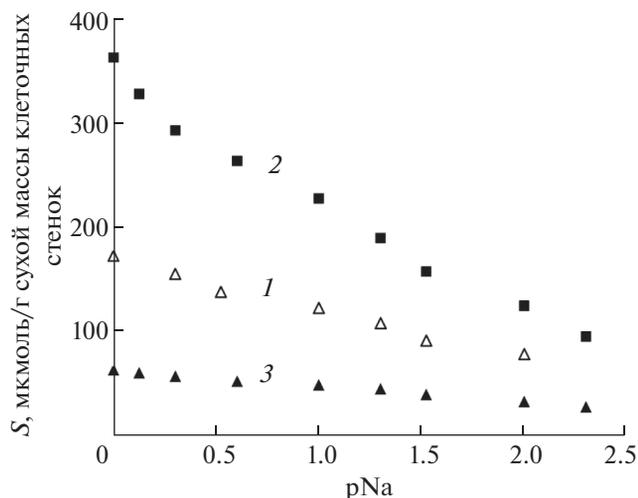
У сведы и шпината с увеличением концентрации соли ( $C^{NaCl}$ ) в среде изменяется количество карбоксильных групп ПГК ( $S^{ПГК}$ ), но у галофита и гликофита эти изменения носят разный характер.

У галофита в интервале  $C^{NaCl}$  в среде 0.5–750 мМ зависимость  $S^{ПГК} = f(C^{NaCl})$  имеет экстремальный характер с максимумом в 250 мМ варианте выращивания, при этом значение  $S^{ПГК}$  достигает 720 мкмоль/г сухой массы КС, тогда как при минимальном (0.5 мМ) и максимальном (750 мМ) уровнях засоления этот показатель в 2 раза ниже (табл. 1). Следует отметить, что аналогичный экстремальный характер зависимостей был ранее обнаружен при определении других показателей, характеризующих состояние как листьев, так и корней сведы: накопление и распределение ионов  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ , и  $NO_3^-$ , ростовые параметры, биохимические характеристики [21].

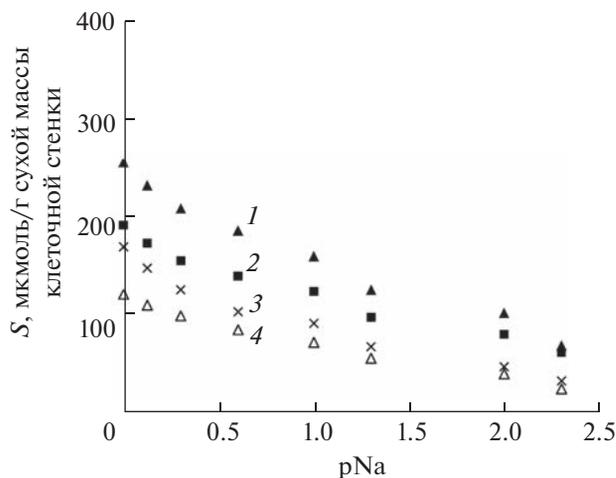
У шпината с увеличением  $C^{NaCl}$  от 0.5 до 250 мМ возрастает содержание карбоксильных групп



**Рис. 2.** Влияние pH и ионной силы (I) на коэффициент набухания клеточных стенок ( $K^{cw}$ ), изолированных из нижних листьев растений шпината, выращенных при 0.5 мМ NaCl в питательном растворе. 1 – I = 10 мМ, 2 – I = 250 мМ.



**Рис. 3.** Влияние концентрации NaCl (pNa) на ионообменную способность клеточных стенок ( $S$ ), изолированных из листьев растений сведы, выращенных на разных концентрациях NaCl в среде: 1 – 0.5 мМ; 2 – 250 мМ; 3 – 750 мМ.



**Рис. 4.** Влияние концентрации NaCl (pNa) на ионообменную способность клеточных стенок ( $S$ ), изолированных из листьев растений шпината, выращенных на разных концентрациях NaCl в среде: нижние листья 1 – 250 мМ; 3 – 0.5 мМ; верхние листья 2 – 250 мМ; 4 – 0.5 мМ.

ПГК, как в верхних, так и в нижних листьях, но у первых – в 1.4, а у вторых – в 2 раза (табл. 2) по сравнению с КС листьев растений, выращенных при 0.5 мМ NaCl. Следует отметить, что, в отличие от сведы, в КС листьев обеих частей побега шпината значительно увеличивается и содержание карбоксильных групп ПГК, которые также могут принимать участие в ионообменных реакциях при соответствующих условиях (табл. 2). При любых условиях общее содержание ионообменных групп в КС нижних листьев больше, чем в КС верхних. Эти результаты подтверждают предположение о том, что КС зрелых листьев можно рассматривать как запасной пул катионов. В условиях засоления ограничение поступления ионов натрия и хлорида в молодые листья за счет большего накопления этих ионов в КС зрелых тканей является, вероятно, важным адаптивным свойством растений шпината. Известно, что солеустойчивость определяется способностью поддерживать градиент ионов натрия и хлорида между старыми и молодыми листьями, при этом общее содержание солей в тканях не играет существенной роли [22]. В литературе отсутствуют данные о влиянии солевого стресса на содержание ПГК и пектинов в КС надземных частей растений, однако для корней гликофита *Arabidopsis thaliana* были показаны индукция синтеза  $\beta$ -1,4-галактана [23] и активация пектинметилэстераз [24] при засолении, что является предпосылкой для увеличения содержания свободных карбоксильных групп ПГК в КС.

Изменения в количестве групп ПГК при увеличении концентрации соли в среде, вероятно, являются одной из ответных реакций исследованных растений на засоление, при этом следует

отметить, что у сведы такие изменения более ярко выражены.

И у галофита, и у гликофита с увеличением содержания NaCl в питательном растворе уменьшается значение  $pK_a$  карбоксильных групп ПГК (усиливаются их кислотные свойства), в то время как для двух других типов катионообменных групп эти значения варьируют незначительно (табл. 3).

В предыдущих исследованиях [25, 26] константу диссоциации карбоксильных групп ПГК рассчитывали по уравнению Гельфериха [27]:

$$pK_a = pH + \log_{10}(C^{Na^+}) - \log_{10}(X/2), \quad (8)$$

где  $pK_a$  – константа ионизации ионогенной группы в слабокислотном ионообменнике (каковым и является КС), величина которой приблизительно равна константе диссоциации для аналогичной группы в растворимой полимерной кислоте;  $pK_a$  – величина pH, при которой 50% ионогенных групп диссоциировано (в нашем случае эта величина pH равна  $pK_a^{ПГК}$ ; табл. 3);  $C^{Na^+}$  – концентрация натрия в растворе (М);  $X$  – концентрация активных групп в ионообменнике (мкмоль/г сухой массы КС).

Таким образом, график зависимости  $pH = f[\log_{10}(C^{Na^+})]$  должен иметь вид прямой линии с отрезком, отсекаемым на оси ординат, равным  $pK_a$  растворимой полимерной кислоты. Анализ указанной зависимости показывает, что она действительно является прямолинейной ( $pK_a^{ПГК} = -0.624 \log_{10} C^{Na^+} + 3.30$ ,  $r_{corr}^2 = 0.992$ ) с отрезком,

отсекаемым на оси  $y$ , равным 3.30. Эта величина приблизительно соответствует значениям, которые получали ранее другие исследователи [25, 26]. В соответствии с уравнением Гельфериха это означает, что у исследуемых галофита и гликофита группы с  $pK_a^2$  действительно являются карбоксильными группами ПГК в трехмерной полимерной структуре КС листьев, так как значение  $pK_a$  растворимой полигалактуроновой кислоты составляет 3.42 [28].

Поскольку с увеличением содержания NaCl в питательном растворе уменьшается  $pK_a$  карбоксильных групп ПГК, в этих условиях должно происходить увеличение ионообменной способности полимерного матрикса КС. Доказательством справедливости последнего утверждения могут служить зависимости ионообменной способности КС листьев сведы и шпината от концентрации хлорида натрия ( $C^{NaCl}$ ) во внешнем растворе (рис. 1, 2). Во всех вариантах выращивания у галофита и гликофита с увеличением  $C^{NaCl}$  резко возрастает ионообменная способность КС. В зависимости от условий выращивания в листьях сведы этот показатель изменяется от 50 до 150–350, а в листьях шпината – от 30 до 130–200 мкмоль/г сухой массы КС в интервале изменения ионной силы от 5 до 1000 мМ (рис. 1, 2). При всех  $C^{NaCl}$  способность к ионному обмену КС сведы выше по сравнению со шпинатом, что может свидетельствовать о более эффективной компартментации ионов в тканях галофита. Следует отметить, что выявленные закономерности изменения ионообменной способности с увеличением  $C^{NaCl}$  имеют аналогичный характер и для корней исследуемых растений [13, 14].

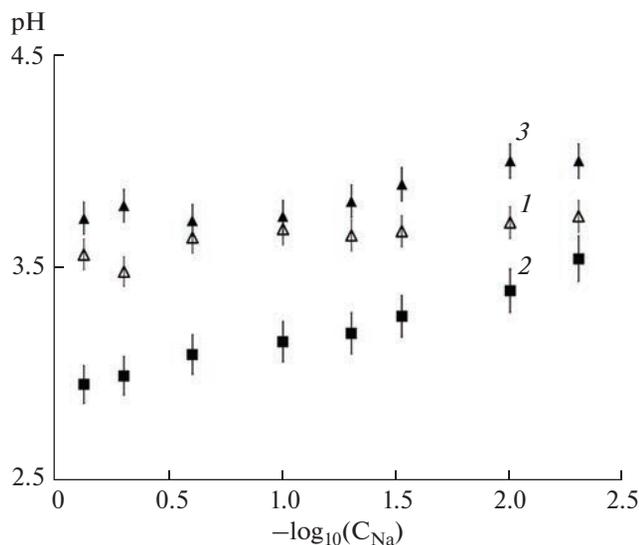
Растительная КС представляет собой природный слабосшитый ионообменник [13, 17]. Одним из важных физико-химических показателей, которые количественно характеризуют свойства полимера как ионообменника, является набухание. Количественной характеристикой этого процесса служит весовой коэффициент набухания. Причиной набухания ионообменных материалов в водном растворе является наличие гидрофильных групп, причиной нерастворимости – существование поперечных связей. Основываясь на знаниях о физико-химических закономерностях набухания синтетических ионообменных материалов [27], можно полагать, что главный фактор, который определяет способность к набуханию – это степень сшивки полимерных цепей, расположенных в структуре КС. Прямых методов, позволяющих определить этот параметр, не существует, но есть возможность его оценки косвенным путем. Известно, что, чем выше степень сшивки полимерных цепей, тем ниже коэффициент набухания полимерного материала в воде [29, 30].

Сравнительный анализ коэффициентов набухания КС сведы (табл. 4) и шпината (табл. 5) в воде показывает, что сведа характеризуется более высокой степенью сшивки полимеров в матриксе КС листьев, так как для нее значения этого показателя ниже, чем у гликофита. На основании этих результатов можно предположить, что в условиях засоления КС галофита является более эффективным барьером для ионов натрия по сравнению с КС гликофита. Вероятно, данный эффект играет важную роль в механизме солеустойчивости галофита, особенно при резких колебаниях концентрации соли в окружающей среде.

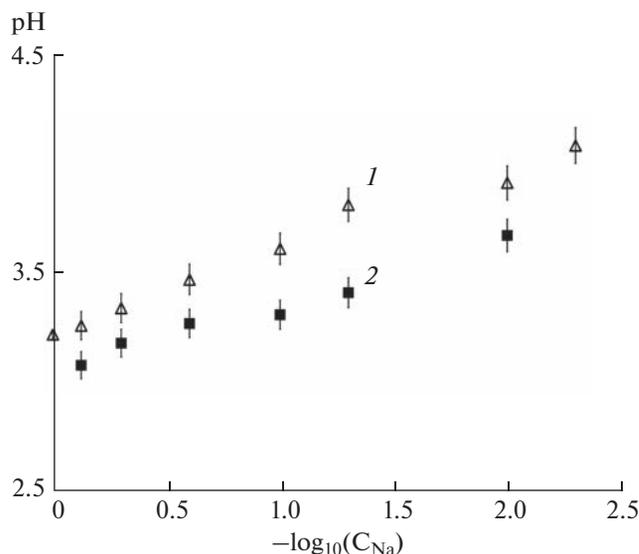
Таким образом, результаты исследования показывают, что существуют отличия в строении полимерного матрикса КС листьев сведы и шпината, которые обусловлены разной степенью сшивки полимерных цепей. Более жесткая структура полимерного матрикса галофита обеспечивает более высокую механическую и химическую устойчивость КС в условиях засоления по сравнению с гликофитом.

На основании результатов работы возможно оценить концентрацию протонов в водном пространстве апопласта, образующихся в результате реакций обмена между катионами внешней среды и протонами ионизированных карбоксильных групп КС при изменении уровня засоления внешней среды. Иллюстрацией этого явления служит полученная экспериментальная зависимость  $pH = f(-\log_{10} C^{Na})$  (рис. 5, 6). Расчеты показывают, что увеличение концентрации NaCl во внешнем растворе от 0.5 до 1000 мМ приведет к снижению pH в водной фазе КС на 2–3 единицы, причем чем больше количество групп ПГК в КС, тем большее количество протонов выделяется из полимерного матрикса КС в водное пространство апопласта.

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что снижение pH в апопласте за счет работы  $H^+$ -АТФазы приводит к стимулированию различных транспортных процессов, в том числе выкачиванию натрия из цитоплазмы с помощью  $Na^+/H^+$ -антипортера [31] и входу калия через  $K^+$ -селективные входные каналы (KIRCs) плазматической мембраны [32]. С другой стороны, результаты исследования ионообменных свойств КС показывают, что в условиях солевого стресса за счет реакций обмена между катионами  $Na^+$  внешнего раствора и протонами карбоксильных групп КС достигается высокая концентрация протонов около плазмалеммы, которая, вероятно, влияет на процессы транспорта ионов. При исследовании адаптации корней кукурузы к низким значениям pH питательного раствора в экспериментах *in vivo* [33] установлено, что при pH 5.6 выделение протонов корнями кукурузы, которая росла при pH питательной смеси 3.4, было почти в 3 раза выше по сравнению с контролем (выращивание при pH



**Рис. 5.** Влияние концентрации NaCl ( $C^{\text{Na}}$ , М) на pH растворов после контакта с клеточными стенками, выделенными из листьев растений сведы. pH исходных растворов  $6.3 \pm 0.3$ . Растения были выращены при разной концентрации NaCl в питательном растворе: 1 – 0.5 мМ; 2 – 250 мМ; 3 – 750 мМ.



**Рис. 6.** Влияние концентрации NaCl ( $C^{\text{Na}}$ , М) на pH растворов после контакта с клеточными стенками, выделенными из нижних листьев шпината. pH исходных растворов  $6.3 \pm 0.3$ . Растения были выращены при разной концентрации NaCl в питательном растворе: 1 – 0.5 мМ; 2 – 150 мМ.

6.5). В опытах *in vitro* на выделенной из этих корней кукурузы фракции плазмалеммы показано увеличение гидролитической активности АТФазы, активности выкачивания протонов, протонной проницаемости плазмалеммы и градиента pH через мембраны везикул плазмалеммы. Авторы заключили, что  $\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы вносит значительный вклад в адаптацию корней к низким значениям pH среды. Кроме того, сравнительное исследование регуляции экспрессии гена  $\text{H}^+$ -АТФазы плазмалеммы хлористым натрием у галофита (*Atriplex nummularia* L.) и гликофита (*Nicotiana tabacum* L.) показывает, что более высокая способность галофитов индуцировать экспрессию гена  $\text{H}^+$ -АТФазы Р-типа в ответ на воздействие NaCl может вносить вклад в их солеустойчивость [34]. Возрастание активности протонных АТФаз плазмалеммы в ответ на засоление было показано как для галофитов, так и гликофитов [35]. На основании этих данных и результатов настоящей работы (рис. 3) можно предположить, что более высокая активность  $\text{H}^+$ -АТФазы у галофитов по сравнению с гликофитами может быть обусловлена адаптивными процессами, связанными с возникновением высокой концентрации протонов в экстраклеточном пространстве в условиях солевого стресса, в том числе, за счет реакций обмена между катионами внешней среды и протонами карбоксильных групп КС.

Сравнительный анализ данных об ионообменных свойствах КС корней галофита и гликофита, полученных ранее [13, 14], и КС листьев, установ-

ленных в настоящей работе, показывает, что КС и листьев, и корней сведы и шпината одинаковым образом реагируют на увеличение концентрации NaCl в окружающей среде: происходит увеличение содержания карбоксильных групп ПГК в КС, увеличение количества активных сайтов связывания ионов натрия за счет снижения значений  $\text{pK}_a$  карбоксильных групп ПГК и увеличение концентрации протонов вследствие ионообменных реакций. Однако в листьях и гликофита, и галофита указанные ответы на повышение концентрации NaCl в окружающей среде выражены более ярко по сравнению с корнями, т.к. первые имеют значительно более высокое содержание карбоксильных групп ПГК.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные об ионообменных свойствах КС листьев галофита и гликофита подтверждают существующее мнение о том, что физиологические функции и биохимические процессы у этих двух групп растений различаются скорее в количественном отношении, чем в качественном.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на кафедре физиологии растений МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032300068-8).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Aleman F., Nieves-Cordones M., Martinez V., Rubio F.* Potassium/sodium steady-state homeostasis in *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana* under long-term salinity conditions // *Plant Sci.* 2009. V. 176. P. 768.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.020>
2. *Ghars M.A., Parre E., Debez A., Bordenave M., Richard L., Lepout L., Bouchereau A., Savouret A., Abdelly C.* Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on  $K^+/Na^+$  selectivity and proline accumulation // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 588.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.014>
3. *Møller I.S., Tester M.* Salinity tolerance of *Arabidopsis*: a good model for cereals? // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 534.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.09.009>
4. *Tester M., Danenport R.*  $Na^+$  tolerance and  $Na^+$  transport in higher plants // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 503.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
5. *White P.J., Broadley M.R.* Chloride in soils and its uptake and movement within the plant // *Ann. Bot.* 2001. V. 88. P. 967.  
<https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1540>
6. *Balnokin Y.V., Kotov A.A., Myasoedov N.A., Khailova G.F., Kurkova E.B., Lun'kov R.V., Kotova L.M.* Involvement of long-distance  $Na^+$  transport in maintaining water potential gradient in the medium-root-leaf system of a halophyte *Suaeda altissima* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2005. V. 52. P. 489.  
<https://doi.org/10.1007/s11183-005-0072-z>
7. *Balnokin Y.V., Myasoedov N.A., Shamsutdinov Z.Sh., Shamsutdinov N.Z.* Significance of  $Na^+$  and  $K^+$  for sustained hydration of organ tissues in ecologically distinct halophytes of the family Chenopodiaceae // *Russ. J. Plant Physiol.* 2005. V. 52. P. 779.  
<https://doi.org/10.1007/s11183-005-0115-5>
8. *Liang W., Ma X., Wan P., Liu L.* Plant salt-tolerance mechanism: A review // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 495. P. 286.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>
9. *Blumwald E.* Sodium transport and salt tolerance in plants // *Cur. Opin. Cell Biol.* 2000. V. 12. P. 431.  
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00112-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00112-5)
10. *Zhu J.-K.* Plant salt tolerance // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 66.  
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01838-0)
11. *Yeo A.R.* Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology // *J. Exp. Bot.* 1998. V. 49. P. 915.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/49.323.915>
12. *Bigot J., Binet P.* Exchange capacity and parietal cation selectivity isolated from the roots of *Cochleria anglica* and *Phaseolus vulgaris* grown in media of different salinities // *Can. J. Bot.* 1986. V. 64. P. 955.
13. *Meychik N.R., Nikolaeva J.I., Yermakov I.P.* Ion exchange properties of the root cell walls isolated from halophyte plants (*Suaeda altissima* L.) grown under conditions of different salinity // *Plant Soil.* 2005. V. 277. P. 163.  
<https://doi.org/10.1023/A:1017936318435>
14. *Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Yermakov I.P.* Ion-exchange properties of cell walls of *Spinacia oleracea* L. roots under different environmental salt conditions // *Biochem. (Moscow).* 2006. V. 71. P. 781.  
<https://doi.org/10.1134/s000629790607011x>
15. *Meychik N., Nikolaeva Yu., Kushunina M.* The significance of ion exchange properties of plant root cell walls for nutrient and water uptake by plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2021. V. 166. P. 140.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.048>
16. *Robinson S.P., Dountov S.D.* Potassium, sodium and chloride concentrations in leaves and isolated chloroplasts of the halophyte *Suaeda australis* R. // *Aust. J. Plant Physiol.* 1985. V. 12. P. 471.
17. *Meychik N.R., Yermakov I.P.* Ion exchange properties of plant root cell walls // *Plant Soil.* 2001. V. 234. P. 181.  
<https://doi.org/10.1023/A:1017936318435>
18. *Meychik N.R., Yermakov I.P.* A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // *Plant Soil.* 1999. V. 217. P. 257.  
<https://doi.org/10.1023/A:1004675309128>
19. *Gregor H.P., Luttinger L.D., Loeb E.M.* Titration polyacrylic acid with quaternary ammonium bases // *J. Amer. Chem. Soc.* 1954. V. 76. P. 5879.
20. *Houston K., Tucker M.R., Chowdhury J., Shirley N., Little A.* The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 984.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
21. *Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Yermakov I.P.* Physiological response of halophyte (*Suaeda altissima* (L.) Pall.) and glycophyte (*Spinacia oleracea* L.) to salinity // *Am. J. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 427.  
<https://doi.org/10.4236/ajps.2013.42A055>
22. *Marschner H.* Mineral nutrition of higher plants. San Diego: Academic Press, 1995. P. 862.
23. *Yan J., Liu Y., Yang L., He H., Huang Y., Fang L., Vibe Scheller H., Jiang M., Zhang A.* Cell wall  $\beta$ -1,4-galactan regulated by the BPC1/BPC2-GALS1 module aggravates salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant.* 2021. V. 14. P. 411.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.023>
24. *Gigli-Bisceglia N., van Zelm E., Huo W., Lamers J., Testerink C.* *Arabidopsis* root responses to salinity depend on pectin modification and cell wall sensing // *Development.* 2022. V. 149. dev200363.  
<https://doi.org/10.1242/dev.200363>
25. *Freundling C., Starrach N., Flach D., Gradmann D., Mayer W.-E.* Cell walls as reservoirs of potassium ions for reversible volume changes of pulvinar motor cells during rhythmic leaf movements // *Planta.* 1988. V. 175. P. 193.
26. *Starrach N., Flach D., Mayer W.-E.* Activity of fixed negative charges of isolated extensor cell walls of the laminar pulvinus of primary leaves of *Phaseolus* // *J. Plant Physiol.* 1985. V. 120. P. 441.

27. Гельферих Ф. Иониты. Москва: Издательство Иностранной Литературы, 1962. 490 с.
28. Richter C., Dainty J. Ion behavior in plant cell walls. Characterization of the *Sphagnum russowii* cell wall ion exchanger // Can. J. Bot. 1989. V. 67. P. 451.
29. Либинсон Г.С. Физико-химические свойства карбоксильных катионитов. Москва: Наука, 1968. 182 с.
30. Шатаева Л.А., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Е. Карбоксильные иониты в биологии. Ленинград: Наука, 1979. 286 с.
31. Qiu Q.S., Barkla B.J., Vera-Estrella R., Zhu J.K., Schumaker K.S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1041.  
<https://doi.org/10.1104/pp.102.010421>
32. Amtmann A., Jelitto T.C., Sanders D. K<sup>+</sup>-selective inward-rectifying channel and apoplastic pH in barley roots // J. Plant Physiol. 1999. V. 119. P. 331.
33. Yan F., Feuerle R., Schäffer S., Fortmeier H., Schubert S. Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH // J. Plant Physiol. 1998. V. 117. P. 311.
34. Niu X., Narasimhan M.L., Salzman R.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M. NaCl regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte // J. Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 713.
35. Janicka-Russak M., Kabała K. The role of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in salinity stress of plants // Progress in Botany. Vol. 76 / Eds. U. Lüttge, W. Bey-schlag. Springer. 2015. P. 77.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-08807-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08807-5_3)

УДК 581.1

## РОСТ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КАДМИЯ, СВИНЦА И НИКЕЛЯ

© 2023 г. Ж. В. Маркина<sup>а, \*</sup>, А. В. Огнистая<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского” Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

<sup>б</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Дальневосточный федеральный университет”, Владивосток, Россия

\*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 03.05.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Оценено действие тяжелых металлов – кадмия, свинца и никеля на рост и физиологическое состояние рафидофитовой водоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU\_HAK-SR11 (Y.Nada) Y.Nada ex Y.Nara, M.Chihara в течение 7 суток опыта. Выявлено, что кадмий и никель в концентрациях 10 и 20 мкг/л стимулировали рост *H. akashiwo*, а свинец при данных концентрациях – ингибировал. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов при добавлении 10 мкг/л кадмия и 20 мкг/л никеля увеличивалось, при добавлении 20 мкг/л кадмия содержание каротиноидов было выше такового в контроле. При внесении свинца наблюдалось повышение уровня хлорофилла *a* и уменьшение содержания каротиноидов. Содержание АФК увеличивалось при внесении кадмия и свинца, а при внесении никеля снижалось. Кадмий оказал действие на продукцию нейтральных липидов: их содержание повышалось, а к концу опыта снижалось. Никель стимулировал накопление нейтральных липидов *H. akashiwo*, а свинец никак не влиял на их содержание. Наименьшее влияние металлы оказали на прямое и боковое светорассеяние и флуоресценцию хлорофилла *a*. Отсутствие выраженных изменений прямого и бокового светорассеяния косвенно свидетельствуют о том, что морфологически клетки водоросли не изменялись при токсическом воздействии. Таким образом, кадмий, свинец и никель в концентрациях 10–20 мкг/л изменяли физиологические процессы у водоросли.

**Ключевые слова:** *Heterosigma akashiwo*, фотосинтетические пигменты, хлорофилл *a*, каротиноиды, флуоресценция хлорофилла *a*, активные формы кислорода, нейтральные липиды, кадмий, свинец, никель

DOI: 10.31857/S0015330323600298, EDN: ONEXCE

### ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение тяжелыми металлами постоянно возрастает в связи с увеличением площадей сельскохозяйственных угодий и промышленного производства. Также данные токсиканты присутствуют в окружающей среде благодаря естественным процессам, например, вулканизму, выветриванию и эрозии почв [1].

Большинство тяжелых металлов в определенных количествах необходимы для нормальной жизнедеятельности растений, например, никель (Ni). Однако, такие как кадмий (Cd) и свинец (Pb) являются неэссенциальными элементами, вызывающими негативные изменения у растений, прежде всего за счет продуцирования актив-

ных форм кислорода (АФК) и отрицательного влияния на активность ферментов [1, 2].

Никель играет важную роль в функционировании Ni-содержащего фермента уреазы и Ni-супероксиддисмутазы. Большинство представителей морского фитопланктона использует уреазу для гидролиза мочевины до аммония и диоксида углерода. По этой причине при недостатке никеля рост микроводорослей ингибируется [3].

Одноклеточные водоросли, как основа трофических цепей и основной источник кислорода в водных экосистемах, вызывают закономерный интерес в экотоксикологическом плане у исследователей [2–5]. Большинство работ по действию тяжелых металлов в ионной форме на микроводоросли ограничивается представителями отдела Chlorophyta [4, 6–9]. В тоже время представители рафидофитовых водорослей остаются слабоизучен-

**Сокращения:** БС – боковое светорассеяние, НЛ – нейтральные липиды, ПС – прямое светорассеяние.

ными [10, 11]. Одним из часто встречающихся видов рафидофитовых является *Heterosigma akashiwo*, вызывающий вредоносные “цветения”, что приводит к массовой гибели рыб и беспозвоночных [12, 13].

Традиционно оценку действия токсических веществ на микроводоросли проводят по изменению численности клеток, их размера и формы, так как это интегральные показатели, отражающие происходящие в организмах водорослей процессы [9, 14]. Пристальное внимание исследователей к воздействию тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат связано с тем, что хлоропласты ответственны за многие процессы в растительной клетке [15]. В качестве параметров оценки состояния фотосинтетического аппарата используют содержание пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов) и флуоресценцию хлорофилла *a* [14, 16]. При неблагоприятных воздействиях на живой организм возрастает содержание АФК, в связи с чем этот показатель часто контролируют в экотоксикологических исследованиях [17]. Также для оценки стрессового воздействия при неблагоприятных воздействиях на организм водорослей изучают содержание в микроводорослях нейтральных липидов (НЛ) [18, 19].

Цель работы – оценка действия кадмия, свинца и никеля на численность клеток, их размер и внутреннюю структуру, фотосинтетический аппарат, содержание АФК и НЛ у микроводоросли *H. akashiwo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU\_HAK-SR11 (Y.Nada) Y. Nada ex Y. Nara, M. Chihara (Raphidophyceae), предоставленная Центром коллективного пользования “Морской биобанк” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (<http://marbank.dvo.ru>).

**Условия проведения экспериментов.** Водоросли выращивали на среде *f* [20], приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰ в 250 мл колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 100 мл, при температуре 18°C, интенсивности освещения 70 мкмоль/(м<sup>2</sup>с) в области видимого света и 14-часовом световом дне. В качестве инокулята использовали культуру на экспоненциальной стадии роста. Продолжительность экспериментов составляла 7 суток. Пробы для анализа показателей отбирали на 3 и 7 сутки.

Кадмий добавляли в виде солей 3CdSO<sub>4</sub> · 8H<sub>2</sub>O, Ni – NiSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Pb – PbCl<sub>2</sub> с пересчетом на ионы металла в день постановки эксперимента. Ис-

следуемые концентрации Cd, Ni и Pb составляли: 10 и 20 мкг/л. Выбор концентраций основан на содержании данных металлах в прибрежных водах России и их предельно допустимых концентрациях – изученные концентрации соответствуют ПДК и 2ПДК.

Под термином рост в данной статье понимается рост популяции: увеличение роста – стимуляция численности клеток микроводоросли, угнетение роста – уменьшение численности популяции.

**Методы измерений.** Измерения показателей (численность клеток, прямое и боковое светорассеяние) производили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа в течение каждого измерения записывали 10000 событий (региструемых в пробе частиц). Выбор клеток водорослей из общего числа событий, записываемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* [21]. Прямое светорассеяние (ПС), косвенно характеризующее размер клеток водоросли, регистрировали на канале FSC. Боковое светорассеяние (БС), характеризующее внутреннюю структуру (гранулярность), регистрировали на канале SSC. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали при длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм – канал PC 5.5 [21]. Продукцию АФК оценивали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата, окрашивание проводили в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Показатель флуоресценции его окисленного и диацетилированного продукта определяли на длине волны 525 нм, длина волны возбуждения 488 нм – канал FITC [17]. Содержание НЛ определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red в концентрации 1 мкг/мл, окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, длина волны возбуждения 488 нм, испускания – 580 нм – канал PE [22].

Для анализа содержания фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и общего содержания каротиноидов) суспензию водорослей собирали на мембранных фильтрах МФАС-ОС-2. Пигменты экстрагировали 90% ацетоном, полученный экстракт центрифугировали в течение 15 мин при 7000 об/мин на центрифуге Allegra X-22R (Beckman-Coulter, США). Супернатант отбирали и определяли его оптическую плотность с помощью спектрофотометра Shimadzu-UV 2550 (Shimadzu, Япония) при следующих длинах волн: 480, 630, 647, 664 и 750 нм. Расчет концентраций пигмента проводили по стандартным формулам [23].

**Статистический анализ.** Эксперименты проведены в трех биологических повторностях. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel. Данные по численности клеток, прямому и боковому светорассеянию, флуорес-

ценции хлорофилла *a*, содержанию хлорофилла *a*, каротиноидов, АФК и НЛ представлены в виде процентов к контролю. На графиках даны средние значения девяти измерений. Бары на графиках – стандартное отклонение измеряемых величин. Достоверность различий между выборками оценивали по *U*-критерию Манна-Уитни при уровне значимости  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Кадмий в среде при всех концентрациях стимулировал рост популяции *H. akashiwo* на всем протяжении опыта (рис. 1а). Показатель ПС достоверно отличался от контрольного на седьмые сутки опыта при 10 мкг/л Cd (рис. 1б). Показатель БС увеличивался на третьи сутки и к завершению эксперимента значительно снижался при обеих концентрациях металла (рис. 1в). Флуоресценция хлорофилла *a* снижалась к седьмым суткам во всех экспериментальных вариантах (рис. 1г). Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов было выше контрольного при внесении 10 мкг/л Cd на всем протяжении опыта, а при 20 мкг/л содержание хлорофилла *a* не отличалось от контрольного, при этом содержание каротиноидов возрастало (рис. 1д, е). Также к седьмым суткам содержание АФК было выше контрольного (рис. 1ж). Содержание НЛ увеличивалось к третьим суткам опыта и падало к седьмым (рис. 1е).

Свинец в обеих концентрациях вызывал небольшую стимуляцию роста микроводоросли на третьи сутки и слабое угнетение на седьмые (рис. 2а). Показатели ПС и БС увеличивались при 10 мкг/л металла на седьмые сутки (рис. 2б, 3в). Флуоресценция хлорофилла *a* на седьмые сутки уменьшалась в присутствии 20 мкг/л токсиканта (рис. 2г). Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов увеличивалось на третьи сутки и существенно уменьшалось на седьмые, особенно при 20 мкг/л свинца (рис. 2д, е). Содержание АФК превышало контрольное в 3.5 и 4.6 раза при концентрации свинца в среде 10 и 20 мкг/л, соответственно, на третьи сутки опыта и было выше контрольного на седьмые сутки (рис. 2ж). Содержание НЛ достоверно находилось на уровне контроля в течение эксперимента за исключением превышения такового при концентрации свинца в среде 10 мкг/л, на седьмые сутки (рис. 2з).

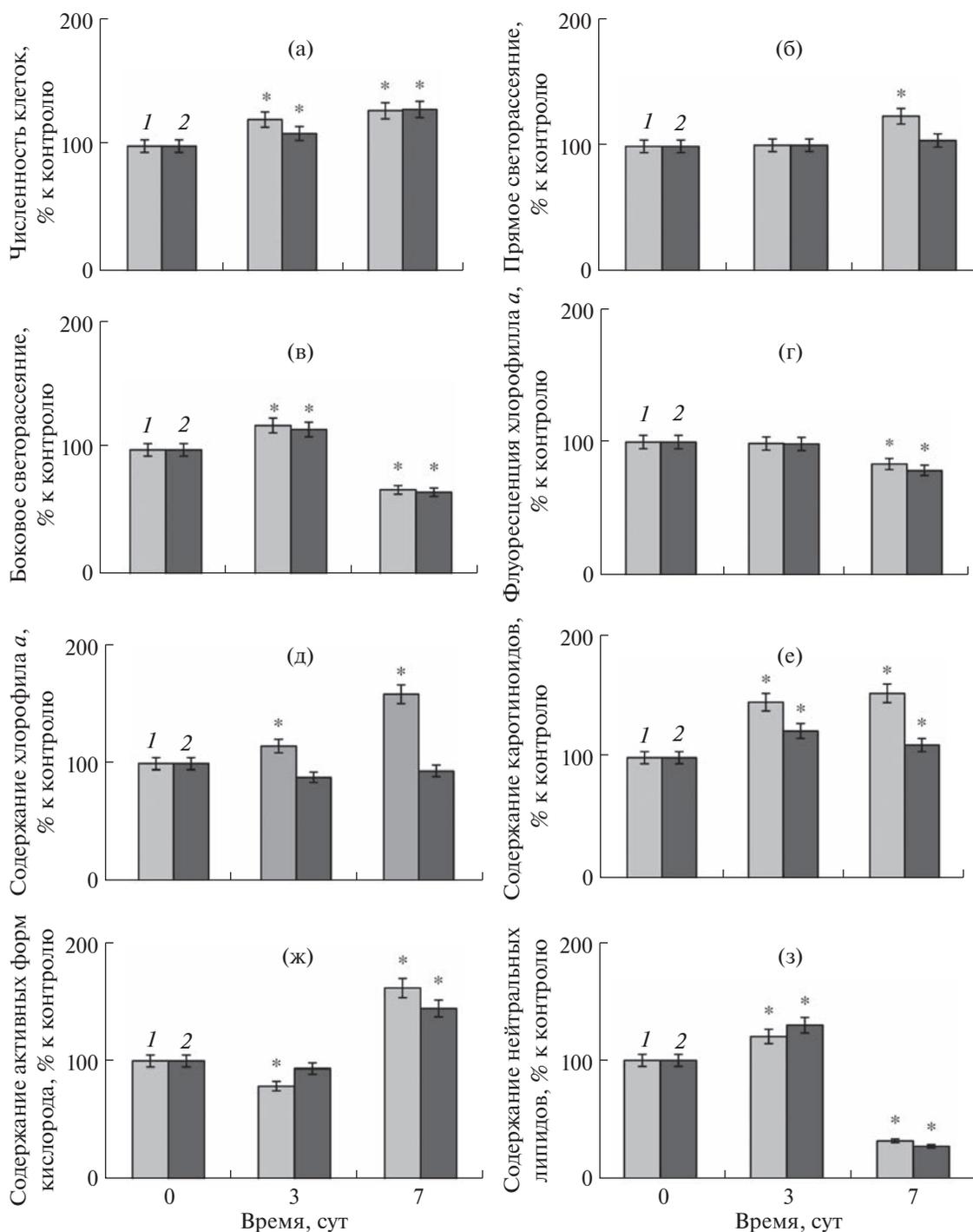
Добавление никеля в концентрациях 10 и 20 мкг/л приводило к увеличению численности клеток *H. akashiwo* по сравнению с контрольной на третьи сутки (рис. 3а). Показатель ПС оставался на уровне контроля во время всего эксперимента (рис. 3б). Показатель БС возрастал по сравнению с таковым в контроле к седьмым суткам (рис. 3в). Флуоресценция хлорофилла *a* не отличалась от контрольной во всех экспериментальных случаях (рис. 3г). Содержание хлорофилла *a* превышало

контрольное только при концентрации никеля в среде 20 мкг/л на седьмые сутки опыта (рис. 3д). Содержание каротиноидов существенно увеличивалось на третьи сутки при концентрации никеля 10 мкг/л и на седьмые при 20 мкг/л (рис. 3е). Содержание АФК было выражено ниже, чем в контроле на протяжении экспозиции (рис. 3ж). Содержание НЛ, напротив, превышало контрольное, особенно на седьмые сутки (рис. 3з).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что Cd, Pb и Ni оказали негативное воздействие на физиологическое состояние *H. akashiwo*, даже при одновременной стимуляции роста клеток.

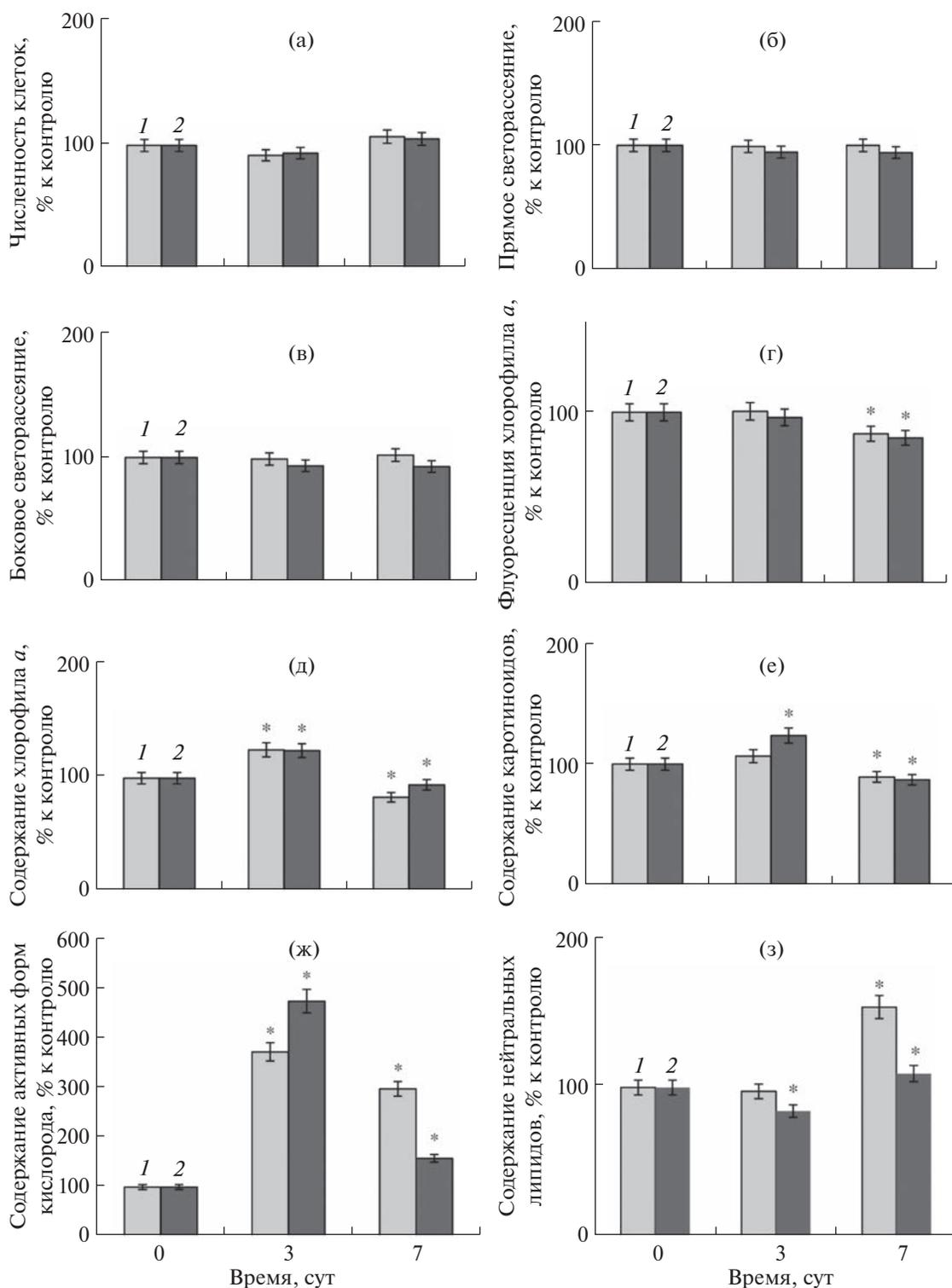
Кадмий, по сравнению с другими изученными металлами, вызывал особенно выраженный рост популяции *H. akashiwo*. Ранее у *Dunaliella salina* также отмечено увеличение численности клеток при воздействии 100 мкг/л кадмия [24]. У *H. akashiwo* значимо изменялся показатель БС на всем протяжении опыта. Такое же явление было показано на *Phaeocystis antarctica* [25]. Флуоресценция хлорофилла *a* снижалась, а содержание фотосинтетических пигментов, напротив, увеличивалось, что может свидетельствовать о снижении эффективности работы фотосинтетического аппарата. Известно, что Cd ингибирует ФС II в результате повреждения тилакоидов и реакционных центров [14, 15]. Однако есть сведения, что кадмий влияет на обе фотосистемы [26]. Данный металл, помимо индуцирования физиологических нарушений, вызывает изменение структуры хлоропласта [5, 26, 27], нарушение транспорта и проницаемости мембран, синтеза пластохинона и каротиноидов и инактивирование ряда ферментов [27]. Зарегистрированное нами увеличение содержания каротиноидов, вероятно, связано с тем, что они защищают фотосинтетический аппарат от окислительного стресса [24]. Каротиноиды гасят триплетные состояния хлорофиллов, вызывающих формирование атомарного кислорода, помогают сбрасывать энергию с поврежденных хлорофиллов [2]. Есть сведения, что каротиноиды меньше подвергаются действию кадмия, чем хлорофилл *a* [26]. Тяжелые металлы вызывают окислительный стресс в результате увеличения количества свободных радикалов [1, 5, 8]. В нашем эксперименте содержание АФК снижалось на третьи сутки и существенно увеличивалось на седьмые. Повышение уровня АФК под действием тяжелых металлов приводит к снижению фотосинтетической продуктивности в результате повреждения биомолекул, нарушения метаболизма митохондрий и обмена веществами между цитозолем и хлоропластом [2]. Кадмий приводит к повышению содержания липидов [7, 15]. У *H. akashiwo* происходило сначала увеличение, а потом резкое падение содержания НЛ. Ней-



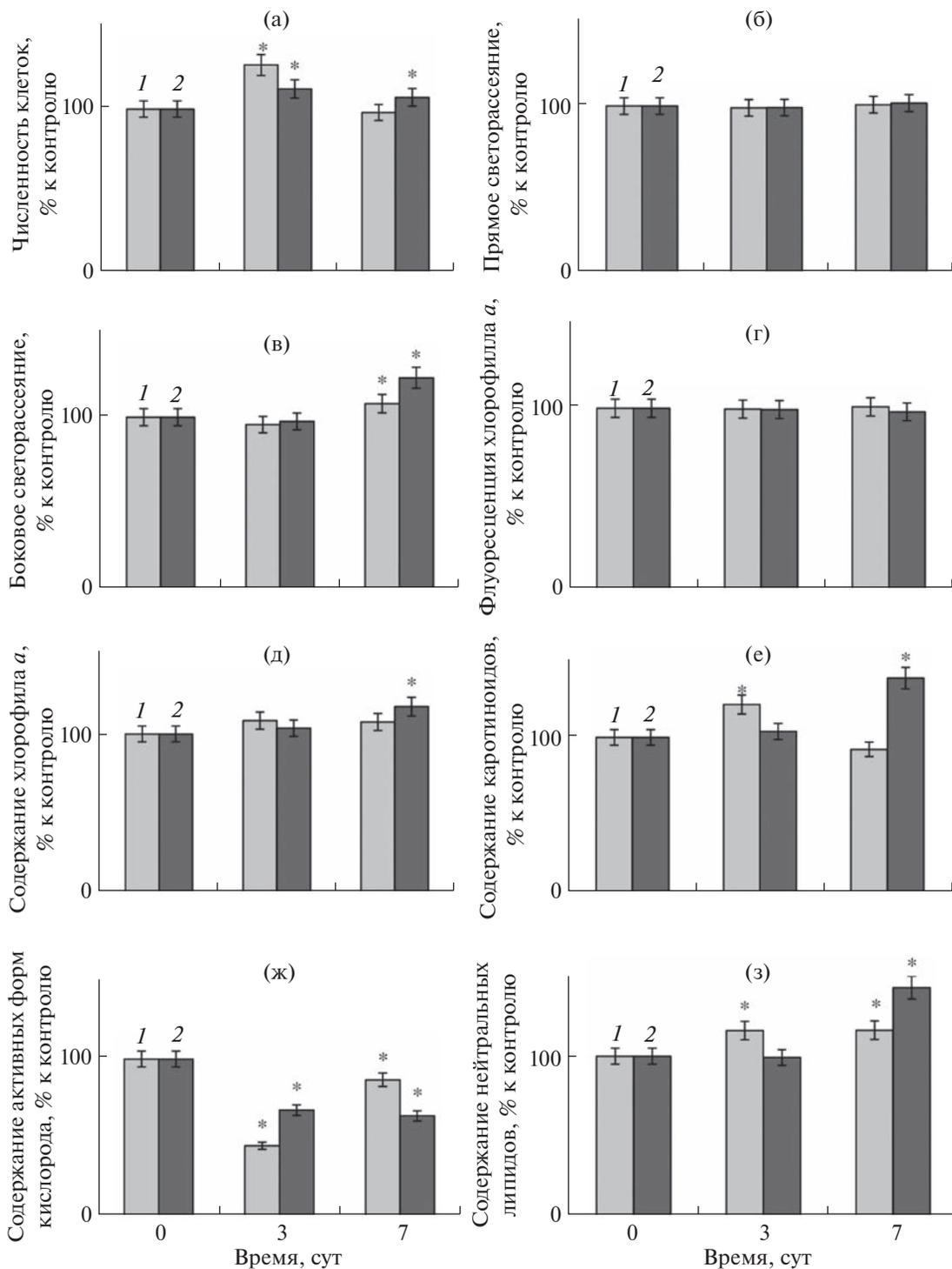
**Рис. 1.** Рост популяции и физиологическое состояние *Heterosigma akashiwo* при воздействии кадмия: а – численность клеток, % к контролю; б – прямое светорассеяние, % к контролю; в – боковое светорассеяние, % к контролю; г – флуоресценция хлорофилла *a*, % к контролю; д – содержание хлорофилла *a*, % к контролю; е – содержание каротиноидов, % к контролю; ж – содержание активных форм кислорода, % к контролю; з – содержание нейтральных липидов, % к контролю. 1 – содержание кадмия в среде 10 мкг/л, 2 – содержание кадмия в среде 20 мкг/л. \* – различия с контролем достоверны при  $P \leq 0.05$ .

тральные липиды играют защитную роль в адаптации к негативному влиянию среды [7], таким образом, их снижение может сигнализировать об угнетении клеток микроводоросли.

Свинец влияет на ферментную активность растений, однако, основная причина ингибирования роста клеток растений – окисление ИУК, активно участвующей в их ростовых процессах.



**Рис. 2.** Рост популяции и физиологическое состояние *Heterosigma akashiwo* при воздействии свинца: а – численность клеток, % к контролю; б – прямое светорассеяние, % к контролю; в – боковое светорассеяние, % к контролю; г – флуоресценция хлорофилла *a*, % к контролю; д – содержание хлорофилла *a*, % к контролю; е – содержание каротиноидов, % к контролю; ж – содержание активных форм кислорода, % к контролю; з – содержание нейтральных липидов, % к контролю. 1 – содержание свинца в среде 10 мкг/л, 2 – содержание свинца в среде 20 мкг/л. \* – различия с контролем достоверны при  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 3.** Рост популяции и физиологическое состояние *Heterosigma akashiwo* при воздействии никеля: а – численность клеток, % к контролю; б – прямое светорассеяние, % к контролю; в – боковое светорассеяние, % к контролю; г – флуоресценция хлорофилла а, % к контролю; д – содержание хлорофилла а, % к контролю; е – содержание каротиноидов, % к контролю; ж – содержание активных форм кислорода, % к контролю; з – содержание нейтральных липидов, % к контролю. 1 – содержание никеля в среде 10 мг/л, 2 – содержание никеля в среде 20 мг/л. \* – различия с контролем достоверны при  $P \leq 0.05$ .

Кроме того, металл вызывает нарушение проницаемости мембран и изменяет процессы, задействованные в минеральном питании [1]. Нами отмечено ингибирование роста *H. akashiwo* к концу опыта, после его стимуляции на третьи сутки. У *Isochrysis galbana* увеличение скорости роста происходило при 50-100 мкг/л, а уже при 5 мкг/л повышалось содержание хлорофилла *a* [28]. В нашем эксперименте также возрастало содержание хлорофилла *a*, однако впоследствии оно снижалось. Свидетельством повреждения хлоропластов и митохондрий у зеленых водорослей при внесении в среду данного металла, является увеличение отложений крахмала у пиреноида, для запаса энергии, необходимой для восстановления поврежденных органелл [29, 30]. Повреждение хлоропластов отмечено, например, у *D. salina* [31]. Свинец приводит к снижению флуоресценции хлоропласта [32, 33], что, в числе иных изменений, отмечено и в нашем опыте только при 20 мкг/л через 7 сут инкубации. Свинец может заменять магний в молекуле хлорофилла, однако такие хлорофиллы не связаны прочно с лигандами пигмент-белкового комплекса. Таким образом, водоросли синтезируют больше молекул хлорофилла на реакционный центр для компенсации нефункциональных хлорофиллов и поддержания производительности процесса фотосинтеза [16, 32]. Кроме того, ингибирование биосинтеза хлорофилла *a* металлами через влияние на продуцирование протохлорофиллида, и активирование ферментативной деградации хлорофиллов хлорофиллиазой играет критическую роль в потере фотосинтетического пигмента [26]. Возможно, по этим причинам содержание хлорофилла *a* у *H. akashiwo* увеличивалось, а затем уменьшалось. Увеличение содержания каротиноидов защищает клетку от воздействия АФК, что, например, показано на *Nannochloropsis oculata*. При особо токсичных концентрациях металлов содержание каротиноидов, наоборот, снижается, что свидетельствует о сильном стрессе для водорослей [16]. Такое же явление происходило и в нашем опыте. У *Chlorella elipsoides* при воздействии свинца увеличивалось содержание МДА, снижалось содержание супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы [33]. Такие изменения говорят об увеличении содержания АФК у водоросли. В нашем опыте отмечено резко выраженное увеличение содержания АФК при внесении токсиканта. Однако содержание липидов не снижалось ниже уровня контроля, что возможно, связано с адаптацией водоросли к неблагоприятным условиям.

Никель связывается с белками, и в меньшей степени с липидами микроводорослей [34]. Данный металл вызывает повреждение мембраны и нарушение минерального обмена, особенно калиевого, приводит к увеличению концентрации МДА [1]. В нашем эксперименте рост *H. akashiwo* при концентрациях никеля в среде 10–20 мкг/л

стимулировался, также увеличивалось содержание хлорофилла *a* и каротиноидов при концентрации 20 мкг/л на седьмые сутки опыта. Ранее показано, что численность клеток зеленой микроводоросли *Ankistrodesmus falcatus* понижалась при концентрациях никеля 15–30 мкг/л, содержание хлорофилла *a* и каротиноидов уменьшалось при 1 мкг/л никеля [9]. В тоже время скорость роста популяции *Phaeocystis antarctica* ингибировалась на 10% при только при концентрации никеля 260 мкг/л [25]. Несмотря на то, что этот металл инактивирует ФС II, что, в том числе, выражается в снижении флуоресценции, в проведенном нами опыте данный показатель не изменялся. Также никель был единственным среди исследованных металлов при внесении которого содержание АФК у *H. akashiwo* не увеличивалось, а, напротив, снижалось. Известно, что данный токсикант влияет на гены, отвечающие за метаболизм азота, жирных кислот и ДНК [35]. Возможно, с этим связано увеличение НЛ, особенно к концу опыта, при его воздействии на *H. akashiwo*.

Таким образом, наши исследования показали, что при добавлении 10 и 20 мкг/л Cd в среду происходила стимуляция роста популяции *H. akashiwo* и увеличение содержания фотосинтетических пигментов на всем протяжении опыта. При воздействии Pb отмечено ингибирование роста водоросли и снижение содержания фотосинтетических пигментов к концу опыта. В тоже время показатели прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции хлорофилла *a* в большинстве экспериментальных случаев не отличались от контрольных. Содержание АФК, в целом, увеличивалось при воздействии тяжелых металлов. Резкое падение содержания НЛ отмечено только при воздействии кадмия, тогда как свинец приводил либо к небольшому увеличению содержания НЛ, либо не оказывал влияния на данный показатель.

Авторы выражают благодарность ресурсному центру “Морской биобанк” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (<http://marbank.dvo.ru>) за предоставление культуры микроводоросли *Heterosigma akashiwo* MBRU\_HAK-SR11.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // Envi-

- ron. Chem. Lett. 2010. V. 8. P. 199.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
2. Masmoudi S., Nguyen-Deroche N., Caruso A., Ayadi H., Morant-Manceau A., Tremblin G. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: from heaven to hell – a review // *Cryptogam., Algol.* 2013. V. 34. P. 185.  
<https://doi.org/10.7872/crya.v34.iss2.2013.185>
  3. Huang X.G., Li S.X., Liu F.J., Lan W.R. Regulated effects of *Prorocentrum donghaiense* Lu exudate on nickel bioavailability when cultured with different nitrogen sources // *Chemosphere.* 2018. V. 197. P. 57.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.014>
  4. Cheng J., Qiu H., Chang Z., Jiang Z., Yin W. The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris* // SpringerPlus. 2016. V. 5. P. 1.  
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2963-1>
  5. Andosch A., Affenzeller M.J., Lütz C., Lütz-Meindl U. A freshwater green alga under cadmium stress: ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias* // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 1489.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.002>
  6. Mallick N., Mohn F.H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003. V. 55. P. 64.  
[https://doi.org/10.1186/10.1016/S0147-6513\(02\)00122-7](https://doi.org/10.1186/10.1016/S0147-6513(02)00122-7)
  7. Chia M.A., Lombardi A.T., Maria da Graça G.M., Parrish C.C. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations // *Aquat. Toxicol.* 2013. V. 128. P. 171.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.004>
  8. Jamers A., Blust R., De Coen W., Griffin J.L., Jones O.A. An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Aquat. Toxicol.* 2013. V. 126. P. 355.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.007>
  9. Martínez-Ruiz E.B., Martínez-Jerónimo F. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: an integrative study // *Aquat. Toxicol.* 2015. V. 169. P. 27.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.007>
  10. Li M., Zhang F., Gilbert P.M. Seasonal life strategy of *Prorocentrum minimum* in Chesapeake Bay, USA: Validation of the role of physical transport using a coupled physical–biogeochemical–harmful algal bloom model // *Limnol. Oceanogr.* 2021. V. 66. P. 3873.  
<https://doi.org/10.1002/lno.11925>
  11. Маркина Ж.В. Ультраструктура и автотрофная функция клеток рафидофитовой микроводоросли *Heterosigma akashiwo* (Y. Hada) Y. Hada ex Y. Hara and M. Chihara, 1987 в загрязненной медью среде // *Биология моря.* 2021. Т. 47. С. 196.  
<https://doi.org/10.31857/S0134347521030074>
  12. Lemley D.A., Adams J.B., Rishworth G.M., Purdie D.A. Harmful algal blooms of *Heterosigma akashiwo* and environmental features regulate *Mesodinium* cf. *rubrum* abundance in eutrophic conditions // *Harmful Algae.* 2020. 100:101943.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101943>
  13. Bornman E., Adams J.B., Strydom N.A. Algal blooms of *Heterosigma akashiwo* and *Mugilidae* Gill Alterations // *Estuaries Coast.* 2022. V. 45. P. 1674.  
<https://doi.org/10.1007/s12237-021-01038-6>
  14. La Rocca N., Andreoli C., Giacometti G.Á., Rascio N., Moro I. Responses of the Antarctic microalga *Koliella antarctica* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) to cadmium contamination // *Photosynthetica.* 2009. V. 47. P. 471.  
<https://doi.org/10.1007/s11099-009-0071-y>
  15. Carfagna S., Lanza N., Salbitani G., Basile A., Sorbo S., Vona V. Physiological and morphological responses of lead or cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae) // SpringerPlus. 2013. V. 2. P. 1.  
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-147>
  16. Zamani-Ahmadmoodi R., Malekabi M.B., Rahimi R., Johari S.A. Aquatic pollution caused by mercury, lead, and cadmium affects cell growth and pigment content of marine microalga, *Nannochloropsis oculata* // *Environ. Monit. Assess.* 2020. V. 192. P. 1.  
<https://doi.org/10.1007/s10661-020-8222-5>
  17. Gomes A., Ferdandes E., Lima J.F.L.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // *J. Biophys. Biochem. Methods.* 2005. V. 65. P. 45.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
  18. Wan M., Jin X., Xia J., Rosenberg J.N., Yu G., Nie Z., Oyler G.A., Betenbaugh M.J. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 9473.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6088-6>
  19. Rajabi Islami H., Assareh R. Effect of different iron concentrations on growth, lipid accumulation, and fatty acid profile for biodiesel production from *Tetrademus obliquus* // *J. Appl. Phycol.* 2019. V. 31 P. 3421.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-01843-4>
  20. Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // *Can. J. Microbiol.* 1962. V. 8. P. 229.  
<https://doi.org/10.1139/m62-029>
  21. Hyka P., Lickova S., Přibyl P., Melzoch K., Kovar K. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 2.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>
  22. Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M., Bosma R., Muylaert K., Ritmann B.E., Parra R. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // *J. Microbiol. Methods.* 2016. V. 128. P. 74.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.011>
  23. Jeffrey S.T., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton // *Biochem. Physiol. Pflanz.* 1975. V. 167. P. 191.  
[https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)
  24. Zhu Q.L., Guo S.N., Wen F., Zhang X.L., Wang C.C., Si L.F., Zeng J.L., Liu J. Transcriptional and physiological responses of *Dunaliella salina* to cadmium reveals time-dependent turnover of ribosome, photosystem, and ROS-scavenging pathways // *Aquat. Toxicol.* 2019.

- V. 207. P. 153.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.007>
25. Gissi F., Adams M.S., King C.K., Jolley D.F. A robust bioassay to assess the toxicity of metals to the Antarctic marine microalga *Phaeocystis Antarctica* // Environ. Toxicol. Chem. 2015. V. 34. P. 1578.  
<https://doi.org/10.1002/etc.2949>
26. Dobrikova A.G., Apostolova E.L. Damage and protection of the photosynthetic apparatus under cadmium stress // Cadmium toxicity and tolerance in plants / Eds. M. Hasanuzzaman et al. Academic Press. 2019. P. 275.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00011-5>
27. Singh M., Kumar J., Singh S., Singh V.P., Prasad S.M., Singh M.P.V.V.B. Adaptation strategies of plants against heavy metal toxicity: a short review // Biochem. Pharmacol. 2015. V. 4. P. 2167.  
<https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000161>
28. Barkhordari A.Z., Taherizadeh M.R., Yousef Z.M. Effects of different concentrations of lead on growth, photosynthetic pigmentation and protein micro alga *Isochrysis galbana* // J. Oceanogr. 2021. V. 12. P. 109.  
<https://doi.org/10.52547/joc.12.46.109>
29. Shanab S., Essa A., Shalaby E. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates) // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. P. 392.  
<https://doi.org/10.4161/psb.19173>
30. Kumar K.S., Dahms H.U., Won E.J., Lee J.S., Shin K.H. Microalgae – a promising tool for heavy metal remediation // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2015. V. 113. P. 329.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
31. Kemer K., Mantiri D.M., Rompas R.M., Rimper J.R., Margyaningsih N.I. Transmission electron microscope analysis upon growth of lead acetate treated microalga, *Dunaliella* sp. // Aquac. Aquar. Conserv. Legis. 2020. V. 13. P. 849.
32. Dao L.H., Beardall J. Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity // Algal Res. 2016. V. 16. P. 150.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.006>
33. Moise M.M. Lead (Pb<sup>2+</sup>) causes chlorophyll related changes and oxidative damage in *Chlorella ellipsoides* (Chlorophyceae) // Braz. J. Biol. Sci. 2019. V. 6. P. 605.  
<https://doi.org/10.21472/bjbs.061412>
34. Hong H.S., Wang M.H., Huang X.G., Wang D.Z. Effects of macronutrient additions on nickel uptake and distribution in the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu // Environ. Pollut. 2009. V. 157. P. 1933.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.01.009>
35. Guo R., Lu D., Liu C., Hu J., Wang P., Dai X. Toxic effect of nickel on microalgae *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) // Ecotoxicology. 2022. V. 31. P. 746.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-022-02532-8>

УДК 581.1

## ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К НЕФТЯНОМУ ЗАГРЯЗНЕНИЮ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis*

© 2023 г. З. М. Курамшина<sup>а, \*</sup>, Л. Р. Саттарова<sup>а</sup>, И. В. Максимов<sup>б</sup>

<sup>а</sup> Стерлитамакский филиал Уфимского университета науки и технологий, Стерлитамак, Россия

<sup>б</sup> Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра  
Российской академии наук, Уфа, Россия

\*e-mail: kuramshina\_zilya@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2023 г.

После доработки 02.04.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Изучено влияние обработки семян пшеницы суспензионной культурой клеток эндофитных бактерий штамма *Bacillus subtilis* 26Д и линии *B. subtilis* 26Д<sup>тн</sup>, отселектированной по толерантности к компонентам сырой нефти, на ростовые и биохимические характеристики растений пшеницы *Triticum aestivum* L. в условиях нефтяного загрязнения почвы. Показано, что инокуляция семян линией *B. subtilis* 26Д<sup>тн</sup> стимулировала у проростков рост и подавляла развитие окислительного стресса в условиях воздействия на растения нефтяного загрязнения в сравнении с контролем и растениями, инокулированными штаммом *B. subtilis* 26Д. Соответственно, бактерии *B. subtilis* 26Д<sup>тн</sup> способствовали более успешному росту растений пшеницы на загрязненных нефтью почвах, что может быть использовано для стимуляции роста растений на таких участках, и для возврата ряда из них в хозяйственный оборот.

**Ключевые слова:** пшеница, эндофитные бактерии *B. subtilis* 26Д, нефть, рост, пероксидаза, каталаза, малоновый диальдегид, пролин, антистрессовый эффект

**DOI:** 10.31857/S0015330323600286, **EDN:** CJDSRU

### ВВЕДЕНИЕ

В результате добычи, транспортировки и хранения нефти и продуктов ее переработки окружающая среда часто подвергается загрязнению, что является общей экологической проблемой [1–3]. Сырая нефть представляет собой сложную смесь растворимых и нерастворимых в воде углеводородов (алканы, асфальтены, смолы, парафины, фенолы и др.), тяжелых металлов и других токсических соединений. Нефтяное загрязнение почвы как антропогенный поллютант значительно замедляет рост и развитие растений, а при длительном воздействии приводит к их гибели. Ингибирование роста может быть результатом прямого токсического действия нефти на всхожесть семян вследствие проникновения нефти в семена и повреждения зародыша. Углеводородная составляющая нефти, покрывая семена, препятствует поглощению ими воды и кислорода, необходимых для прорастания. Кроме того, при нефтяном загрязнении почвы происходит ингибирование бактериального разложения органического вещества и связанной с этим реминерализации питательных веществ токсичными компонентами, что приводит к изменению соотношения углерод/азот (C/N), дефициту

азота [1, 4] и, как следствие, к ингибированию роста растений, уменьшению их надземной биомассы и многократному снижению продуктивности [1–3].

Компоненты сырой нефти могут проникать в живые растения через их корни и листья, откуда могут транспортироваться в сосудистую систему растений и межклеточные пространства, что приводит к повреждению клеток и тканей [4, 5]. При нефтяном загрязнении происходит пожелтение и отмирание листьев, снижается скорость фотосинтеза и содержание хлорофилла в растениях. Повреждение клеток, возникающее в результате проникновения токсических компонентов нефти, может быть основной причиной ингибирования фотосинтеза, так как углеводороды имеют тенденцию накапливаться в хлоропластах, что объясняет снижение фотосинтетической активности. Скорость фотосинтеза и степень повреждения фотосинтетической системы растений зависят от типа и концентрации нефти [5]. К заметным симптомам, наблюдаемым у растений, произрастающих на загрязненной нефтью почве, относятся также снижение активности ферментов, метаболизирующих крахмал, и снижение содержания общих углеводов, белков и аминокислот [1–4].

**Сокращения:** ПО – пероксидаза, КАТ – каталаза.

Наиболее опасным нарушением, возникающим в результате воздействия нефти на растения, является окислительный стресс, приводящий к образованию в клетках АФК с высокой окислительной способностью. С одной стороны, углеводороды в растениях уменьшают транспирацию растений, а с другой — нарушают их дыхание, которое в зависимости от вида растения может либо уменьшаться, либо усиливаться [1]. АФК, накапливаясь в растительных тканях, разрушают клеточно-мембранные комплексы, нарушают транспортные процессы и внутриклеточные реакции, тем самым ингибируя ростовую активность. Однако, растения могут использовать АФК и в качестве вторичного мессенджера во многих каскадах передачи сигналов. По этим причинам антиоксидантная система защиты растений играет решающую роль в контроле продолжительности жизни сигналов АФК и предотвращении неконтролируемого окисления [1].

Показано, что при загрязнении окружающей среды нефтью у растений возникают те же эффекты, что и при действии абиотических факторов, в частности, при повышении температуры, засухе, засолении и др. [1]. Как известно, негативные последствия абиотических стрессов, в том числе и нефтяного загрязнения, могут быть успешно преодолены ростостимулирующими бактериями [6, 7]. Большинство таких бактерий обладают способностью улучшать рост и повышать продуктивность культурных растений благодаря активации синтеза в растительных клетках аминокислот и фитогормонов, фиксации азота, а также увеличению доступного количества минеральных веществ [7, 8]. При засухе или солевом стрессе эндофиты растений могут регулировать накопление осмолитов (совместимых растворенных веществ), таких как пролин и сахара, и индуцировать экспрессию связанных со стрессом генов и ферментов для того, чтобы уменьшить окислительное повреждение и позволить растениям противостоять абиотическим стрессам [7–11].

Важным фактором эффективности применения ростостимулирующих бактерий является их способность повышать устойчивость растений к токсиканту [2, 5–8]. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния эндофитных штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д (коллекция ВНИИСХМ, Пушкин-8, г. Санкт-Петербург, №128) и бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, обладающих толерантностью к нефти, на устойчивость растений *Triticum aestivum* L. к нефтяному загрязнению почвы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** Объектами исследования служили растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Омская 35). Эксперименты проводили в лабораторных условиях. Семена перед по-

севом промывали в мыльной воде, стерилизовали 96% этанолом в течение 1 мин, трижды ополаскивали в дистиллированной воде, подсушивали.

В экспериментах использовали бактерии *B. subtilis* штамма 26Д (коллекция ВНИИСХМ, Пушкин-8, г. Санкт-Петербург, №128) и полученные путем селекции на высоких концентрациях нефти линии *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>. Для отбора толерантных к нефтяному загрязнению линии бактерии *B. subtilis* 26Д культивировали на чашках Петри на минеральной среде М9, содержащий градиент концентраций нефти (Царичанское месторождение, г. Оренбург) в чашке Петри от 1 до 100 г/л. Химический состав образца нефти из отмеченного месторождения описан в работе [12]. Для формирования градиента нефти предварительно готовили питательные среды М9 с разной концентрацией нефти (1, 10, 50, 100 г/л), которые после автоклавирования (при +120°C и 1.1 атм) разливали в чашки Петри (диаметр 22 см). Затем, после застывания агаризованной среды, в ламинарном боксе ее разрезали на полоски и раскладывали на чашки Петри таким образом, чтобы среды, содержащие низкие концентрации нефти, были по краям чашки, а среды с более высокими концентрациями располагались внутри (1:10:50:100:50:10:1). Бактерии высаживали первоначально на среду с самой низкой концентрацией нефти (1 г/л). По мере роста колоний наблюдали появление колоний на среде с более высокими концентрациями поллютанта [13]. Со среды, содержащей нефть из расчета 100 мл/л, отбирали колонии бактерий, названные *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>.

Семена обрабатывали в ламинарном боксе 20-часовой культурой бактерий, выращенной на минеральной среде М9 при +37°C. Клетки бактерий отмывали раствором 0.001М КСl. Суспензию клеток доводили до необходимой концентрации (10<sup>6</sup> кл/мл) по оптической плотности. Расход бактериальной суспензии составлял 20 мкл на 1 г семян. Обработанные семена выдерживали в течение одного часа, затем использовали в экспериментах. Контрольные семена обрабатывали дистиллированной водой. Инокулированные и неинокулированные бактериями семена выращивали в вегетационных сосудах (40 × 20 см) при температуре 18–20°C при искусственной равномерной освещенности (среднесуточный световой интеграл 200–250 мкмоль/(м<sup>2</sup> с)) и 16-часовом фотопериоде на субстратах, загрязненных разными концентрациями сырой нефти из расчета 1, 10, 50 г в 1 кг почвы. В качестве субстрата для выращивания растений использовали чернозем выщелоченный (верхний гумусовый слой). Контрольные растения высаживали в почву без нефтяного загрязнения. После посева семян пшеницы в почву поливали ее дистиллированной водой. Через 25 сут измеряли ростовые характери-

стики и отбирали надземную часть проростков для биохимического анализа.

**Получение экстрактов из растительных тканей.** Надземную часть растений промывали в дистиллированной воде, удаляли избыток воды фильтровальной бумагой, взвешивали. Растительный материал гомогенизировали в 0.1 М К-фосфатном буфере pH 6.0 (при определении пероксидазы) или в Трис-содержащем буфере pH 7.8 (при определении каталазы и малонового альдегида) в соотношении навеска (г): экстрагент (мл) — 1 : 10, центрифугировали 10 мин при 3500 g (СМ-50, “Elmi”, Латвия). Надосадочную жидкость центрифугировали еще 10 мин при 8000 g и использовали для определения активности ферментов и уровня малонового диальдегида.

**Определение активности ферментов и содержания малонового диальдегида.** Активность пероксидазы (ПО) определяли микрометодом в 96-луночных планшетах (“Nunc”, США) по окислению (о-)фенилендиамина в присутствии  $H_2O_2$  [14]. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Активность ПО выражали в оптических ед./ (мг белка мин), что соответствовало количеству окисленного субстрата, вызывающего увеличение оптической плотности за 1 мин. Активность каталазы (КАТ) определяли в 96-луночных планшетах по методу, основанному на способности  $H_2O_2$  образовывать с солями молибденовой кислоты стойкий окрашенный комплекс [14]. Для этого в лунки планшета к 150 мкл 0.03% раствора  $H_2O_2$  добавляли 20 мкл супернатанта. Контрольная проба содержала 150 мкл воды. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл 4% раствора молибдата аммония через 1 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм на спектрофотометре Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Активность каталазы КАТ рассчитывали с использованием калибровочной кривой и выражали в мкмоль  $H_2O_2$ / (мг сырой массы мин). Содержание белка определяли по методу Бредфорд [15].

Содержание малонового диальдегида (МДА) измеряли, используя метод Costa с соавт. [16], основанный на образовании окрашенного комплекса между МДА и тиобарбитуровой кислотой при нагревании. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводили на спектрофотометре Unicо 2800 (“United products and Instruments”, США) при длине волны 532 нм.

**Определение содержания свободного пролина.** Экстракцию и определение свободного пролина проводили по модифицированной методике Г.Н. Шихалеевой с соавт. [17], используя кислый нингидриновый реактив, приготовленный без нагревания: 1.25 г нингидрина (“Acros organics”, Бельгия) растворяли в 30 мл ледяной уксусной

кислоты и 20 мл 6 М раствора  $H_3PO_4$ . Навеску свежей листовой пластины (200 мг) заливали 20 мл кипящей дистиллированной воды и выдерживали 10 мин на водяной бане при температуре 100°C. Затем в пробирку добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл нингидринового реактива и 2 мл приготовленного экстракта. Пробы инкубировали 20 мин на водяной бане при температуре 100°C, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры на льду. Измеряли оптическую плотность продуктов реакции при длине волны 520 нм. Содержание пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя в качестве стандарта пролин компании “Sigma” (США) [17].

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных программ пакета Microsoft Office, данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между средними определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Влияние нефти на рост растений.** Выявлено, что нефтяное загрязнение почвы приводило к ингибированию роста проростков пшеницы, который положительно зависел от концентрации нефти. Чем выше была концентрация нефти в почве, тем выше был токсический эффект. Так, у неинкулированных бактериями растений пшеницы длина надземной части при росте их в почве, загрязненной нефтью 1, 10, 50 г/кг была меньше на 7.3, 10.4 и 18.7%, соответственно, по сравнению с растениями, выросшими без нефти (табл. 1).

При отсутствии стресс-фактора инокуляция семян суспензией клеток штамма *B. subtilis* 26Д, а также линии *B. subtilis* 26Д<sup>тн</sup>, толерантной к нефти, способствовала усилению ростовых характеристик проростков пшеницы на 10.0 и 14.9%, соответственно, по сравнению с неинкулированными растениями. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты, где была обнаружена стимулирующая рост растений активность этого штамма бактерии *B. subtilis* 26Д [18].

Интересные результаты получены при анализе влияния бактерий на формирование стресс-толерантности растений пшеницы в отношении нефтяного загрязнения почвы. В условиях имитации нефтяного загрязнения у обработанных бактериями *B. subtilis* 26Д и *B. subtilis* 26Д<sup>тн</sup> растений длина надземной части была больше, чем у необработанных растений при концентрациях нефти 1, 10, 50 г/кг на 15.3, 12.4, 14.5% и на 18.7, 18.2, 26.4%, соответственно.

**Таблица 1.** Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на морфометрические показатели растений пшеницы сорта Омская 35 при разной концентрации нефти в почве

Концентрация нефти, г/кг почвы	Вариант инокуляции		
	Без инокуляции	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 26Д <sup>Н</sup>
Длина надземной части, см			
0	28.8 ± 2.0	31.7 ± 2.7	33.1 ± 1.5
1	26.7 ± 2.6	30.8 ± 1.4*	31.7 ± 1.9*
10	25.8 ± 1.7	29.0 ± 1.1*	30.5 ± 2.5*
50	23.4 ± 2.1	26.8 ± 2.0*	29.6 ± 2.0*
Длина корней, см			
0	6.6 ± 0.4	7.1 ± 0.5*	7.6 ± 0.7*
1	6.8 ± 0.6	8.2 ± 0.1*	8.9 ± 0.1*
10	5.3 ± 0.4	6.0 ± 0.1*	8.3 ± 0.2*
50	3.5 ± 0.1	5.1 ± 0.1*	6.2 ± 0.1*

Примечание. \* Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при  $P \leq 0.05$ .

Загрязнение почвы нефтью в концентрации 1 г/кг стимулировало рост корней как инокулированных, так и неинокулированных проростков пшеницы на фоне ингибирования роста надземной части. Высокий уровень нефтяного загрязнения (10 или 50 г нефти на кг почвы) приводил к ингибированию длины корней необработанных бактериями растений на 19.7 и 46.9%, соответственно, в сравнении с растениями, выросшими в почве без нефти. Анализ длины корней, находящихся в непосредственном контакте с загрязненной почвой, показал, что инокуляция семян бактериями снижала токсический эффект поллютанта.

При отсутствии нефти в почве у растений пшеницы, обработанных бактериями исходного штамма *B. subtilis* 26Д, длина корней была больше, чем у необработанных, на 7.5%, а при обработке семян линией *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup> — на 15.1%. У растений, обработанных суспензией клеток штамма *B. subtilis* 26Д и линией *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, длина корней проростков при концентрациях нефти 1, 10, 50 г/кг почвы была больше на 20.5, 13.2, 45.7% и 30.8, 56.6, 77.1%, соответственно, в сравнении с необработанными растениями, выросшими при тех же условиях.

Таким образом, отселектированная на толерантность к нефти линия бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup> формировала у растений пшеницы более высокий уровень устойчивости к загрязнению почвы нефтью в сравнении с исходным штаммом *B. subtilis* 26Д.

**Влияние нефтяного загрязнения почвы на активность про-/антиоксидантных ферментов и уровень МДА в растениях пшеницы.** При имитации нефтяного загрязнения почвы активность КАТ в проростках пшеницы, обработанных бактериями, достоверно не отличалась от показателей неиноку-

лированных растений. В то же время, активность ПО в тканях побегов растений, обработанных эндифитом *B. subtilis* 26Д и растущих при отсутствии стресс-фактора, была выше на 4%. Интересно, что активность ПО в растениях, инокулированных линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, достоверно не отличалась от этого показателя у контрольных растений (табл. 2).

У растений, неинокулированных бактериями, при росте в почве с нефтью наблюдали повышение активности ПО. Так, при концентрациях нефти 1, 10, 50 г/кг почвы активность ПО в надземной части растений была выше на 2.0, 9.5 и 11.5%, соответственно, по сравнению с растениями, растущими без нефти, что предполагает стрессовое воздействие поллютанта на растения. У растений, обработанных *B. subtilis* 26Д и растущих в почве с нефтью, активность пероксидазы была ниже или не отличалась от неинокулированных растений, растущих без токсиканта. У растений, обработанных линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, активность пероксидазы при низких концентрациях нефти была выше, а при высоких — ниже, чем у неинокулированных растений, растущих без нефти (табл. 2).

Накопление МДА в тканях растений является одним из маркерных показателей развития стрессового воздействия [18, 19]. Как и следовало ожидать, при нефтяном загрязнении почвы в тканях проростков пшеницы уровень МДА повышался как в необработанных, так и в инокулированных бактериями растениях по сравнению с такими показателями в нормальных условиях. Вместе с тем, содержание МДА в побегах растений при нефтяном загрязнении (50 г/кг почвы), инокулированных *B. subtilis* 26Д и линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, было, соответственно, на 16.7 и 43.5% ниже, чем у

**Таблица 2.** Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на активность каталазы и пероксидазы, содержание МДА в надземной части пшеницы в условиях нефтяного загрязнения почвы

Вариант инокуляции	Активность каталазы, мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /(мг сырой массы мин)	Активность пероксидазы, оптических ед./ (мг белка мин)	Содержание МДА, мкмоль/г сырого веса
Без нефти (0 г/кг почвы)			
Без инокуляции	350.0 ± 29.1	25.2 ± 0.8	17.4 ± 0.4
<i>B. subtilis</i> 26Д	335.3 ± 14.5*	26.2 ± 0.9	20.9 ± 0.5*
<i>B. subtilis</i> 26Д <sup>н</sup>	335.3 ± 13.5*	25.2 ± 0.6	22.5 ± 0.6*
Нефть (1 г/кг почвы)			
Без инокуляции	335.3 ± 11.2	27.2 ± 0.3	20.0 ± 0.6
<i>B. subtilis</i> 26Д	350.0 ± 28.0*	26.6 ± 0.6	25.8 ± 0.8*
<i>B. subtilis</i> 26Д <sup>н</sup>	335.3 ± 10.6	26.8 ± 0.2	23.5 ± 0.7*
Нефть (10 г/кг почвы)			
Контроль	335.3 ± 10.2	27.4 ± 0.3	29.0 ± 0.9
<i>B. subtilis</i> 26Д	350.0 ± 20.1*	25.7 ± 0.5*	36.4 ± 1.0*
<i>B. subtilis</i> 26Д <sup>н</sup>	335.3 ± 10.4	25.3 ± 0.6*	25.4 ± 0.8*
Нефть (50 г/кг почвы)			
Без инокуляции	350.0 ± 20.1	27.9 ± 1.1	51.9 ± 1.3
<i>B. subtilis</i> 26Д	320.7 ± 13.1*	25.5 ± 1.0*	43.2 ± 1.1*
<i>B. subtilis</i> 26Д <sup>н</sup>	320.7 ± 12.2*	23.6 ± 0.8*	29.3 ± 0.7*

Примечание. \* Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при  $P \leq 0.05$ .

неинокулированных растений при той же концентрации нефти. Пониженное содержание МДА в тканях растений, инокулированных эндофитами, по сравнению с неинокулированными эндофитом опытными растениями предполагает снижение стрессового воздействия на растения с участием бактериальных клеток.

**Влияние нефтяного загрязнения почвы на уровень пролина в проростках.** Известно, что пролин является одной из важных аминокислот, накопление которой сопровождается процессом адаптации растений к стрессовому фактору [19, 20]. Соответственно, как видно из таблицы 3, содержание пролина в проростках растений пшеницы, инокулированных клетками *B. subtilis* штамма 26Д или линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>н</sup>, было больше в сравнении с неинокулированными проростками (табл. 3). В условиях нефтяного загрязнения содержание пролина в тканях растений увеличивалось по мере возрастания концентрации поллютанта в почве (табл. 3). У необработанных бактериями растений при концентрации нефти 1, 10, 50 г/кг почвы содержание пролина повышалось на 33.0, 53.7, 80.5%, соответственно, по сравнению с растениями, растущими без нефти. У обработанных клетками *B. subtilis* 26Д растений уровень пролина повышался так же, как и у неинокулированных, однако показатели пролина при концентрации нефти 1, 10, 50 г/кг почвы были выше у

инокулированных растений на 46.8, 76.6, 63.0%, соответственно, чем у неинокулированных при тех же условиях. У растений, обработанных линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>н</sup>, уровень пролина повышался, и при концентрациях нефти в почве 1, 10, 50 г/кг был выше на 40.7, 83.9, 87.0%, соответственно, в сравнении с неинокулированными растениями при тех же условиях.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, небольшие концентрации нефтепродуктов в почве не оказывают сильного негативного влияния на растения [1, 21–27]. Например, при низкой концентрации сырой нефти в почве (1 г/кг) наблюдали даже стимуляцию роста корней как у растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* штамма 26Д, так и у растений, инокулированных бактериями штамма *B. subtilis* 26Д<sup>н</sup>. Предполагается, что такой стимулирующий эффект на растения низких концентраций нефтепродуктов, отмеченный нами в этой работе и рядом исследователей [1, 21–27], может быть связан с деградацией углеводов бактериями и высвобождением питательных веществ из нефти.

Содержание нефтепродуктов более 1 кг/м<sup>2</sup> может привести к гибели растений [21–27]. Полагают, что такой эффект обусловлен анаэробными, гидрофобными условиями, создаваемыми загрязня-

**Таблица 3.** Влияние обработки семян суспензией клеток *B. subtilis* на содержание пролина (мкмоль/г сырой массы) в тканях надземной части растений пшеницы при разной концентрации нефти в почве

Концентрация нефти, г/кг почвы	Содержание пролина, мкмоль/г сырой массы		
	Без инокуляции	<i>B. subtilis</i> 26Д	<i>B. subtilis</i> 26Д <sup>Н</sup>
0	30.3 ± 2.3	51.2 ± 3.0*	53.0 ± 2.9*
1	40.3 ± 3.2	59.2 ± 2.7*	56.7 ± 2.6*
10	46.6 ± 2.4	82.3 ± 3.1*	85.7 ± 2.9*
50	54.7 ± 2.9	89.2 ± 2.9*	102.3 ± 3.2*

Примечание. \* Различия между показателями инокулированных и неинокулированных бактериями растений достоверны при  $P \leq 0.05$ .

ющими веществами. Сильное загрязнение почвы нефтепродуктами может привести к обширной деградации растительного покрова вплоть до его полного исчезновения [21–29]. Поверхностное загрязнение почвы не только ограничивает или ухудшает условия роста растений, но и снижает ценность, технологическую и пищевую пригодность урожая растений [21–25]. Действительно, и в нашей работе мы наблюдали подавление ростовых характеристик растений пшеницы на почвах, загрязненных сырой нефтью.

В связи с формированием адаптивных свойств растений к активно меняющимся условиям окружающей среды, в том числе и антропогенного характера, в последние десятилетия большое внимание стали уделять роли микроорганизмов, формирующих с растениями симбиотические и эндофитные взаимоотношения. Эти растительно-микробные ассоциации благоприятны для обоих партнеров и способствуют экологическому балансу между ними. Использование бактерий, способных стимулировать рост растений и разлагать углеводороды нефти, имеет важные преимущества для растений в таких неблагоприятных условиях [24]. Эндофиты, как известно, обитают в тканях растений без какого-либо заметного вредного воздействия на своего хозяина, и многочисленные исследования доказывают их фитоадаптивный потенциал [18, 19, 24, 29]. Вследствие способности стимулировать ростовые показатели растений, они способствуют лучшей адаптации хозяина к стрессовым факторам среды обитания; облегчают доступность азота, фосфора и железа; вырабатывают фитогормоны и индуцируют защитный потенциал растений [18, 19, 24, 27, 29]. Обнаружено, что эндофиты могут непосредственно повышать толерантность растений к загрязняющим веществам, вырабатывая ферменты и биосурфактанты, а также другие метаболиты, деградирующие и/или снижающие токсический эффект поллютантов. Так, многие бактерии, в том числе и эндофиты, способны разлагать органические компоненты сырой нефти и нефтепродуктов, например, дизельного топлива —

н-гексадекан, фенантрен, флуорен, нафталин, тринитротолуол [3–7, 21–24, 30–33].

Наиболее важным механизмом стимулирования роста растений эндофитными бактериями, в том числе и *B. subtilis*, является продукция ауксинов, цитокининов [34], а также дезаминазы аминокислот пропан-1-карбоновой кислоты (АСС-дезаминазы) [25–27]. Применение таких продуцирующих биологически активные соединения штаммов может способствовать улучшению пролиферации и удлинению корней, что имеет решающее значение во время фиторемедиации, а также для роста и развития важных с экономической точки зрения сельскохозяйственных культур [2–4, 6, 7].

Следует отметить, что исходный штамм *B. subtilis* 26Д и толерантная к сырой нефти линия бактерии *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup> проявляли антистрессовый эффект на рост растений. При этом более высокие показатели роста в условиях нефтяного загрязнения были у растений, инокулированных бактериями *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, чем при инокуляции исходным штаммом. Как отмечено выше, загрязнение почвы нефтепродуктами приводило к подавлению роста растений пшеницы. Вместе с тем, бактерии способствовали лучшему состоянию ростовых показателей инокулированных растений в сравнении с неинокулированными. Вероятно, приобретенная в результате роста бактерий на среде с нефтепродуктами толерантность способствовала тому, что такая линия оказалась способна лучше стимулировать определенные ростовые характеристики растений в условиях нефтяного загрязнения.

Известно, что стрессовые факторы приводят к накоплению АФК, вызывающих окислительный стресс, связанный с воздействием на молекулярные и клеточные структуры супероксид-анион радикала, гидроксильного радикала, синглетного кислорода, перекиси водорода и других соединений. Активация таких ферментов про-/антиоксидантной системы как пероксидаза и каталаза в условиях развития стрессового фактора способствует уменьшению степени окислительного повреждения [1, 3, 27, 29]. Вместе с тем, заметного

изменения активности КАТ в условиях нефтяного загрязнения не наблюдали в тканях растений пшеницы, как неинокулированных бактериями, так и инокулированных. В то же время, активность ПО в растениях пшеницы, как было сказано выше, повышалась с ростом концентрации нефти только у неинокулированных бактериями растений. У инокулированных бактериями штамма *B. subtilis* 26Д растений этот показатель, так же как и каталаза, практически не изменялся, за исключением растений, которые росли при низких концентрациях нефти. Известно также, что при действии слабой и средней степени абиотических стрессов активность антиоксидантных систем повышается, а при дальнейшем увеличении силы стресса наблюдается уменьшение активности защитных ферментов [19–21, 24].

Содержание МДА, являющегося конечным продуктом перекисного окисления липидов клеточных мембран и одним из важных признаков их повреждения при действии стресса, в отсутствие инокуляции семян увеличивалось в тканях побегов растений с повышением концентрации нефти в почве. При этом инокуляция семян этих растений клетками как бактерий *B. subtilis*, так устойчивыми к нефти бактериями способствовала снижению уровня МДА в сравнении с необработанными растениями, подвергнутыми действию стресса. У растений, обработанных линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup>, уровень МДА был значительно ниже, чем у растений, обработанных обычным штаммом.

Известно, что пролин участвует в стабилизации белков, мембран и субклеточных структур при действии стрессов и может служить фактором уменьшения уровня АФК, что позволяет растениям противостоять различным негативным факторам [19, 20]. Наши исследования показали, что под влиянием бактерий накопление пролина в инокулированных растениях происходило больше, чем у неинокулированных. Обработка семян растений линией бактерий *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup> увеличивала уровень пролина в тканях побегов почти в два раза в сравнении с вариантом инокуляции семян обычным диким штаммом.

Ризосферные микроорганизмы, ассоциированные с растениями и улучшающие их рост, синтезируют ряд внеклеточных метаболитов, в том числе биосурфактантов, представляющих собой биоразлагаемые, нетоксичные и не накапливающиеся в окружающей среде поверхностно-активные соединения [30–34]. За счет выработки таких соединений бактерии характеризуются способностью снижать токсичность почвы, удаляя (деградировав или сорбируя) загрязняющие вещества. Биосурфактанты повышают биодоступность гидрофобных органических соединений, что делает их хорошим средством для очистки окружающей среды и восстановления ее экологической состав-

ляющей. Они могут эмульгировать жидкие загрязнители неводной фазы или повышать их растворимость. Эти особенности способствуют выносу загрязняющих веществ из твердой фазы и позволяют микроорганизмам, адсорбированным на почвенных частицах, получить доступ к молекуле поллютанта [30–34]. Бактерии штамма *B. subtilis* 26Д, как известно [32], вырабатывают сурфактин, который наиболее эффективно снижает поверхностное натяжение жидкостей даже в неблагоприятных экстремальных условиях [35]. Доказано, что *B. subtilis* 26Д является источником двух изоформ сурфактина (с длинами жирнокислотных цепей С13 и С15) [32], с чем, вероятно и была связана повышенная толерантность растений, инокулированных этим штаммом, к произрастанию на почвах, загрязненных сырой нефтью. Можно полагать, что способность эндофитных штаммов бактерий продуцировать биосурфактанты, повышающие биодоступность гидрофобных компонентов в почве и их дальнейшую биодеградацию [30–34], является одним из важных факторов, позволяющих формировать толерантность растений к нефтяному загрязнению почвы.

Следует также отметить, что сурфактин воспринимается растением как элиситор и стимулирует защитные механизмы растений, индуцируя экспрессию различных генов, кодирующих противомикробные соединения, регуляторы окислительного стресса и ферменты, участвующие в передаче защитных сигналов [33, 36, 37]. Сурфактин, продуцируемый эндофитными штаммами, вероятно, способствует росту растений и косвенно стимулирует иммунитет растений, повышая устойчивость растений-хозяев к стрессовому фактору.

Загрязнение почв сырой нефтью, кроме негативного токсического воздействия на растения, вызывает развитие различных абиотических стрессовых факторов (осмотический, солевой, анаэробный, окислительный и др.) [1]. Ранее было показано, что эндофитные бактерии *B. subtilis* 26Д способны оказывать протекторный эффект на растения при различных видах таких стрессов [19, 20, 29]. Соответственно, повышение устойчивости растений к нефтяному загрязнению почвы при помощи эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д и, в особенности, толерантной к нефти линии *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup> может быть обусловлено их комплексной биологической активностью.

Таким образом, наши исследования показали, что почва, загрязненная нефтепродуктами, фитотоксична для растений пшеницы. Инокуляция семян растений линией *B. subtilis* 26Д снижает развитие окислительного стресса в условиях воздействия на растения нефтяного загрязнения и способствует стимуляции роста растений. Протекторный эффект эндофитного штамма *B. subtilis* 26Д<sup>Н</sup> по отношению к растениям пшеницы при

действию на них сырой нефти может быть повышен путем проведения “ускоренной селекции бактерий” на толерантность к поллютантам, поступающим при нефтяном загрязнении. Эти свойства эндوفитного штамма *B. subtilis* 26Д<sup>+</sup> могут обеспечить многообещающие перспективы для их применения в качестве потенциальных агентов для биоремедиации окружающей среды, загрязненной углеводородами. Кроме того, способность биосурфактанта стимулировать рост растений может быть использована для стимуляции роста растений на участках, загрязненных углеводородами, и для возврата ряда из них в хозяйственный оборот.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Odukoya J., Lambert R., Sakrabani R. Understanding the impacts of crude oil and its induced abiotic stresses on agrifood production: A review // *Horticulturae*. 2019. V. 5. Art. 47. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020047>
2. Alotaibi F., St-Arnaud M., Hijri M. In-depth characterization of plant growth promotion potentials of selected alkanes-degrading plant growth-promoting bacterial isolates // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 863702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.863702>
3. Kanwal M., Ullah H., Gulzar A., Sadiq T., Gul Z., Ullah M., Sarfraz M., Aslam M.A., Khan N.N., Batool T., Maqsood S., Nawaz A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and the factors effecting rate of biodegradation // *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 2022. V. 16. P. 6. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2022.16.002182>
4. Da Silva Correa H., Blum C.T., Galvão F., Maraho L.T. Effects of oil contamination on plant growth and development: a review // *Environ. Sci Pollut. Res.* 2022. V. 29. P. 43501. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19939-9>
5. Arellano P., Tansey K., Balzter H., Tellkamp M. Plant family-specific impacts of petroleum pollution on biodiversity and leaf chlorophyll content in the amazon rainforest of Ecuador // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. Art. e0169867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169867>
6. Lumactud R., Shen S.Y., Lau M., Fulthorpe R. Bacterial endophytes isolated from plants in natural oil seep soils with chronic hydrocarbon contamination / *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 755. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00755>
7. Pawlik M., Płociniczak T., Thijs S., Pintelon I., Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z. Comparison of two inoculation methods of endophytic bacteria to enhance phytodegradation efficacy of an aged petroleum hydrocarbons polluted soil // *Agronomy*. 2020. V. 10. Art. 1196. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081196>
8. Hwang H.-H., Chien P.-R., Huang F.-C., Yeh P.-H., Hung S.-H.W., Deng W.-L., Huang C.-C. A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* StrainBP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 2047. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102047>
9. Ha-Tran D.M., Nguyen T.T.M., Hung S.H., Huang E., Huang C.C. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 2. Art. 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
10. Mohammadipanah F., Zamanzadeh M. Bacterial mechanisms promoting the tolerance to drought stress in plants // *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms* / Eds. H. Singh et al. Springer: Singapore. 2019. P. 185. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_10)
11. Fadji A.E., Babalola O.O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. Art. 467. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>
12. Захарченко М.В., Люшин М.М., Мустафина Э.А. Соединения металлов в нефтях месторождений Оренбуржья // *Нефтегазохимия*. 2016. Т. 1. С. 61.
13. Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
14. Veselova S.V., Burkhanova G.F., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Roles of ethylene and cytokinins in development of defense responses in *Triticum aestivum* plants infected with *Septoria nodorum* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 609. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050150>
15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
16. Costa H., Gallego S.M., Tomaro M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // *Plant Sci.* 2002. V. 162. P. 939.
17. Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах // *Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2014. Т. 21. С. 168.
18. Курамшина З.М., Хайруллин Р.М., Смирнова Ю.В. Сортовая отзывчивость *Triticum aestivum* L. на инокуляцию клетками эндوفитных штаммов *Bacillus subtilis* // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2019. Т. 6. С. 3. <https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6>
19. Kuramshina Z.M., Khairullin R.M. Endophytic strains of *Bacillus subtilis* promote drought resistance of plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70 (45). P. 259. <https://doi.org/10.1134/S1021443722603172>
20. Kuramshina Z.M., Khairullin R.M. Improving salt stress tolerance of *Triticum aestivum* L. with endophytic strains of *Bacillus subtilis* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2023. V. 70 (53). P. 293. <https://doi.org/10.1134/S1021443722603068>
21. Ziółkowska A., Wyszkowski M. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants // *Ecol. Chem. Eng. S.* 2010. V. 17. P. 73.

22. *da Silva Correa H., Blum C.T., Galvão F., Maranhão L.T.* Effects of oil contamination on plant growth and development: a review // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022. V. 29. Art. 43501.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-19939-9>
23. *Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., de Oliveira V.M.* Metagenomic insights into the mechanisms for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the oil supply chain // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11 Art. 561506.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561506>
24. *Pawlik M., Cania B., Thijs S., Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z.* Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. V. 24. P. 19640.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9496-1>
25. *Antoszewski M., Mierek-Adamska A., Dąbrowska G.B.* The Importance of microorganisms for sustainable agriculture—a review // *Metabolites.* 2022. V. 12. Art. 1100.  
<https://doi.org/10.3390/metabo12111100>
26. *Mitter E. R.K., Kataoka R., de Freitas J. R., Germida J.J.* Potential use of endophytic root bacteria and host plants to degrade hydrocarbons // *Int. J. Phytoremediation.* 2019. V. 21. Art. 9.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1583637>
27. *Liu Y., Morelli M., Koskimäki J.J., Qin S., Zhu Y.-H., Zhang X.X.* Editorial: Role of endophytic bacteria in improving plant stress resistance // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. Art. 1106701.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1106701>
28. *Gkorezis P., Daghio M., Franzetti A., Van Hamme J.D., Sillen W., Vangronsveld J.* The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 1836.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>
29. *Kuramshina Z.M., Smirnova Y.V., Khairullin R.M.* Increasing *Triticum aestivum* tolerance to cadmium stress through endophytic strains of *Bacillus subtilis* // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2016. V. 63. P. 636.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443716050083>
30. *Marchut-Mikolajczyk O., Drożdżyński P., Pietrzyk I D., Antczak T.* Biosurfactant production and hydrocarbon degradation activity of endophytic bacteria isolated from *Chelidonium majus* L. // *Microb. Cell Fact.* 2018. V. 17. Art. 171.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-1017-5>
31. *Peele A., Vekateswarulu T.C. Tammineedi J., Kanumuri L. Ravuru B.K., Dirisala V.R., Kodali V.P.* Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution - a review // *Petroleum.* 2018. V. 4. P. 241.
32. *Черепанова Е.А., Галаятдинов И.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В.* Выделение и идентификация липопептидов штамма *Bacillus subtilis* 26Д // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. С. 496.  
<https://doi.org/10.31857/S0555109921050032>
33. *Maksimov I.V., Singh B.P., Cherepanova E.A. Burkhanova G.F., Khairullin R.M.* Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (Review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. P. 15.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>
34. *Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I.* Endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D increases levels of phytohormones and repairs growth of potato plants after colorado potato beetle damage // *Plants.* 2021. V. 10. Art. 923.  
<https://doi.org/10.3390/plants10050923>
35. *Нафикова А.Р., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М., Максимов И.В.* Влияние метаболитов штаммов 26Д и 11ВМ бактерии *Bacillus subtilis* на рост проростков и каллусов пшеницы // *Агрехимия.* 2018. Т. 5. С. 39.  
<https://doi.org/10.7868/s000218811805006x>
36. *Le Mire G., Siah A., Brisset M.-N., Gaucher M., Deleu M., Jijakli M.H.* Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent defense responses // *Agriculture.* 2018. V. 8. Art. 11.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture8010011>
37. *Pršić J., Ongena M.* Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 11. Art. 594530.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594530>

## ПАРАМЕТРЫ ИНДУКЦИОННЫХ КРИВЫХ БЫСТРОЙ И ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, И РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ФС I – P700 ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ И ЛИПЫ В РАЗЛИЧНЫХ ГОРОДСКИХ УСЛОВИЯХ

© 2023 г. Д. А. Тодоренко<sup>а</sup>, О. В. Яковлева<sup>а, \*</sup>, А. А. Алексеев<sup>б</sup>, Д. Н. Маторин<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

<sup>б</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова”, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

\*e-mail: oolga.yakovleva@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Исследованы фотосинтетические характеристики листьев липы (*Tilia cordata* L.) и березы (*Betula verrucosa* L.), растущих вблизи городских магистралей г. Москвы (МКАД, Московская кольцевая автодорога) с помощью одновременной регистрации индукционных кривых флуоресценции хлорофилла и редокс-состояния пигмента ФС I – P700. У деревьев близ магистралей выявлено ухудшение электронного транспорта на уровне пластохинонов ( $\delta_{Ro}$ ) и снижение скорости восстановления P700<sup>+</sup>, несмотря на достаточно высокие показатели фотосинтетической эффективности ( $F_v/F_m$ ). У листьев березы, растущих вдоль МКАД, выявлено снижение оттока электронов от ФС I и уменьшение интенсивности замедленной флуоресценции при 30 мс и 1 с, связанной со снижением электрической и химической составляющих электрохимического градиента протонов на фотосинтетических мембранах. У растений около автомобильных магистралей отмечено повышение степени фотоингибирования и замедление реакций восстановления фотосинтетической активности в темноте после прекращения фотоокислительного стресса, что подтверждает вероятное влияние неблагоприятных городских условий на биосинтез белков реакционных центров ФС II. В качестве индикаторов состояния деревьев в городской среде предложены следующие параметры флуоресценции: общий индекс производительности ( $PI_{total}$ ) и квантовый выход восстановления акцепторов электрона на акцепторной стороне ФС I ( $\phi_{Ro}$ ).

**Ключевые слова:** *Betula verrucosa*, *Tilia cordata*, антропогенная нагрузка, загрязнения, флуоресценция хлорофилла, фотосистемы I и II

DOI: 10.31857/S0015330323600171, EDN: AZOVSM

### ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая загруженность городских магистралей автомобильным транспортом ухудшает состояние городской растительности. Зеленые насаждения играют важную роль в ландшафте современного города – увлажняют и очищают воздух фитонцидами. Загрязнение воздуха и почвы воздействует на состояние растений, что приводит к ухудшению их фотосинтетических характеристик [1–5].

**Сокращения:** ЗФ – замедленная флуоресценция, МКАД – Московская кольцевая автодорога, ABS – поглощение (*absorption*), MR – модулированное отражение (*modulated reflection*), RC – реакционный центр (*reaction center*), RE – восстановление конечных акцепторов в ФС I (*reduction of end acceptors in PS I*), PI – индекс производительности (*performance index*).

Фотосинтетический аппарат растений представляет собой сложноорганизованную систему, в которой функционируют различные пигмент-белковые комплексы, белковые комплексы, переносчики электронов и протонов [6]. Поглощенная энергия пигментами антенных комплексов фотосистем II (ФС II) и I (ФС I) используется для переноса электронов по фотосинтетической ЭТЦ для образования НАДФН и АТФ, которые в дальнейшем участвуют в темновых реакциях фотосинтеза.

Известно, что фотосинтетический аппарат растений чрезвычайно чувствителен к воздействию экологических факторов, в том числе и антропогенных [7]. В связи с этим фотосинтетический аппарат городских насаждений может выступать в качестве индикатора состояния городской среды. Наруше-

ния в функционировании фотосинтетического аппарата могут быть выявлены с помощью различных методов регистрации флуоресценции хлорофилла [8, 9].

В настоящее время флуоресценция хлорофилла широко используется для оценки активности фотосинтетического аппарата растений и водорослей [10]. Данный метод обладает высокой чувствительностью, производительностью, а также доступностью портативных приборов, которые могут быть использованы непосредственно в полевых условиях *in situ*, что очень важно для решения различных экологических задач [11–14]. Флуоресценцию хлорофилла обычно индуцируют актиничным насыщающим светом и определяют значения —  $F_0$  (начальная флуоресценция) и  $F_M$  (максимальная флуоресценция), из которых рассчитывают часто используемый параметр  $F_V/F_M$  — максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФС II [8]. Регистрируя индукционные кривые флуоресценции хлорофилла, можно получить информацию не только о событиях, протекающих в ФС II, но и в ее окружении [9, 15, 16]. Индукционная кривая флуоресценции хлорофилла или ОЖР-кривая отражает последовательный переход фотосинтетической ЭТЦ из окисленного (О,  $F_0$ ) в полностью восстановленное состояние (Р,  $F_M$ ) через основные промежуточные стадии J и I. Начальная фаза OJ соответствует значительному восстановлению акцепторной стороны ФС II, в то время как последующая фаза JP отражает последовательное восстановление пула пластохинонов (PQ) и переносчиков электронов за пределами пула PQ [16]. Функциональное состояние ФС I оценивается путем регистрации отражения при 820 нм, которое связано с окислительно-восстановительными переходами P700, димера реакционного центра ФС I, и пластоцианина, вовлеченного в перенос электрона от цитохромного  $b_6/f$  комплекса к ФС I [17]. По замедленной флуоресценции оценивается энергизация тилакоидных мембран, т.е. светоиндуцированное образование мембранного потенциала и трансмембранного градиента протонов ( $\Delta pH$ ) на тилакоидных мембранах [7, 17].

Ранее исследователями изучались изменения фотосинтетических характеристик по флуоресценции хлорофилла у растений вблизи транспортных магистралей [1, 2, 18]. Несмотря на имеющиеся данные, которые в основном сосредоточены на исследовании активности ФС II, отсутствуют данные о характеристике процессов, протекающих в ФС I и между фотосистемами, а также об уровне энергизации мембран у таких деревьев вблизи транспортных магистралей.

Одним из факторов, влияющих на состояние городских насаждений вдоль транспортных магистралей, является повышенное содержание тяже-

лых металлов от автомобильного транспорта. Известно, что соли тяжелых металлов могут существенно нарушать процесс фотосинтеза растений [19, 20]. Ранее мы проводили детальные исследования воздействия ряда тяжелых металлов на фотосинтетические характеристики листьев высших растений с помощью многофункционального анализатора растений M-PEA-2 [21, 22]. В настоящей работе представляло интерес сравнить эти данные с результатами влияния загрязнений на городские растения при регистрации флуоресценции хлорофилла *a* на том же приборе M-PEA-2.

Целью данной работы явилось изучение состояния ФС II и ФС I и электрон-транспортных процессов между фотосистемами, а также уровня энергизации тилакоидных мембран листьев древесных растений, произрастающих рядом с Московской кольцевой автодорогой (МКАД), с помощью одновременной регистрации индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, и регистрации модулированного отражения при 820 нм. Полученные данные позволили определить мишени преимущественного воздействия городских условий на первичные фотохимические реакции фотосинтеза и выявить наиболее чувствительные параметры флуоресценции хлорофилла *a* для экспресс-мониторинга физиологического состояния деревьев.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны листья деревьев липы мелколистной (*Tilia cordata* L.) и березы бородавчатой (*Betula verrucosa* L.), растущих вдоль МКАД (5 м от дороги). Географические координаты (широта, долгота) местопроизрастания исследуемых деревьев: липа — (55.593747, 37.521393)—(55.594400, 37.518640); береза — (55.593814, 37.518609)—(55.594303, 37.516385). Контролем были выбраны деревья из Ясенеvского лесопарка: липовая аллея — (55.597832, 37.515994)—(55.597276, 37.516877); березовая аллея — (55.597184, 37.516734)—(55.597748, 37.515822). Измерения проводили на адаксиальной стороне листьев однолетних побегов ветвей нижнего яруса с юго-восточной части деревьев примерно одного возраста. Листья без видимых пожелтений и повреждений отбирались в ранние утренние часы. Исследовали по 5 деревьев вдоль МКАД и из парка. Перед измерениями листья адаптировали к темноте в течение 30 мин. Все измерения проводили не менее чем в пяти повторностях. На рисунках представлены усредненные данные 10 образцов.

Флуоресценцию хлорофилла *a* и кинетику отражения при 820 нм регистрировали с помощью многофункционального анализатора растений M-PEA-2 (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) [17, 21–24]. Возбуждали флуоресценцию красным актиничным светом ( $\lambda = 625$  нм) с

**Таблица 1.** Описание и формулы параметров флуоресценции, полученных из ОЛП-кривых с помощью ЛП-теста [23]

Формулы параметров флуоресценции	Описание параметров флуоресценции
$F_0$	Минимальная интенсивность флуоресценции, когда все реакционные центры ФС II открыты
$F_M = F_P$	Максимальная (= максимально возможная) флуоресценция во время пика P, когда все реакционные центры ФС II закрыты
$F_V = F_M - F_0$	Максимальная переменная флуоресценция
$V_J = (F_J - F_0)/F_V$	Относительная переменная флуоресценция на J-этапе
$V_I = (F_I - F_J)/F_V$	Относительная переменная флуоресценция на I-этапе
$M_0 = 4(F_{270 \mu s} - F_{20 \mu s})/F_V$	Усредненная величина начального наклона (в $ms^{-1}$ ) относительной переменной флуоресценции хлорофилла a, $V = f(t)$
$\Psi_{E_0} = 1 - V_J$	Вероятность транспорта электронов за пределы $Q_A^-$ (при $t = 0$ ), то есть эффективность, с которой экситон, захваченный RC, движет электрон по цепочке после $Q_A^-$
$\delta_{R_0} = (1 - V_I)(1 - V_J)$	Вероятность, с которой электрон от переносчиков между двумя фотосистемами восстанавливает крайние акцепторы электрона на акцепторной стороне ФС I
$\Phi_{P_0} (= F_V/F_M) = (F_M - F_0)/F_M$	Максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции (при $t = 0$ ), который указывает на вероятность захвата энергии поглощенных фотонов RC ФС II.
$\Phi_{E_0} = \Phi_{P_0}\Psi_{E_0}$	Квантовый выход переноса электронов от $Q_A^-$
$\Phi_{R_0} = (1 - \Phi_{P_0})(1 - V_I)$	Квантовый выход восстановления крайних акцепторов электрона на акцепторной стороне ФС I
$ABS/RC = M_0(1/V_J)(1/\Phi_{P_0})$	Поток энергии, поглощаемой одним активным RC
$TR_0/RC = M_0(1/V_J)$	Поток энергии возбуждения, улавливаемой одним активным RC (приводящий к восстановлению $Q_A$ )
$ET_0/RC = M_0(1/V_J)\Psi_{E_0}$	Поток электронов, переносимых через один активный RC (далее $Q_A^-$ )
$RE_0/RC = M_0(1/V_J)(1 - V_I)$	Поток электронов, переносимых через один активный RC и восстанавливающих крайние акцепторы на акцепторной стороне ФС I
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Общее количество энергии, рассеиваемой одним RC
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0}) \times (\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0}))$	Индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии
$PI_{total} = PI_{ABS}(\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0}))$	Общий индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, ФС I и цепи переноса электронов между ними

плотностью потока фотосинтетических фотонов (PPFD) 3000 мкмоль фотонов/( $m^2$  с) в течение 60 с.

Индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛП-кривые) анализировали с помощью ЛП-теста [23]. Данный тест описывает и обобщает события, связанные с поглощением (ABS), захватом энергии реакционным центром (TR), переносом электронов от  $Q_A^-$  к межсистемным электронным акцепторам (ET), восстановлением конечных акцепторов электронов в ФС I (RE) и диссипацией энергии (DI). Все эти события выражаются в виде квантовых выходов (yields) и вероятностей (prob-

abilities), специфических потоков энергии (на реакционный центр, RC) и показателей производительности (PI). В ЛП-тесте используются следующие значения интенсивности флуоресценции: при 20 мкс ( $F_0$ ), 2 мс ( $F_J$ ), 30 мс ( $F_I$ ) а также  $F_M$  (максимальная интенсивность флуоресценции). В таблице 1 приведен список используемых параметров флуоресценции ЛП-теста и краткие пояснения.

Индукционные кривые замедленной флуоресценции (ЗФ) регистрировали во время коротких прерываний актиничного света [23]. В нашем исследовании динамика ЗФ отражает изменения

интенсивности свечения в диапазоне 0.1–0.9 мс в интервалах между импульсами актиничного света. Кинетика ЗФ характеризуется быстрой фазой с основным пиком  $I_1$ , вторым пиком (“плечом”)  $I_2$  и промежуточным перегибом  $D_2$  между ними, и медленной фазой, включающей несколько максимумов и минимумов [17].

Кинетика модулированного отражения (MR – modulated reflection) при 820 нм (индукция MR) отражает изменения окислительно-восстановительных состояний P700 и пластоцианина, вклад которых в сигнал составляет примерно 70 и 30%, соответственно. В нашем исследовании, MR сигнал нормировали на первое достоверное значение MR при 0.7 мс [23].

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакеты программ OriginPro 2018 и Statistica 10. Средние значения и стандартные отклонения были рассчитаны для каждого показателя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛР-кривые) листьев березы и липы из парка (контроль) и растущих вдоль МКАД.

Поскольку нас интересовали изменения на определенных участках ЭТЦ, индукционные кривые были нормированы на переменную флуоресценцию  $F_V$  и представлены в виде  $V_t = (F_t - F_0)/F_V$ , что позволило оценить изменения в отдельных фазах ОЛР-кривых и соответственно выявить изменения на конкретных участках ЭТЦ. У контрольных деревьев, растущих в экологически благоприятных условиях, наблюдали типичные ОЛР-кривые, которые описаны в литературе [9]. Изменения во время фазы О-Ж определяются светоиндуцированным восстановлением  $Q_A$ . Начальный уровень О соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла ( $F_0$ ) при “открытых” РС ФС II, когда все  $Q_A$  окислены. Дальнейшая фаза J-I-P отражает последующее накопление восстановленного  $Q_A^-$ , обусловленное восстановлением  $Q_B$  и пула пластохинонов [9, 15, 16]. У листьев деревьев, растущих вдоль МКАД, форма индукционных кривых несколько отличалась от контрольных деревьев, главным образом, на уровнях J и I (рис. 1). У листьев деревьев вблизи магистрали наблюдали рост амплитуд фаз О-Ж ( $V_J$ ) и О-И ( $V_I$ ) по сравнению с контрольными деревьями, обусловленный накоплением  $Q_B$ -невосстанавливающих центров в ФС II и снижением электронного транспорта на уровне пластохинонов (рис. 2). При этом у березы выявлен более выраженный рост  $V_I$  по сравнению с липой.

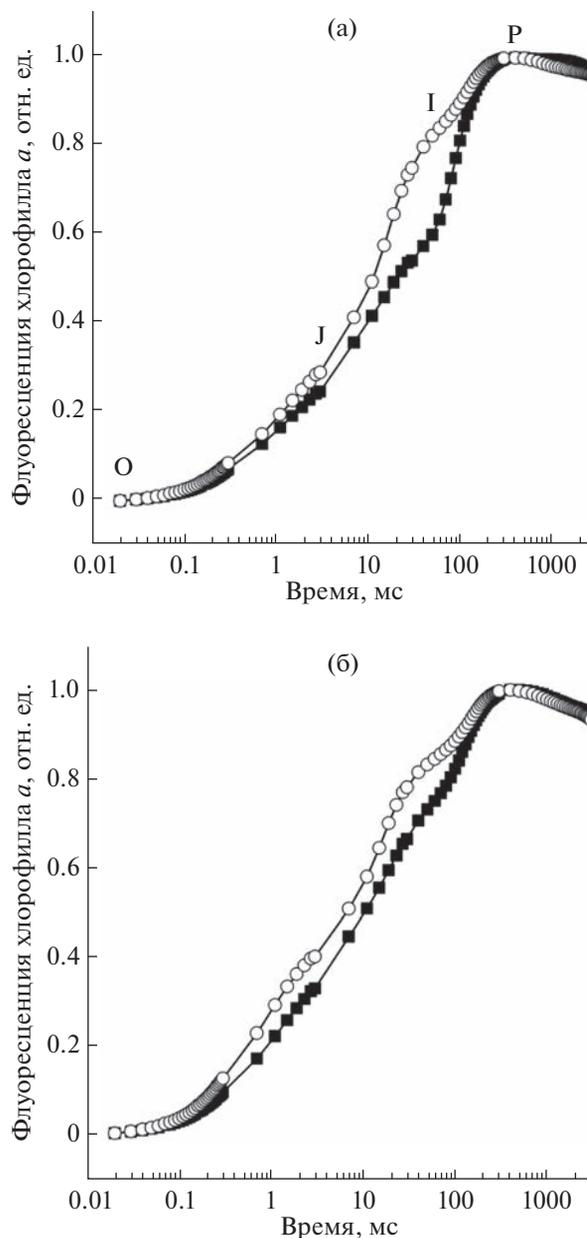
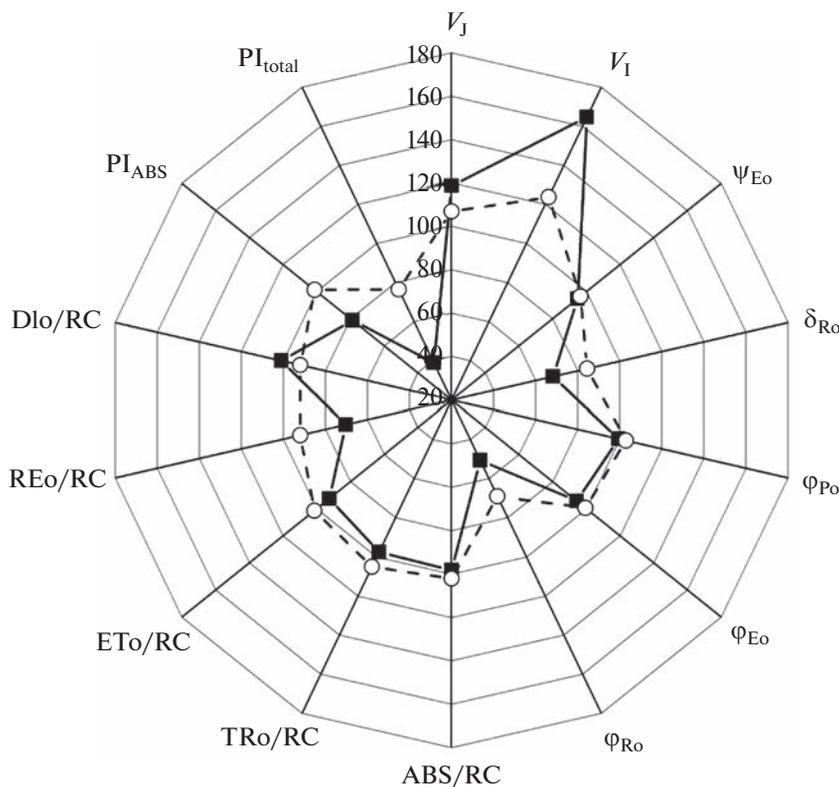


Рис. 1. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛР) листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль –■–) и растущих вдоль МКАД (○–). ОЛР-кривые нормированы на переменную флуоресценцию,  $V_t = (F_t - F_0)/F_V$ .

Поскольку были выбраны деревья без видимых повреждений листьев, анализ индукционных кривых с помощью ЛР-теста показал, что максимальный квантовый выход первичных фотохимических реакций  $F_V/F_M (= \phi_{P_0})$  у листьев деревьев вблизи МКАД находился на достаточно высоком уровне 0.78–0.81 (рис. 2). Однако параметры, связанные с электронным транспортом, у деревьев, растущих вдоль МКАД, отличались от таковых у контрольных деревьев. Так, значимые изменения



**Рис. 2.** Параметры JIP-теста, полученные из OJIP-кривых флуоресценции хлорофилла *a* листьев деревьев березы *B. verrucosa* (—■—) и липы *T. cordata* (---○---), растущих вдоль МКАД. Данные представлены в процентах от контроля, где 100% — контроль (деревья из парка).

были выявлены в снижении эффективности электронного транспорта между двумя фотосистемами ( $\delta_{Ro}$ ) у деревьев, произрастающих вблизи МКАД. Кроме того, у них обнаружено существенное снижение квантового выхода восстановления крайних акцепторов на акцепторной стороне ФС I ( $\Phi_{Ro}$ ). Тогда как скорость линейного электронного транспорта на акцепторной стороне ФС II между  $Q_A$  и  $Q_B$  практически не изменялась у деревьев возле МКАД. Параметры, характеризующие вероятность транспорта электронов за пределы  $Q_A^-$  ( $\Psi_{Eo}$ ), и квантовый выход переноса электронов от  $Q_A^-$  ( $\Phi_{Eo}$ ) у листьев деревьев близ магистрали не отличались от данных параметров контрольных деревьев.

Поглощение потока энергии (ABS/RC) и последующий захват энергии (TRo/RC) одним активным RC в ФС II у деревьев березы и липы близ МКАД и из экологически благоприятного района были практически одинаковыми. Из этого следует, что загрязнения близ магистралей оказывают малое воздействие на процессы поглощения и передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на RC. Наряду с отсутствием изменений в параметрах ABS/RC и TRo/RC у данных деревьев не выявлено изменений в отношении

параметра ETo/RC, характеризующего поток электронов, переносимый через один активный RC (далее  $Q_A^-$ ). Кроме того, у них не наблюдалось существенного увеличения рассеивания энергии (DIo/RC). Однако у берез, растущих вдоль МКАД, обнаружено уменьшение потока электронов, восстанавливающих крайние акцепторы в ФС I (REo/RC). У липы вблизи МКАД подобных изменений не наблюдалось.

Индексы продуктивности работы фотосинтетического аппарата —  $PI_{ABS}$  и  $PI_{total}$  представляют собой произведения частных потенциалов на последовательных этапах преобразования энергии [9]. Уменьшение  $PI_{ABS}$  обнаружено у листьев берез, растущих вдоль МКАД, по сравнению с контрольными деревьями, что свидетельствует о снижении функционального состояния ФС II при воздействии загрязнений на дорожной магистрали. Ранее было показано, что часто при неблагоприятных воздействиях максимальный квантовый выход фотохимии ФС II ( $F_V/F_M$ ) не изменяется, в то время как функциональная активность ФС II, выраженная через  $PI_{ABS}$ , снижается [25]. В отличие от параметра  $PI_{ABS}$ , который снижался только у березы, растущей вдоль магистрали, изменения в параметре  $PI_{total}$  выявлены как у листьев березы, так и у липы

вблизи МКАД. Параметр  $PI_{total}$  представляет собой произведение двух параметров  $PI_{ABS}$  и  $\delta_{Ro}$ . Снижение параметра  $PI_{total}$  листьев обусловлено нарушением потока электронов между фотосистемами ( $\delta_{Ro}$ ).

Регистрация кинетики модулированного отражения при 820 нм (MR) позволяет следить за реакциями переносчиков пластоцианина и главным образом P700 (RC ФС I). На рис. 3 представлены кинетики MR листьев березы (а) и липы (б) из парка (контроль) и, растущих вдоль МКАД. Кинетика MR характеризуется двумя фазами. Первая фаза представляет собой начальное светоиндуцированное окисление P700, которое сопровождается снижением сигнала MR за счет оттока электронов от ФС I. В момент времени  $t \approx 20\text{--}30$  мс в кинетике MR достигается переходное устойчивое состояние, когда скорость окисления P700 равна скорости восстановления P700<sup>+</sup>. Вторая фаза характеризует последующее увеличение сигнала MR, которое отражает восстановление P700<sup>+</sup> за счет перехода электронов от ФС II. Как видно из рисунка 3а, у листьев березы, растущих вдоль МКАД, наблюдали значительное уменьшение сигнала MR при 30 мс по сравнению с деревьями из парка, обусловленное снижением оттока электронов от ФС I. Кроме того, обнаружено небольшое уменьшение скорости восстановления P700<sup>+</sup> у листьев березы. В отличие от берез, растущих вдоль МКАД, у лип из той же зоны выявлено, что P700 способен к процессам окисления при включении света, однако, у них наблюдается снижение скорости восстановления P700<sup>+</sup> вследствие нарушения электронного транспорта от ФС II, что заметно по уменьшению интенсивности сигнала MR при 200 мс (рис. 3б). Полученные данные согласуются с данными анализа индукционных кривых быстрой флуоресценции.

Регистрация кинетики ЗФ является одним из методов, который позволяет следить за энергизацией тилакоидных мембран [7, 17, 23]. ЗФ тесно связана с фотохимическими реакциями, протекающими в RC ФС II. Во временном интервале от нескольких микросекунд до миллисекунд кинетика затухания ЗФ связана с процессами рекомбинации зарядов между восстановленным первичным акцептором  $Q_A^-$  и окисленным первичным донором P680<sup>+</sup> в ФС II. В типичной индукционной кривой ЗФ зеленого листа при включении возбуждающего света различают несколько фазовых переходов [7]. Индукционную кривую ЗФ можно описать с помощью пиков I<sub>1</sub>–I<sub>4</sub>. У деревьев, растущих в парке, максимум I<sub>1</sub> наблюдался через 10 мс и “плечо” I<sub>2</sub> примерно через 100 мс после начала освещения. Появление данных пиков связано с формированием мембранного (электрического) потенциала на мембране за счет разделения зарядов и переноса электронов на акцепторной сто-

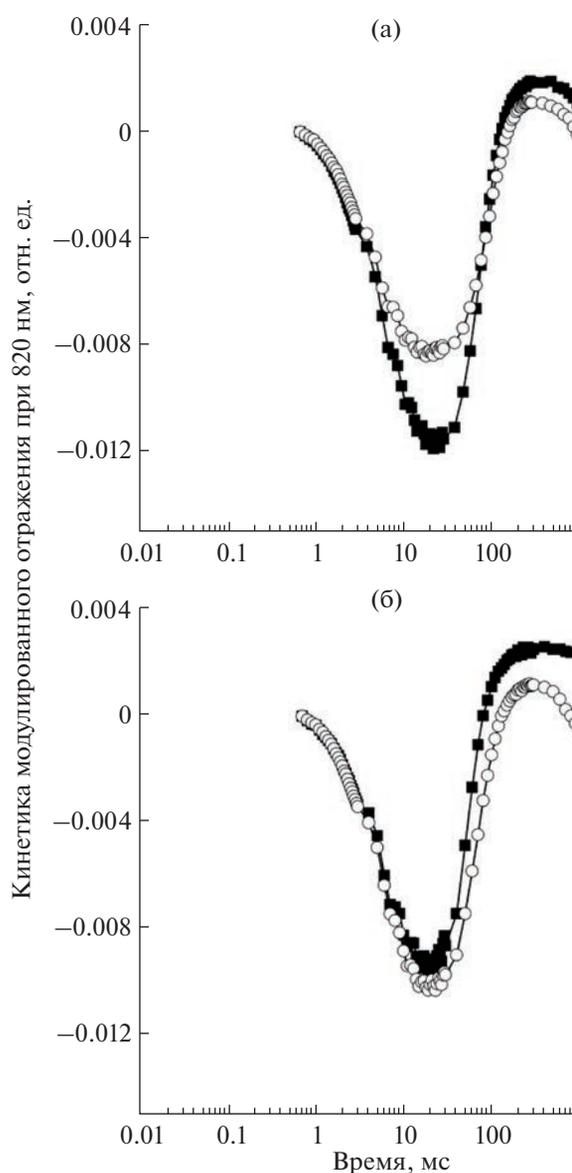
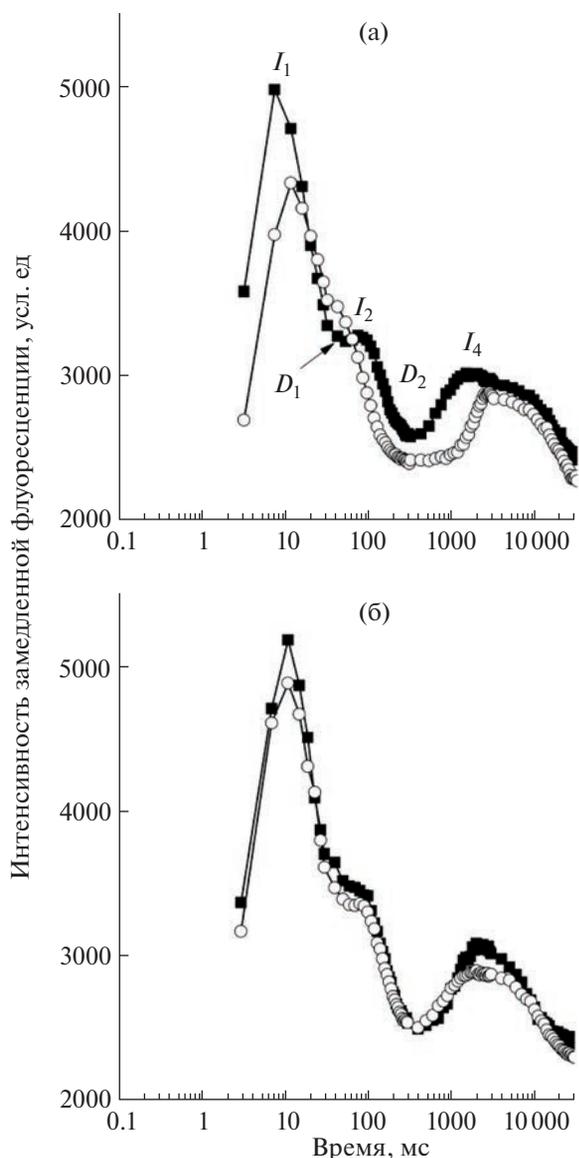


Рис. 3. Кинетика модулированного отражения (MR) при 820 нм листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль —■—) и растущих вдоль МКАД (—○—). Значения MR нормированы на 0.7 мс.

роне ФС II и за ее пределами [7]. Провал D<sub>2</sub>, разделяющий быструю и медленную фазы, наблюдался примерно через 250 мс. В медленной фазе обнаружен одиночный пик I<sub>4</sub> примерно через 2 с, связанный с формированием трансмембранного градиента протонов ( $\Delta pH$ ) на мембране тилакоидов [7]. У деревьев липы, растущих вдоль МКАД, обнаружены изменения в форме индукционных кривых ЗФ (рис. 4). Так, наблюдали снижение интенсивности и сдвиг пика I<sub>1</sub> во времени у деревьев близ МКАД по сравнению с деревьями, растущими в парке. Кроме того, у данных деревьев



**Рис. 4.** Кинетика светоиндуцированной замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла *a* листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль —■—) и растущих вдоль МКАД (—○—).  $I_1$ ,  $I_2$ , и  $I_4$  — экстремумы кинетики ЗФ;  $D_1$  и  $D_2$  — минимумы кинетики ЗФ.

отмечалось уменьшение интенсивности пика  $I_4$  и небольшой сдвиг пика  $I_2$ . Эти изменения в индукционных кривых ЗФ были менее выражены у деревьев липы, растущих вдоль МКАД, по сравнению с березой.

Из литературных данных известно, что избыточное и продолжительное освещение приводит к временному отключению работы фотосинтеза на уровне ФС II, известное как фотоингибирование [26]. Снижение фотосинтетической активности в дневные часы зависит от интенсивности света и изменения физиологического состояния растений.

Это связано с включением защитных процессов диссипации избыточной световой энергии в тепло и с распадом  $D_1$ -белка ФС II [27, 28]. Концентрация активных центров ФС II в клетках зависит от соотношения скоростей ее фотоокислительной деструкции и репарации, которые могут быть определены по снижению величины параметра  $F_V/F_M$  на интенсивном свете и его последующего восстановления в темноте или на очень слабом свете [28, 29]. На рис. 5 представлено изменение параметра  $F_V/F_M$  листьев березы (а) и липы (б) из парка (контроль) и, растущих вдоль МКАД, при повышенной освещенности 2500 мкмоль фотонов/( $m^2$  с) в течение 40 мин и последующей темновой экспозиции. У деревьев свет высокой интенсивности приводил к уменьшению величины  $F_V/F_M$ . При этом эффект фотоингибирования в большей степени проявлялся у листьев липы, чем у светолюбивой березы. Так, значения параметра  $F_V/F_M$  у контрольной березы снижались на свету с 0.81 до 0.73, а у липы — с 0.78 до 0.68. Кроме того, у листьев берез, растущих вдоль МКАД,  $F_V/F_M$  снижались с 0.81 до 0.68, а у лип из той же зоны  $F_V/F_M$  — с 0.78 до 0.59. После освещения листья помещали в темноту и регистрировали восстановление  $F_V/F_M$  через 1, 2 и 4 ч. Как видно из рисунка 5, восстановление  $F_V/F_M$  у листьев деревьев из парка происходило быстрее, чем у деревьев близ МКАД. Полное восстановление  $F_V/F_M$  у деревьев произошло за 4 ч, тогда как деревья, растущие вдоль МКАД, не полностью восстановили свою фотосинтетическую активность листьев после фотоокислительного стресса.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Городские деревья играют важную роль в очищении воздуха от загрязнений. В крупных городах наблюдается повышенное загрязнение воздуха и почв, а деревья, растущие на улицах, особенно подвержены загрязнению в результате движения транспортных средств. На автомобильных магистралях одними из загрязнителей воздуха выступают тяжелые металлы. Тяжелые металлы в растениях вызывают накопление АФК, снижают антиоксидантную активность, индуцируют ПОЛ, ингибируют биосинтез пигментов, фотосинтетический транспорт электронов, активность цикла Кальвина-Бенсона, воздействуют на ультраструктуру хлоропластов [19, 20].

В настоящее время достигнуты определенные успехи в изучении воздействия тяжелых металлов на фотосинтетические реакции растений с помощью флуоресцентных методов [21, 22, 30, 31]. Полученные данные в контролируемых условиях служат основой для интерпретации реакций растений на эти загрязнения, наблюдаемых в окружающей среде.

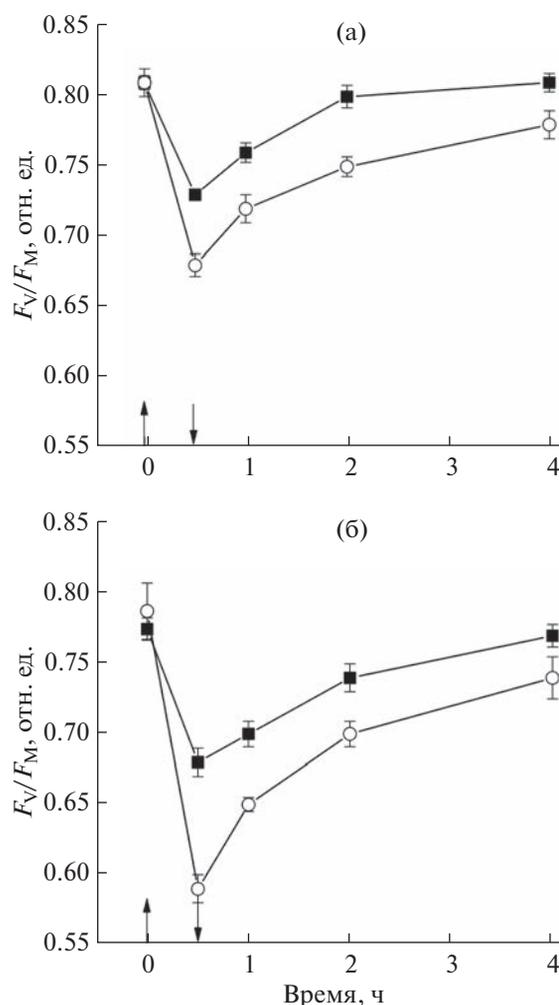
Липы и березы являются одними из популярных деревьев, которые используют в городском озеленении. Липа теневынослива, имеет компактную крону, нетребовательна к почвенным условиям. Береза светолюбива, также нетребовательна к почвам, обладает высокой фитонцидной активностью, но в то же время негасоустойчива.

Ранее мы проводили исследования состояния городских деревьев липы и березы в районе Дмитровского шоссе г. Москвы с помощью регистрации индукционных кинетик флуоресценции хлорофилла [32]. Было показано, что у деревьев близ автомобильных магистралей наблюдалось уменьшение скорости фотосинтетического электронного транспорта ( $\Phi_{E_0}$ ) и максимального квантового выхода ФС II ( $F_V/F_M$ ). Изменения в функционировании ФС II у городских деревьев отмечались и в других работах [18, 2].

В данной работе мы изучили состояние городских деревьев березы и липы, растущих вдоль МКАД и в 150 м от автодороги в Ясеневском лесопарке, с помощью многофункционального анализатора растений M-PEA2, который позволяет одновременно следить за электрон-транспортными процессами, протекающими в фотосистемах и между ними. Применение данного подхода позволило оценить изменения в отдельных реакциях электронного транспорта у листьев деревьев, произрастающих в различных городских условиях. Нами были исследованы фотосинтетические реакции листьев деревьев без видимых повреждений, что проявлялось в отсутствии изменений в параметре  $F_V/F_M (= \Phi_{P_0})$ .

У деревьев березы и липы, растущих вдоль МКАД, фотосинтетическая активность, определенная по параметру  $F_V/F_M$ , находилась на достаточно высоком уровне. Значения параметра  $F_V/F_M$  составляли 0.78–0.81. Высокие значения  $F_V/F_M$  свидетельствуют о способности реакционных центров ФС II к фотохимическому преобразованию поглощенной энергии. Полученные данные согласуются с данными по воздействию таких тяжелых металлов как хром и кадмий, которые при низких концентрациях и краткосрочном воздействии не оказывают влияния на первичные фотохимические реакции в ФС II растений гороха [21, 22]. Электронный транспорт на акцепторной стороне ФС II между  $Q_A$  и  $Q_B$  ( $\Psi_{E_0}$  и  $\Phi_{E_0}$ ) значимо не изменялся у деревьев возле МКАД, что свидетельствует об отсутствии изменений в ФС II у листьев деревьев вблизи этой транспортной магистрали.

Несмотря на отсутствие изменений в активности ФС II, перенос электронов из пула PQ на терминальные акцепторы электронов ФС I ( $\delta_{R_0}$  и  $\Phi_{R_0}$ ) был снижен у деревьев вблизи МКАД. Полученные результаты свидетельствуют об ухудшении электронного транспорта за пределами PQ пула, пред-



**Рис. 5.** Изменение параметра  $F_V/F_M$  листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль —■—) и растущих вдоль МКАД (—○—), при повышенной освещенности 2500 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup> с) в течение 40 мин и последующей темновой экспозиции. Стрелками вверх и вниз показаны моменты включения (↑) и выключения (↓) света, соответственно.

положительно на уровне цитохромного  $b_6f$  комплекса. По-видимому, данный участок ЭТЦ является наиболее чувствительным к внешним воздействиям, что согласуется с нашими данными, полученными на листьях гороха при воздействии хрома и кадмия [21, 22]. Известно, что окисление пластохинола цитохромным  $b_6f$  комплексом является основным звеном в цепи переноса электронов в хлоропластах, которое определяет скорость переноса электронов между ФС II и ФС I. Основным процессом, определяющим скорость окисления  $PQH_2$  цитохромным  $b_6f$  комплексом, является “химическая” стадия реакции, связанная с переносом электрона и протона от  $PQH_2$  к соответствующим акцепторам [33]. Bus-sotti с соавт. [34] предполагают, что в крупномас-

штабных исследованиях общая фотохимическая эффективность может быть представлена двумя независимыми параметрами,  $F_V/F_M$  и I-P фазой, которые представляют эффективность ФС II и ФС I, соответственно. Ранее было показано, что при воздействии озона ( $O_3$ ) на характеристики флуоресценции хлорофилла  $F_V/F_M$  совершенно нечувствителен, по крайней мере, на первых фазах обработки озоном, тогда как наиболее изменчивыми оказались амплитуда фазы I-P и параметр  $RC/CS_0$ , характеризующий количество реакционных центров [35]. В нашем исследовании нарушение электронного транспорта между фотосистемами приводило к снижению общей функциональной активности ( $PI_{total}$ ).

Измерение кинетической кривой MR при 820 нм и ОЖР-кривых с помощью М-РЕА-2 позволило одновременно следить за реакциями, протекающими в фотосистемах. Начальное светоиндуцированное окисление P700 сопровождалось снижением сигнала MR за счет оттока электронов от ФС I, в то время как в кинетике ОЖР приходило последовательное восстановление  $Q_A$ . При этом увеличение сигнала MR и достижение максимального уровня флуоресценции в ОЖР происходило одновременно при 200–300 мс. Параллельное накопление восстановленных форм P700 и  $Q_A$  отражает восстановление переносчиков на всем участке ЭТЦ между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФС I в условиях, когда ферредоксин-НАДФ-редуктаза инактивирована вследствие темновой инкубации [23].

Снижение параметров  $\delta_{Ro}$  и  $\phi_{Ro}$  согласовалось с уменьшением амплитуды MR, характеризующей снижение скорости восстановления P700<sup>+</sup> у деревьев, растущих вдоль МКАД. Полученные данные свидетельствуют о снижении электронного транспорта от ФС II к ФС I. У берез близ МКАД также было выявлено уменьшение скорости окисления P700, тогда как у лип около МКАД этот процесс был мало изменен, о чем свидетельствует схожий характер амплитуд MR деревьев лип из парка и вдоль магистралей. Данные по MR на березах вдоль МКАД согласуются с данными, полученными при воздействии кадмия на реакции P700 растений гороха, у которых выявлено, что при долгосрочном воздействии металла электронный транспорт через ФС I нарушается [22]. Это также свидетельствует о большей чувствительности берез к загрязнениям.

У растений березы вблизи МКАД также отмечалось небольшое снижение интенсивности замедленной флуоресценции при 20–50 мс ( $I_1$ ) и 1 с ( $I_4$ ), которые связаны с формированием электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране [7, 17, 23].

Известно, что изменение параметров флуоресценции хлорофилла растений имеет типичный суточный характер [36], при котором в утренние и вечерние часы в период низкой солнечной активности наблюдаются высокие значения фотосинтетической активности ( $F_V/F_M$ ). В полуденные часы высокая интенсивность солнечного излучения приводит к фотоингибированию фотосинтетического аппарата с депрессией  $F_V/F_M$  [37].

Ранее во многих работах отмечалось, что повышенная освещенность значительно усиливает неблагоприятное воздействие многих факторов, в том числе и загрязнений [27, 38], которые связаны с изменениями на уровне ФС II и снижением  $F_V/F_M$ . В наших опытах по фотоингибированию после выключения интенсивного освещения листья березы и липы из парка показывали обратимое восстановление активности по  $F_V/F_M$ . В тоже время у листьев деревьев вблизи МКАД наблюдалось неполное восстановление после освещения, что свидетельствует о необратимых повреждениях после фотостресса, вызванного светом высокой интенсивности. Степень необратимости у листьев березы была выше, чем у листьев липы. Очевидно, неблагоприятные условия произрастания вблизи МКАД оказывают негативное воздействие на белок-синтетические процессы в листе, что выявляется в появлении необратимых повреждений при фотоокислительном стрессе.

Среди изученных деревьев береза оказалась в большей степени подверженной воздействию загрязнителей на автомобильных магистралях по сравнению с липой. Это проявилось в значительном снижении параметров флуоресценции, связанных с ФС I и межсистемным электронным транспортом.

Таким образом, применение одновременной регистрации кинетик быстрой и замедленной флуоресценции, и модулированного отражения при 820 нм позволило изучить состояние первичных фотохимических реакций фотосинтеза деревьев в различных городских условиях. Использование параметров быстрой и замедленной флуоресценции, в особенности при световом стрессе может быть рекомендовано для оценки функциональной активности фотосинтетического аппарата растений и раннего обнаружения изменений в условиях антропогенной нагрузки, когда экологическая обстановка не является критической. Среди параметров флуоресценции в качестве индикаторов состояния деревьев в городской среде предложены общий индекс производительности ( $PI_{total}$ ) и квантовый выход восстановления акцепторов электрона на акцепторной стороне ФС I ( $\phi_{Ro}$ ).

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-11-00009.

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. Венедиктов П.С., Казимирко Ю.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Погосян С.И., Яковлева О.В., Рубин А.Б. Изучение физиологического состояния древесных растений по характеристикам флуоресценции в коре однолетних побегов деревьев // Экология. 2000. № 5. С. 338.
2. Волгушева А.А., Яковлева О.В., Кукарских Г.П., Ризниченко Г.Ю., Кренделева Т.Е. Использование показателя P1 для оценки физиологического состояния деревьев в городских экосистемах // Биофизика. 2011. Т. 56. С. 105.
3. Fusaro L., Salvatori E., Winkler A., Frezzini M.A., De Santis E., Sagnotti L., Canepari S., Manes F. Urban trees for biomonitoring atmospheric particulate matter: an integrated approach combining plant functional traits, magnetic and chemical properties // Ecol. Indic. 2021. V. 126. P. 107707. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107707>
4. Swoczyna T., Kalaji H.M., Bussotti F., Mojski J., Pollastrini M. Environmental stress - what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1048582>
5. Huaranca Reyes T., Scartazza A., Bretzel F., Di Baccio D., Guglielminetti L., Pini R., Calfapietra C. Urban conditions affect soil characteristics and physiological performance of three evergreen woody species // Plant Physiol. Biochem. 2022. V. 171. P. 169. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.030>
6. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей // Москва—Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2012. 256 с.
7. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Алахвердиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений // Москва—Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2014. 220 с.
8. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an Overview // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. P. 279. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9_11)
9. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. V. 19. P. 321. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9_12)
10. Bąba W., Kompała-Bąba A., Zabochnicka-Świątek M., Luźniak J., Hanczaruk R., Adamski A., Kalaji H.M. Discovering trends in photosynthesis using modern analytical tools: more than 100 reasons to use chlorophyll fluorescence // Photosynthetica. 2019. V. 57. P. 668. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.069>
11. Clark A.J., Landolt W., Bucher J.B., Strasser R.J. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index // Environ. Pollut. 2000. V. 109. P. 501. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00053-1)
12. Adams W.W., Demming-Adams B. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. V. 19. P. 583. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_22](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9_22)
13. Cavender-Bares J., Bazzaz F.A. From leaves to ecosystems: using chlorophyll fluorescence to access photosynthesis and plant function in ecological studies // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. V. 19. P. 737. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_29)
14. Murchie E.H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. Iss. 13. P. 3983. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert08>
15. Lazár D. Modelling of light-induced chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P transient) and changes in 820 nm – transmittance signal of photosynthesis // Photosynthetica. 2009. V. 47. P. 483. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0074-8>
16. Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP // BBA. 2005. V. 1706. P. 250. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.11.006>
17. Oukarroum A., Goltsev V., Strasser R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection // PLoS ONE. 2013. V. 8. P. e59433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059433>
18. Hermans C., Smeyers M., Rodrigues R.M., Eyletter M., Strasser R., Dehaye J.P. Quality assessment of urban's trees: a comparative study of physiological characterization, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP test // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 81. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00917>
19. Prasad M.N.V., Strzałka K. Impact of heavy metals on photosynthesis // Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems / Eds. M.N.V. Prasad and J. Hagemeyer. Springer. 1999. P. 117.
20. Souri Z., Cardoso A.A., da-Silva C.J., de Oliveira L.M., Dari B., Sihi D., Karimi N. Heavy metals and photosynthesis: recent developments // Photosynthesis, productivity and environmental stress / Eds. P. Ahmad et al. 2019. P. 107. <https://doi.org/10.1002/9781119501800.ch7>
21. Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I.B., Kukarskikh G.P., Matorin D.N., Antal T.K. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (*Pisum sativum* L.) //

- Planta. 2020. V. 251. P. 11.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03304-1>
22. *Todorenko D., Volgusheva A., Timofeev N., Kovalenko I., Matorin D., Antal T.* Multiple *in vivo* effects of cadmium on photosynthetic electron transport in pea plants // *Photochem. Photobiol.* 2021. V. 97. P. 1516.  
<https://doi.org/10.1111/php.13469>
  23. *Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V.* Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* // *BBA.* 2010. V. 1797. P. 1313.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.008>
  24. *Shen J., Li X., Zhu X., Ding Z., Huang X., Chen X., Jin S.* Molecular and photosynthetic performance in the yellow leaf mutant of *Torreya grandis* according to transcriptome sequencing, chlorophyll a fluorescence, and modulated 820 nm reflection // *Cells.* 2022. V. 11. P. 431.  
<https://doi.org/10.3390/cells11030431>
  25. *Zivcak M., Olsovska K., Slamka P., Galambošová J., Rataj V., Shao H.B., Brestič M.* Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency // *Plant Soil Environ.* 2014. V. 60 P. 210.  
<https://doi.org/10.17221/73/2014-PSE>
  26. *Murata N., Takabashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I.* Photoinhibition of photosystem II under environmental stress // *BBA.* 2007. V. 1767. P. 414.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.11.019>
  27. *Aro E.-M., Virgin I., Andersson B.* Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover // *BBA.* 1993. V. 1143. P. 113.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90134-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2)
  28. *Chow W.S., Aro E.-M.* Photoinactivation and mechanisms of recovery // *Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase* / Eds. T. Wydrzynski and K. Satoh. Springer. 2005. P. 627.
  29. *Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S.* The sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // *J. Plant Physiol.* 1995. V. 146. P. 609.  
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81922-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81922-X)
  30. *Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Łukasik I., Goltsev V., Laldle R.J.* Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions // *Acta Physiol. Plant.* 2016. V. 38. P. 102.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>
  31. *Paunov M., Koleva L., Vassilev A., Vangronsveld J., Goltsev V.* Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc. Affect chlorophyll fluorescence in Durum wheat // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 787.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
  32. *Орехов Д.И., Яковлева О.В., Горячев С.Н., Протопопов Ф.Ф., Алексеев А.А.* Использование параметров индукции флуоресценции хлорофилла *a* для оценки состояния растений в условиях антропогенной нагрузки // *Биофизика.* 2015. V. 60. № 2. С. 330.
  33. *Устынюк Л.Ю., Тихонов А.Н.* Окисление пластохинола – лимитирующая стадия в цепи переноса электронов в хлоропластах // *Биохимия.* 2022. Т. 87. № 10. С. 1372.  
<https://doi.org/10.31857/S0320972522100049>
  34. *Bussotti F., Gerosa G., Digrado A., Pollastrini M.* Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large scale plant ecological studies // *Ecol. Indic.* 2020. V. 108. P. 105686.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105686>
  35. *Bussotti F., Desotgiu R., Cascio C., Pollastrini M., Gravano E., Gerosa G., Marzuoli R., Nali C., Lorenzini G., Salvatori E., Manes F., Schaub M., Strasser R.J.* Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data // *Environ. Exp. Bot.* 2011. V. 73. P. 19.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.022>
  36. *Zhang S., Gao R.* Diurnal changes of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and stomatal aperture of hybrid poplar clones subjected to midday light stress // *Photosynthetica.* 2000. V. 37. P. 559.  
<https://doi.org/10.1023/A:1007119524389>
  37. *Guo W.D., Guo Y.P., Liu J.R., Mattson N.* Midday depression of photosynthesis is related with carboxylation efficiency decrease and D1 degradation in bayberry (*Myrica rubra*) plants // *Sci. Hortic.* 2009. V. 123. P. 188.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.014>
  38. *Pätsikkä E., Aro E.-M., Tyystjärvi E.* Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity *in vivo* // *Plant Physiol.* 1998. V. 117. P. 619.