



Журналу 70 лет!

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 6, 2024

ОБЗОРЫ

- Участие оксалатов в физиологических процессах у растений: потенциальная роль эндофитных бактерий – оксалотрофов
Р. М. Хайруллин, И. В. Максимов 649
- Влияние наночастиц серебра на физиологию высших растений
А. Г. Хина, Г. В. Лисичкин, Ю. А. Крутяков 666
- Использование явления реювенилизации для получения вегетативного потомства древесных
В. Н. Шамаков, В. И. Бельков, Ю. М. Константинов 697
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Состав жирных кислот липидов высших сосудистых растений арктических тундр Западного Шпицбергена
Е. Ф. Марковская, Н. Ю. Шамакова, А. А. Зорина 711
- Фракционный и жирнокислотный состав липидов фрагментов почек по фазам распускания у растений рода *Betula*
И. В. Морозова, Н. П. Чернобровкина, В. П. Пчёлкин 723
- Сравнительная характеристика состава фенольных соединений *Hedysarum alpinum* L. в интродукции и в каллусной культуре
М. В. Филонова, С. В. Кривошеков, Н. С. Зиннер, Д. А. Исаков, Я. Е. Решетов, А. А. Чуринов, М. В. Белоусов 735
- H⁺-пирофосфатаза вакуолярной мембраны в условиях стресса, вызванного действием ионов свинца
Е. В. Спиридонова, В. В. Гурина, Н. В. Озолина, И. С. Капустина 745
- Влияние обработки семян салициловой кислотой на рост, активность антиоксидантных ферментов и содержание пролина в листьях пшеницы при избыточном уровне цинка во внешней среде
А. А. Игнатенко, И. А. Нилова, Н. М. Казнина, А. Ф. Титов 757
- Фотосинтетическая эффективность использования макроэлементов, воды и света у *Lactuca sativa* (L.) в условиях загрязнения почвы свинцом
Е. Н. Икконен, Н. М. Казнина 767
- Сезонные изменения фотосинтетического пигментного комплекса сфагновых мхов на примере *Sphagnum papillosum* Lindb.
А. К. Штанг, Т. И. Пономарева, Д. А. Шпанов 774
- Влияние вирусной инфекции на кокколитофорииду *Emiliania huxleyi* при разном уровне биогенных элементов в среде
Л. В. Стельмах, Р. Р. Сагадатова, О. С. Алатарцева 785
- Анализ генетической идентичности эмбриогенных клеточных линий *Larix sibirica*
И. Н. Третьякова, Н. В. Орешкова, М. Э. Пак 795

Различия во влиянии легких (La) и тяжелых (Yb) лантаноидов на эффективность фотосинтеза и накопление метаболитов одуванчиком Крым-сагыз (<i>Taraxacum hybernum</i>) В. Н. Воробьев, В. Ю. Горшков, В. В. Терентьев, Б. Р. Исламов, С. Ф. Котов, В. В. Николенко, Т. П. Якушенкова, О. А. Тимофеева	803
Особенности роста и развития пыльцевых трубок ели (<i>Picea abies</i> (L.) Karst. × <i>P. obovata</i> Ledeb.) <i>in vitro</i> М. В. Сурсо	810
Морфофизиологические и биохимические характеристики сарциноидной микроводоросли <i>Chlorosarcinopsis eremi</i> (Chlorophyceae, Chlorophyta) Н. В. Данцюк, И. Н. Чубчикова, А. Д. Темралева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая	820

УДК 581.1

УЧАСТИЕ ОКСАЛАТОВ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ У РАСТЕНИЙ: ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ – ОКСАЛОТРОФОВ

© 2024 г. Р. М. Хайруллин^{а, *}, И. В. Максимов^а

^аИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: krm62@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2024 г.

После доработки 09.08.2024 г.

Принята к публикации 09.08.2024 г.

В обзоре изложены основные функции оксалатов (щавелевой кислоты и ее солей) в физиологических процессах у растений. Рассмотрено участие эндофитных бактерий — оксалотрофов и/или продуцентов щавелевой кислоты в регуляции ответных реакций растений на воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды биотической и абиотической природы. Сделан вывод о перспективах развития нового направления в исследовании роли эндофитных бактерий в формировании оксалат-опосредованного адаптивного потенциала у растений.

Ключевые слова: растения, оксалаты, оксалотрофы, эндофитные бактерии, щавелевая кислота

DOI: 10.31857/S0015330324060011, **EDN:** MAWQVZ

ВВЕДЕНИЕ

Щавелевая кислота (ЩК) — низкомолекулярная органическая кислота (Low Molecular Weight Organic Acids, LMWOA) [1]. Ее содержание исследовано в тканях высших растений не менее 1305 видов из 76 семейств [2], как ксерофитов [3], так и гигрофитов [4]. Среднее количество растворимых оксалатов в кормовых травах может достигать до 30% сухой растительной массы, а концентрация этих веществ может колебаться в течение суток с наименьшим значением в полдень и наибольшим ночью [5]. В некоторых растительных тканях нерастворимые кристаллы оксалатов могут составлять до 80% сухой массы [1]. Исходя из этого можно предположить значимость ЩК в физиологических реакциях растений, в том числе на действие различных факторов среды. Какие же функции могут выполнять ЩК и оксалаты в растениях?

Можно выделить шесть основных функций ЩК и оксалатов в растениях: регуляция уровня кальция, регуляция ионного гомеостаза, детоксикация тяжелых металлов, защита от поедания млекопитающими и насекомыми [6] и фитопатогенов [7]. Интересно, что шестая функция — участие в фотосинтетических процессах предполагалась еще в 1908 г. [8], но подтвердилась лишь спустя почти 100 лет [5].

ФУНКЦИИ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И ОКСАЛАТОВ В РАСТЕНИЯХ

Регуляция уровня свободного/связанного кальция и ионного гомеостаза. Известно, что оксалат кальция нерастворим в воде и в растениях часто находится в виде кристаллов, размеры и количество которых могут варьировать в мезофилле листьев при изменении концентрации ионов кальция в окружающей среде, исчезать в растительных тканях при дефиците этого элемента или активном росте растений [9]. Формирование кристаллов оксалата кальция и лишение мобильности Ca^{2+} и их участия в физиолого-биохимических процессах в растительных клетках таким образом зависит, в том числе, от уровня ЩК в тканях. Роль же самого кальция в растениях настолько многообразна, а “ответственность” его ионов за многие биохимические реакции в клетках так высока, что оксалаты кальция можно рассматривать как стратегическое депо этого элемента в организме [10].

Ионный гомеостаз играет ключевую роль в таких физиологических функциях растительных клеток, как компенсация отрицательных зарядов макромолекул, поддержание электро-нейтральности и тургора [11]. Прямым доказательством возможного участия ЩК в ионном гомеостазе через связывание кальция и превращение его в нерастворимую форму служит,

Сокращения: ЩК — щавелевая кислота.

например, стимуляция кальцием поглощения растениями K^+ и NH_4^+ [12]. Кальций способен также регулировать поступление азота в форме различных ионов, в то же время минеральные соединения азота могут влиять на уровень свободного кальция в растительных тканях [13]. Механизмы поглощения $NaCl$ растениями также обсуждаются вместе с ролью кальция в этих процессах [14]. С концентрацией ионов кальция, как в окружающей корни растений среде, так и внутри растительных тканей связан также гомеостаз фосфатов [11]. Перевод фосфат-иона в подвижную форму возможен через взаимодействие ЩК с фосфатами свинца или алюминия и формирование оксалатов этих катионов [15]. Связывая нитраты и другие анионы, поступающие в растения, ионы кальция могут регулировать концентрацию ионов водорода (рН) в компартментах растительных тканей. Концентрация самой свободной ЩК также способна определять кислотность клеточного сока. Таким образом, при обсуждении роли этой кислоты в ионном гомеостазе растений приходим к выводу и о **роли ЩК в минеральном питании растений** с участием соединений азота, фосфора и калия.

ЩК, связывая кальций, способна влиять на уровень свободных его ионов, как вторичного мессенджера в различных сигнальных путях в растительной клетке, например, через регуляцию кальцием уровня оксида азота [16]. Принимая во внимание участие Ca^{2+} в регуляции в растительной клетке уровня фитогормонов ИУК и АБК [17, 18] и связанных с ними физиологических процессов, ЩК, как регулятор количества подвижных Ca^{2+} , может также оказывать влияние на фитогормональный баланс.

ЩК как антиоксидант. ЩК может связывать физиологически значимые катионы, например, меди [19], являющиеся активным центром растительных полифенолоксидаз [20]. Хелатирование Cu^{2+} и удаление его из активного центра белка может привести к падению активности полифенолоксидазы в растительных тканях. Поэтому ЩК рассматривается как селективный ингибитор указанного фермента и как природный антиоксидант. Например, обработка плодов груш раствором ЩК в концентрации 12 мМ поддерживала на протяжении 70 дней хранения активность в них супероксиддисмутазы и способствовала большому содержанию общих фенолов и аскорбиновой кислоты, по сравнению с контрольными необработанными плодами. Погружение листьев рукколы перед хранением в раствор ЩК с концентрацией 1 мМ уменьшало распад хлорофилла и способствовало более длительному сохранению у продукта товарного вида [21].

Окисление ЩК как источник активных форм кислорода. ЩК может не только положительно влиять на антиоксидантную активность в расте-

ниях, но и участвовать в реакции образования АФК благодаря наличию в растениях фермента оксалаксоксидазы, окисляющего молекулу кислоты с образованием углекислого газа и пероксида водорода. Одним из первых растений, в тканях которого выявили активность оксалаксоксидазы, был ячмень [22]. Затем было установлено, что подобную активность проявляет маркерный белок прорастания семян пшеницы, названный гермином, обнаруженный впоследствии в семенах и проростках большинства других злаков: кукурузы, овса, риса, ржи [23]. Гермин-подобные белки встречаются также у двудольных и голосеменных растений, у миксомицетов, причем белки этого семейства не обязательно проявляют способность окислять ЩК, но, подобно оксалаксоксидазам однодольных, их гены экспрессируются в ответ на внедрение фитопатогенов, повреждение насекомыми, воздействие $NaCl$, ауксинов, АФК [24], АБК, салициловой кислоты, вирусов [25].

Анализ аминокислотной последовательности и трехмерной структуры белков, сходных с гермином пшеницы, имеющим общую последовательность из девяти аминокислот со стрессовым белком сферулином, вырабатываемым слизевиком *Physarum polycephalum* во время голодания, позволил объединить гермин и гермин-подобные белки в суперсемейство купинов (cupin), включающее не менее 18 функциональных субклассов белков [26]. Эта группа белков обладает не только оксалаксоксидазной и оксалаксодекарбоксоксилазной, но и диоксигеназной активностями [26].

Участие ЩК в процессе фотосинтеза. Идею об участии ЩК в процессе фотосинтеза высказал немецкий исследователь Р. Schürhoff [8] в 1908 г., отметив, что кристаллы оксалата связаны с тонким слоем фотосинтетической ткани в листьях пеперомии (*Peperomia*). Позже, в 1978 г. Ю.С. Карпилов с соавт. [27] предположили, что образующиеся друзы кальциевых солей ЩК могут использоваться как источник CO_2 в периоды, когда водно-температурный стресс вызывает закрытие устьиц. Однако эту идею авторы экспериментально не подтвердили. В 2001 г. Franceschi [28] предположил участие друз оксалата кальция в фотосинтезе, изучив расположение кристаллов в листьях растений шести различных видов. Предполагалось, что кристаллы могут помочь рассеять лишний свет во время периодических солнечных бликов, отражая их обратно к эпидермальной (window) ткани. Вывод об адаптивной роли кристаллов оксалата кальция в фотосинтезе *Peperomia glabella* на основе экспериментальной работы сделали Kuo-Huang с соавт. [29]. Авторы выявили изменения в положении кристаллов в клетках палисадной ткани листа в зависимости от интенсивности освеще-

ния. Предполагалось, что кристаллы в средней или нижней частях клеток при слабом освещении помогают распределить ограниченный свет на хлоропласты к нижней половине палисадной ткани и увеличивать захват квантов света; при высоких уровнях освещенности кристаллы в верхней части палисадных ячеек могут рассеивать лишний свет, отражая часть его обратно на эпидермальную ткань, тем самым защищая хлоропласты от фотоповреждения и минимизируя фотоингибирование.

В 2016 г. вышла экспериментальная работа [5], в которой авторы, используя показатель изотопного состава углерода PDB, сделали вывод, что образование кристаллов внутри специализированных клеток может рассматриваться как биохимический механизм, накапливающий углерод в форме оксалата кальция главным образом в ночное время, когда устьица закрыты и реакции фотосинтеза отсутствуют. В течение дня распад кристаллов обеспечивает растение дополнительным углеродом для фотосинтетической ассимиляции, особенно в условиях углеродного голодания, например, при водном стрессе. Так как стрессовым сигналом тревоги могла быть АБК, авторы этот новый путь фотосинтеза назвали “тревожным” или “аварийным” (alarm photosynthesis), который может функционировать у растений многих видов, независимо от пути восстановления CO_2 (C_3 , C_4 или CAM).

Фиксация атмосферного азота. Trinchant и Rigaud [30] предположили, что в условиях водного стресса у бобовых в холобионтной системе (не только для растений, но и для азотфиксирующих бактерий – симбионтов) ШК может выступать в роли осморегулятора, а также как источник углерода для фиксации атмосферного азота.

Kost с соавт. [31] протестировали 58 штаммов 41 вида *Burkholderia* на их способность использовать оксалат в качестве единственного источника углерода и наличие связи между способностью азотфиксаторов колонизировать растения и их оксалотрофией. Все штаммы *Burkholderia* sp., принадлежащие к “кластеру полезных для растений” (plant-beneficial-environmental (PBE) *Burkholderia* cluster) [32], были оксалотрофны, за исключением *B. phenazinum*. Ни один из фитопатогенных штаммов бактерий этого рода (*B. glumae*, *B. plantarii*, *B. gladioli*, *B. cepacia*) не культивировался на среде с оксалатом, как единственным источником углерода. Чтобы оценить роль оксалотрофии в колонизации растений, ген оксалатдекарбоксилазы (ОХС) был искусственно инактивирован у эндофитной бактерии *B. phytofirmans* PsJN, что привело к значительному ухудшению ее способности колонизировать корни люпина и кукурузы, по сравнению с диким типом. При инокуляции в консорциуме с диким типом у мутантных кле-

ток *B. phytofirmans* PsJNΔохс восстанавливалась способность к колонизации корней [31]. Соответственно, можно полагать, что бактериальные оксалатдекарбоксилазы вовлечены в систему формирования мутуалистических взаимоотношений растений с бактериями.

Интересно, что и у азотфиксирующих эндофитных штаммов бактерий (*B. cereus/thuringiensis*, *B. megaterium* и *B. safensis/pumilus*), выделенных из растений рода *Oxalis*, специфичных для одного из регионов Южной Африки, была выявлена оксалотрофия [33].

Участие ШК и гермин-подобных белков в других физиологических процессах. Растительная оксалатоксидаза активно включается в строительство клеточных стенок зерна пшеницы в стадии его молочной спелости, а также при прорастании семян, когда рост клеток примордий корней завершается протрузией корешков через покровные ткани [34], что свидетельствует об участии ШК в этих процессах. Оксалатоксидаза локализуется в области колеоризы, способствуя продукции H_2O_2 , которая в свою очередь участвует в механическом укреплении колеоризной ткани при протрузии корешков.

Кристаллы оксалата кальция могут способствовать выходу пыльцы из пыльников и ее прорастанию [35]. В пыльниках перца чили (*Capsicum annuum*) множество кристаллов сосредоточено в соединительной ткани и в гиподерме стомиума между прилегающими локулами. Предполагается, что ионы кальция систематически удаляются из цитоплазмы и клеточных стенок соединительной ткани и стомиума и включаются в кристаллы оксалата при созревании пыльцы. Это приводит к деградации и ослаблению клеточных стенок между локулами, за которыми следует разрушение соединительной ткани и стомиума, а затем слияние соседних локул. В пыльнике петунии (*Petunia hybrida*) кристаллы оксалата кальция скапливаются под стомиумом и прилипают к пыцевым зернам [35]. Они перемещаются к рыльцу вместе с пыцевыми зернами, когда пыльник расслаивается и пыцевые зерна освобождаются. На рыльце петунии увеличение концентрации кальция происходит не из-за активности соответствующих процессов в самом рыльце, а из-за кристаллов оксалата, прилипших к пыцевым зернам. Такие кристаллы оксалата кальция вокруг пыльцы могут усиливать опыление, обеспечивая этим элементом прорастание пыльцы и рост трубочек.

Показано, что гермин-подобные белки ассоциированы с такими специфическими стадиями развития, как соматический и зиготический эмбриогенез, индукция цветения, созревание плодов, развитие семян и созревание древесной ткани [34]. В большинстве случаев участие гермин-подобных белков в указанных процессах

связано с формированием и/или укреплением клеточных структур и/или лигнификацией тканей. Согласно цитируемым авторам, экспрессия генов гермин-подобных белков горчицы (*Sinapis alba*), ипомеи нил (*Pharbitis nil*) и ячменя связаны также с суточными ритмами этих растений [5]. У ячменя минимум экспрессии гена *HvGLP1* наблюдается в конце светового дня, максимум – ночью. Можно полагать, что такой ритм объясняется ролью ЩК как депо CO_2 , о чем было сказано выше [5].

Участие оксалатов в защите растений от повреждения млекопитающими и насекомыми. Предположение, что оксалаты могут защищать растения от поедания млекопитающими и насекомыми было высказано еще в 1900-х годах, однако уже в то время подвергалось сомнениям, так как считалось, что кристаллы “не способны ранить животных или отпугнуть их” [36]. Неблагоприятное воздействие оксалатов, в первую очередь кальция, на млекопитающих можно рассматривать с двух сторон: как токсичное, и как раздражающее. Известно, что в организме животных растворимые оксалаты способны вызывать нефропатию и даже остановку работы почек из-за повреждения эпителия почечных канальцев нерастворимыми оксалатами кальция и/или магния, вызывая гипокальциемию, гипомagneмию, образование мочевых камней [37]. Токсичность оксалатов для животных и отравление их солями ЩК считается возможными только при длительном и/или обильном поедании растений богатых оксалатами, и только в случае, если кормовая база животных ограничена такими растениями [38]. Также спорной является возможность раздражающего и отпугивающего действия на насекомых игольчатых (рафидных) кристаллов оксалатов и друз.

По мнению Paiva [6], примеры пагубного воздействия оксалатов кальция на жизнедеятельность насекомых редки. Автор рассматривает защитную функцию оксалатов не с позиции биохимической инсектицидности или токсичности, а механического воздействия кристаллов на перитрофический матрикс кишечника, как абразива, способного повреждать мембраны клеток насекомых. Перитрофический матрикс кишечника у одних насекомых может образовываться большинством клеток кишки, а у других специализированными клетками кардиального отдела передней кишки. Он рассматривается и как механический, и как физиологический барьеры с избирательной проницаемостью, предохраняющие кишечный эпителий от повреждений частицами пищи, позволяющие избежать контакта пищевого комочка с эпителием средней кишки, а также защищающие нежные эпителиальные микроворсинки от истирания частицами пищи [39]. Paiva [6] считает, что кристаллы оксала-

тов не вредны для слизистой оболочки кишечника насекомых, так как отсутствуют видимые повреждения у личинок чешуекрылых и других насекомых, питающихся тканями растений с кристаллами оксалата кальция, а насекомые успешно проходят свои жизненные циклы. Этот вывод подтверждается сообщением [40], согласно которому личинки гусениц *Spodoptera exigua*, питающихся растениями *Medicago truncatula*, содержащими кристаллы оксалата кальция, не имели повреждений кишечника.

На наш взгляд, эти данные позволяют прийти к двоякому выводу. С одной стороны, перитрофический матрикс защищает кишечник насекомых, так что кристаллы оксалатов не влияют на фитофагов. С другой стороны, наличие матрикса свидетельствует о необходимости защиты кишечника от абразивного действия твердых частиц, которыми могут быть, в том числе, рафиды или друзы. Второй вывод согласуется с мнением Paiva [6] о способности кристаллов оксалата кальция играть определенную роль в устойчивости растений к фитофагам, вопрос же заключается в оценке степени эффективности этой защиты. Вместе с тем этот же автор обращает внимание не на кристаллические оксалаты, а на саму ЩК и ее растворимые соли как на потенциальных факторов, формирующих устойчивость растений к насекомым. В подтверждение такого мнения можно привести сведения [41], что ЩК ингибировала рост *Helicoverpa armigera*, причем это было вызвано не антифидантным действием кислоты, а, по мнению авторов, как антибиотика.

На наш взгляд, наличие перитрофического матрикса, защищающего кишечник насекомых от абразивного действия твердых частиц, позволяет заключить, что рафиды или друзы оксалатов в растительных тканях все же могут неблагоприятно влиять на питание фитофагов.

Участие ЩК в ответных реакциях растений на абиотический стресс. В связи с формированием нерастворимых и, соответственно, биохимически неактивных комплексов с ионами различных металлов особый интерес представляют данные о роли ЩК в устойчивости растений к токсическому воздействию различных неорганических поллютантов [42]. Используя трансформированные растения табака с геном изоформы гермина пшеницы и анализируя активность оксалатоксидазы Nowakowska [43] выявила активацию оксалатоксидазы и, таким образом, возможность вовлечения ЩК в ответные реакции растительного организма при действии NaCl и солей тяжелых металлов (Cd , Hg , Cu , Ni , Co). При этом воздействие салициловой кислоты, а также гипертермия, холодовой шок, ультрафиолетовое облучение не вызывали активацию фермента. Автор предположила, что образующийся при

окислении оксалаатоксидазой пероксид водорода может служить сигналом для запуска реакций устойчивости растений к токсикантам.

Ионы Mg являются активным центром хлорофилла и активаторами более 300 ферментов [44]. Образование кристаллов оксалата магния может играть роль в регуляции метаболических концентраций этого элемента в растениях, влияя таким образом на протекание определенных биохимических реакций [45]. Быстрое поступление ионов алюминия в цитозоль и его более сильное сродство к связыванию с АТФ при меньшем значении pH может изменять концентрацию свободных ионов Mg и влиять на Mg-зависимые процессы внутри клетки [44]. Связывание же ионов алюминия ЩК может предотвращать их токсическое действие на растения [44].

Несмотря на общепринятое мнение о возможном формировании ЩК нерастворимых соединений с токсичными ионами металлов, Jauregui-Zuniga с соавт. [46] выявили, что при добавлении солей цинка и свинца в питательную среду уменьшалось количество кристаллов оксалата кальция в растениях фасоли (*Phaseolus vulgaris*), но при этом тяжелые металлы не были обнаружены внутри формирующихся кристаллов оксалата. Исследователи предположили, что кристаллы кальция не играют основной роли в детоксикации тяжелых металлов у *Ph. vulgaris*.

Роль ЩК во взаимоотношениях растений с фитопатогенами. Роль ЩК во взаимоотношениях растений с фитопатогенами можно рассматривать с двух позиций: как первоисточника пероксида водорода, запускающего с помощью оксалаатоксидазы защитные реакции растительных клеток, либо как фактора вирулентности у определенных фитопатогенных грибов — продуцентов ЩК. В любом из этих случаев мы вынуждены рассматривать не только роль самой кислоты, но и ферментов, участвующих в превращении ее в другие метаболиты, преимущественно, в пероксид водорода.

Известно, что некоторые фитопатогенные грибы, например, *Sclerotinia sclerotiorum* синтезируют значительные количества ЩК, уровень которых коррелировал со способностью патогенного грибка инфицировать ткани растений [47]. Такую функцию ЩК у фитопатогенов авторы объясняют возможностью ее участия в распаде пектина клеточных стенок растений активацией полигалактуроназы, снижением уровня pH растительных тканей и устойчивости кальций-пектиновых комплексов к деструкции, ингибированием растительной полифенолоксидазы и уменьшением количества окисленных защитных фенолов. С использованием двух изолятов гриба *S. sclerotiorum*, различающихся по уровню продукции ЩК, было показано, что ограничение способности изолята B24-ML к продукции

ЩК приводит к потере вирулентности. По мере усиления тяжести заболевания в зараженных тканях растений концентрация ЩК увеличивалась, а pH и активность полифенолоксидазы уменьшались [47].

Обработка плодов груши раствором ЩК в концентрации 12 мМ продлевала срок их хранения [20], что по мнению авторов было связано с хелатированием ионов меди и подавлением активности полифенолоксидазы. В то же время внедрение продуцирующих ЩК патогенов в ткани зрелых плодов одновременно с деактивацией полифенолоксидазы может вызывать активацию полигалактуроназы [47]. Вместе с большим количеством накопленных в плодах сахаров или крахмала — пищи для микроорганизмов, выделяющих различные гидролазы, заражение плодов грибами — продуцентами ЩК должно приводить к быстрой их порче, что, как правило, и наблюдается в отношении такой продукции.

Cessna с соавт. [48], исследуя роль ЩК при вызванном грибом *S. sclerotiorum* патогенезе растений сои и подсолнечника, выявили, что увеличение уровня кислоты подавляет продукцию H_2O_2 и последующий за этим окислительный взрыв в клетках. При этом механизм подавления не был связан с подкислением среды или связыванием кислотой ионов Ca^{2+} , способных выступать в роли вторичных сигнальных мессенджеров и компонентов укрепления клеточных стенок, и включался до стадии, предшествующей каталитической редукции молекулы O_2 . Таким образом, определенные фитопатогенные грибы, выделяя ЩК, могут не только вызывать деструкцию клеточных стенок растений, активируя полигалактуроназу, подкисляя среду и связывая ионы кальция, но и отключать их защитные сигнальные системы с участием АФК.

Патогенез растений бобов, вызванный грибом *S. sclerotiorum*, включает также дисфункцию устьичных клеток листа [49]. Оказалось, что ЩК в физиологической для гриба концентрации вызывает открытие устьиц в темноте, тем самым облегчает патогену колонизацию тканей листьев. Механизмы дисфункций устьичных клеток включают поглощение ионов калия, участвующих в осмосенсорной регуляции и тургоре замыкающих клеток, а также деградацию крахмала, приводящую к образованию низкомолекулярных сахаров, обеспечивающих дополнительную осмотическое давление для тургора клеток. В дополнении к действию ЩК темнота/синий свет также вызывают потерю крахмала в хлоропластах клеток, а снижение кислотой уровня pH и удаление из клеточных стенок ионов кальция облегчают действие эндополигалактуроназы и пектинметилэстеразы, что приводит к разрыхлению пектина и деструкции клеточных стенок, дополнительно способствуя развитию патогенеза.

Еще одним негативным фактором ЩК гриба, подавляющим устойчивость растений, является нивелирование действия фитогормона АБК, отвечающего за закрытие устьиц у растений [49].

ЩК может существенно влиять на исход взаимоотношений растение-патоген в пользу последнего посредством связывания ионов магния, участвующих в таких генеральных процессах, как фотосинтез и других. Например, многочисленные ромбические кристаллы оксалата магния были обнаружены на нижней поверхности 3-недельных кофейных листьев, поврежденных грибом *Mycena citricolor*, вызывающим пятнистость [50]. Авторы предположили, что кристаллы оксалата магния, которые отсутствовали в здоровых растениях, образовывались в инфицированной ткани листьев в результате связывания магния ЩК, продуцируемой грибом.

Очевидно, что активация оксалакисады растений или, например, эндофитных бактерий, что обсуждается далее, может повышать устойчивость хозяина к фитопатогенам-продуцентам ЩК. Dumas с соавт. [7] выявили активацию оксалакисады в листьях ячменя при заражении грибом *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* и сделали вывод о возможной защитной роли этого фермента при патогенезе. Предполагалось [51], что пероксид водорода, образующийся при окислении ЩК оксалакисадой, может служить сигнальной молекулой для запуска защитных реакций, а также участвовать в лигнификации клеточных стенок или непосредственно подавлять развитие патогена. Возможность вовлечения ЩК с участием оксалакисады в механизмы укрепления клеточных стенок показали Thordal-Christensen с соавт. [52], выявив непосредственную локализацию H_2O_2 в зоне формирования папилл в листьях, инфицированных *E. graminis*. Таким образом, ЩК, синтезируемая самим растением или определенным фитопатогеном, при окислении ее растительной оксалакисадой до H_2O_2 может быть первоисточником сигнальных молекул АФК, а также участвовать в защитных механизмах растений, например, в укреплении клеточных стенок на пути проникновения патогенов с участием ферментов, вовлеченных в лигнификацию.

Наиболее убедительным доказательством защитной роли оксалакисады, кодируемой геном гермина пшеницы *gf-2.8*, является работа Donaldson с соавт. [53], в которой были получены трансгенные растения сои, экспрессирующие белок массой 130 кД, аналогичный гермину зародышей пшеницы и проявляющий оксалакисадную активность. В сравнении с дикими растениями трансформанты проявляли большую устойчивость к грибу *S. sclerotiorum*.

Роль ЩК в деструкции древесины грибами. Продуцентами ЩК являются также грибы, вызывающие бурую и белую гниль древесины, как, например, *Fomitopsis palustris*, *Aspergillus niger* и *A. fumigatus* [54]. По мнению исследователей, ЩК, вырабатываемая грибом, гидролизует гемицеллюлозу, нарушая ее каркас и увеличивая пористость древесины, повышая доступность субстратов для гидролитических ферментов гриба и облегчая проникновение его гиф [55]. В то же время H_2O_2 , образующаяся при разложении ЩК, с участием ионов железа способна запускать реакцию Фентона, продуцирующую различные формы АФК и неблагоприятно действующую на гриб-деструктор. Вместе с тем формирование оксалата железа может защищать гифы гриба от действия указанной реакции, также как и гиперпродукция ЩК грибом может ингибировать продукцию АФК, защищая гриб от их нежелательного воздействия.

Другой путь деполимеризации лигнинового каркаса древесины связан с активностью Mn-пероксидазы грибов, например, *Ceriporiopsis subvermispora*, вызывающих белую гниль [56]. *C. subvermispora* продуцирует глиоксилат и оксалат, которые окисляются Mn(II)-пероксидазой до H_2O_2 . Показано, что экстраклеточная ЩК может служить источником H_2O_2 , необходимой для активности Mn-пероксидазы.

Роль ЩК в глобальной экологии. Формирование кристаллов оксалата кальция и магния приводит к биоминерализации — образованию твердых неорганических веществ в живых организмах. В отличие от большинства растительных соединений углерода, которые при отмирании растений распадаются с выделением углекислого газа обратно в атмосферу, значительный объем углерода в виде кристаллов оксалата кальция, например, как в тканях дерева ироко (*Milicia excelsa*) или кактуса карнегии гигантской (*Carnegiea gigantea*) могут попадать в окружающую среду в засушливых и полупустынных регионах Земли [35]. Превращаясь в твердый карбонат кальция по оксалатно-карбонатному пути оксалат таким образом способен связывать атмосферный углекислый газ с почвой в виде неорганического углерода, поэтому знания о биоминерализации углерода в растениях могут помочь смягчению нежелательного парникового эффекта в условиях глобального потепления и изменения климата.

ЩК, продуцируемая грибами *Hebeloma velutipes*, *Piloderma byssinum*, *Paxillus involutus*, *Rhizopogon roseolus*, *Suillus bovinus*, *S. variegatus*, а также сапротрофами *Hypholoma fasciculare*, *H. capnoides* [57] способна играть роль в биовыветривании горных пород и минералов. Образование оксалатов может привести к мобилизации металлов из таких твердых субстратов, благодаря ацидолизу

и образованию подвижного комплекса оксалата с их ионами. Простые и сложные оксалаты образуют большинство ионов металлов, а также актиниды и лантаноиды [58].

Осаждение оксалата кальция оказывает существенное влияние на биогеохимические процессы в почвах, выступая в качестве резервуара кальция, а также меняя доступность фосфатов, когда ионы этого металла удаляются из фосфорсодержащих минералов [59]. Другим освобождающимся ЩК анионом может быть сульфат (гипса), что приводит к формированию оксалата кальция и доступности серы для растений [60].

В геосфере образование оксалата кальция может способствовать цементированию ранее существовавших известняков благодаря заполнению пор перекристаллизованным кальцитом. При этом в регуляции грибами потока оксалата кальция в природе ключевую роль играют также и оксалотрофные бактерии [61]. Биоминерализация углерода и создание в почве, окружающей корни растений, т. н. “оксалатного бассейна” возможны при совместном функционировании грибов – продуцентов ЩК и оксалотрофных бактерий, обладающих оксалакислородной и оксалакислородной активностями [62]. В связи с этим исследование взаимоотношений грибов-продуцентов ЩК и оксалотрофных бактерий для познания механизмов биогеохимических циклов представляет фундаментальный и практический интерес.

Оксалотрофные бактерии внутри растений. Выше отмечалось о распространенности оксалатов в тканях растений не менее 1305 видов [2] и содержании этих веществ в растительных тканях до 80% от сухой массы [1]. Таким образом, “оксалатный бассейн” [62] может формироваться не только в ризосфере, но и внутри растений. Следует признать, что внутренний “бассейн” ЩК даже небольшого количества, являясь источником сигнальных молекул АФК, благодаря активности оксалакислородной самого растения или эндофитов, населяющих его внутренние ткани, может сыграть принципиальную роль в определении в растительном организме глобальных физиологических процессов, формирующих его адаптивный потенциал.

Ферментные системы растений, преобразующие ЩК в H_2O_2 , довольно детально определены, учитывая результаты исследований белков класса герминов (оксалакислородной). Кроме растительных герминов, деструкция ЩК внутри растительных тканей может осуществляться оксалакислородными и оксалакислородными некоторыми эндофитными бактериями. Принимая во внимание множественную физиологическую активность ЩК по отношению к растениям, можно прийти к выводу о наличии множества мишеней – физиологических процессов у расте-

ний, на которые способны оказать воздействие эндофиты – деструкторы ЩК.

Jooste с соавт. [33] из внутренних тканей растений рода *Oxalis* выделили девять эндофитов, семь из которых обладали оксалотрофными свойствами, в том числе бациллы *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. vallismortis*, а также *Azospirillum brasilense*, *Methylobacterium oxalidis*, *Serratia fonticola*. Сообщается [63] о способности бактерии *Burkholderia phytofirmans* PsJN к оксалотрофии благодаря наличию гена *OXC*, кодирующего синтез оксалакислородной. Способность утилизировать оксалат корневых экссудатов растений, который может быть токсичным для бактерий, неспособных его усваивать, некоторые авторы [64] считают одним из признаков симбиотических видов *Paraburkholderia*.

Используя метод амплификации фрагментов генов *FRC* (formyl-CoA transferase) и *OXC* (oxalyl-CoA decarboxylase), Ghate с соавт. [65] выявили оксалотрофность бактерий, выделенных из эндосферы листьев растений таро (*Colocasia esculenta*) – *Acinetobacter calcoaceticus* MW784829, *Acinetobacter* sp. MW784830, *Enterobacter* sp. MW784831, а также из листьев ремуэтии (*Remusatia vivipara*) – *Acinetobacter baylyi* MW784832, *Pseudomonas* sp. MW784833, *Pectobacterium carotovorum* MW784834, *Enterobacter* sp. MW784835. Перечисленные бактерии могли расти на среде с оксалатом калия в качестве единственного источника углерода. Carper с соавт. [66] исследовали популяцию эндофитных бактерий в растениях сосны *Pinus flexilis* и выявили в надземной части проростков высокую частоту встречаемости представителей семейств *Oxalobacteraceae* (56%) и *Burkholderiaceae* (10%). Авторы считают, что такое превалирование оксалотрофных бактерий может быть связано с содержанием ЩК в проростках и использованием ее микроорганизмами в качестве источника углерода, а также для привлечения полезных для растений представителей сложных бактериальных сообществ.

Согласно DeLeon-Rodriguez с соавт. [67], оксалотрофные бактерии принадлежат, преимущественно, к семействам *Methylobacteriaceae* и *Oxalobacteraceae*. По данным Ofek с соавт. [68], представители *Massilia* sp. (сем. *Oxalobacteraceae*) ассоциированы с растениями винограда, картофеля, огурца, могут встречаться внутри тканей растений и других видов. Кроме того, бактерии этого вида способны колонизировать гифы микоризных грибов. Kumar и Belur [69] из клубней таро (*Colocasia esculenta*) изолировали штамм бактерии *Ochrobactrum intermedium* CL6 с высокой оксалакислородной активностью. Клетки росли на среде с оксалатом натрия, но для индукции активности фермента были необходимы ионы

марганца. Из внутренних тканей растений кукурузы выделен штамм *Ochrobactrum pseudogrignonense* CNPMS2088, у которого выявлен ген оксаладекарбоксилазы [70]. Кроме бактерий указанного вида в этих же растениях кукурузы носителями гомологичного гена были эндофиты *Pantoea ananatis* UFMG54, *Microbacterium* sp. UFMG61 и *B. megaterium* UFMG50 [70].

На основе приведенных данных о способности эндофитов к деструкции ЩК, благодаря наличию активности оксалаатоксидазы с образованием не только молекул АФК, но и CO_2 , открываются новые пути регуляции бактериями физиологических процессов у растений.

ВОЗМОЖНОСТЬ РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У РАСТЕНИЙ ЭНДОФИТАМИ – ДЕСТРУКТОРАМИ ЩК

Пути деструкции ЩК. Оксалат разрушается тремя основными различающимися путями.

Первый путь, как было показано выше, связан с окислением ЩК растительной оксалаатоксидазой (гермином) с образованием двух молекул CO_2 и одной молекулы H_2O_2 :

$(\text{COOH})_2 + \text{O}_2$ оксалаатоксидаза $2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ [7]. Ферменты с подобной активностью обнаружены также и у грибов, например, *Tilletia contraversa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Abortiporus biennis* [71].

Второй путь включает прямое декарбоксилирование молекулы ЩК с участием оксалаатдекарбоксилазы, приводящий к выделению одной молекулы CO_2 и одной молекулы муравьиной кислоты: $(\text{COOH})_2$ оксалаатдекарбоксилаза $\text{CO}_2 + \text{НСООН}$ [72].

Декарбоксилирование ЩК характерно для ряда видов грибов, например, *Collybia velutipes*, *Coriolus hersutus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus niger*, а также бактерий (*Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Burkholderia pseudomallei*) [72]. Показано, что оксалаатдекарбоксилаза YvrK *Bacillus subtilis* – марганец-зависимый фермент, обладает активностью оксалаатоксидазы [73].

Третий путь превращения кислоты – многоэтапный процесс с первоначальной активацией ЩК кофермент А(КоА)-трансферазой до оксалил-КоА (рис. 1). Подробные исследования свойств *Pseudomonas oxalaticus*, *Bacillus halophilus* и *Oxalobacter formigenes* позволили сделать вывод, что деградация оксалатов бактериями в основном опосредована тиаминзависимым ферментом оксалил-КоА-декарбоксилазой [74].

У оксалотрофных бактерий оксалат может использоваться аэробами и анаэробами для получения энергии различными путями (рис. 2). В обоих случаях оксалат вначале активируется КоА-трансферазой до оксалил-КоА, который с помощью оксалил-КоА-декарбоксилазы де-

карбоксилируется до формил-КоА. КоА-группа удаляется формил-КоА-трансферазой, оставляя формат. Следующий шаг зависит от того, является ли микроорганизм аэробом или анаэробом. У аэробных бактерий формат катаболизируется до CO_2 форматдегидрогеназой, образуя НАДН. У анаэробов используется антипортер оксалат:формат, оксалат поступает в клетку по мере экспорта формата, обеспечивая постоянный приток оксалата для декарбоксилирования в формат. Несмотря на то, что два варианта форматного пути в значительной степени различны, сообщалось, что анаэробная грамотрицательная бактерия *Methylobacterium extorquens*, обладает как оксалат-форматным антипортером, так и форматдегидрогеназой [75].

Предложен альтернативный аэробный катаболизм оксалатов по гликолатному пути, при котором оксалат преобразуется в глиоксилат оксалил-КоА-редуктазой для последующего синтеза углеводов через образование трифосфоглицерата [76]. Гликолатный путь был выявлен у бактерий *Ralstonia oxalatica* (*Pseudomonas oxalaticus*), *R. eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), *Starkeya novella* (*Thiobacillus novellus*), *Oxalobacter formigenes* и *Oxalicibacterium flavum* [77]. Глиоксилат может включаться также в одноименный цикл, т. н. модифицированную форму цикла трикарбоновых кислот.

Еще один путь катаболизма ЩК установлен у актинобактерии семейства Kribbellaceae, который включает образование серина и глицина с участием тетрагидрофолата [78]. Предполагается, что при этом может генерироваться энергия, поскольку при превращении серина в глицин образуется метильная группа, которая переходит в тетрагидрофолат. Всего же в катаболические пути превращения оксалата в различные соединения могут быть вовлечены не менее 28 ферментов с образованием C1–C4 промежуточных или конечных продуктов [75].

Активность оксалил-КоА-декарбоксилазы также была обнаружена у *Neurospora crassa*, *Torula utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, растений пшеницы, тыквы, гороха и фасоли [79].

У растений деструкция оксалата ацелированием происходит с участием четырех ферментов. Первоначально оксалил-КоА-синтетазой оксалат превращается в оксалил-КоА:

$\text{АТФ} + \text{CoA} + \text{оксалат}$ оксалил-КоА-синтетаза $\text{AMP} + \text{дифосфат} + \text{оксалил-КоА}$ [80].

Оксалил-КоА-синтетаза (oxalyl-CoA synthetase, КФ 6.2.1.8; оксалил-КоА-лигаза, ацилактивирующий фермент 3 (acyl activating enzyme 3, ААЕ3)) – АТФ-зависимый фермент, катализирующий связывание оксалата с КоА, образуя оксалил-КоА (рис. 3). Он обнаружен в растениях *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Vigna umbellata*, *Oryza sativa*, *Glycine soja*, а также

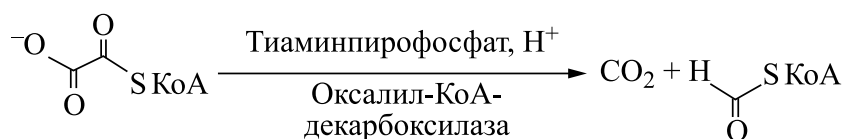


Рис. 1. Схема декарбоксилирования щавелевой кислоты оксалил-КоА-декарбоксилазой с образованием углекислого газа и формил-КоА (по [75]).

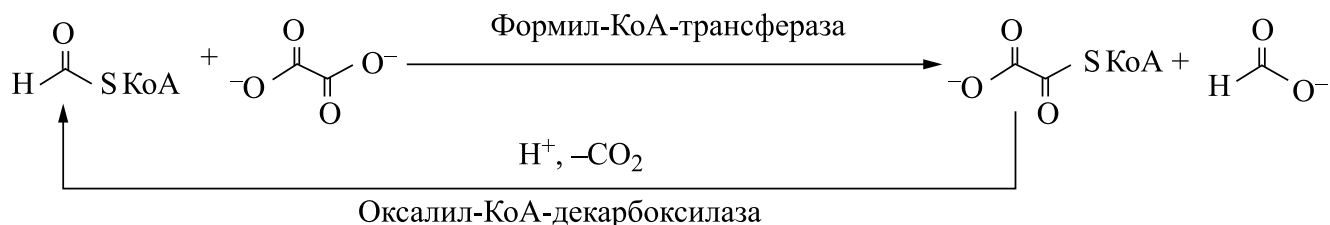


Рис. 2. Схема ферментативного пути превращения щавелевой кислоты бактерией *Oxalobacter formigenes* в углекислый газ и формиат (по [75]).

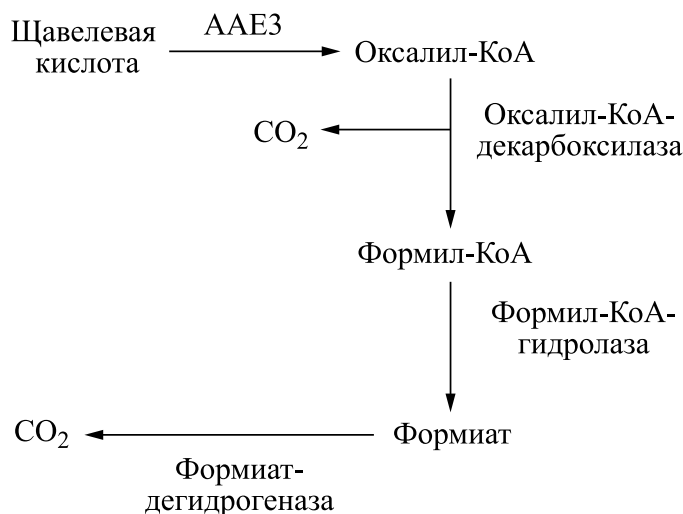


Рис. 3. Схема деградации щавелевой кислоты в растениях арабидопсиса (по [80]).

в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [80]. Затем оксалил-КоА превращается в формил-КоА и углекислый газ оксалил-КоА-декарбоксилазой. Формил-КоА превращается в формиат формил-КоА-гидролазой. На завершающем этапе формиат превращается в углекислый газ и воду формиатдегидрогеназой [81].

Эндофитные деструкторы ЩК и устойчивость растений к патогенам. Зная физиологическую активность ЩК по отношению к растениям, можно предположить участие оксалатдекарбоксилазы и оксалатоксидазы эндофитных бактерий в регуляции определенных биохимических

реакций у растений. Известно, что у некоторых фитопатогенных грибов, например, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* [54], *Monilophthora perniciosa* [82] ЩК является одним из факторов вирулентности. Очевидно, деструкция ЩК растительной оксалатоксидазой или ферментом эндофитных бактерий должна способствовать проявлению устойчивости растений к указанным фитопатогенам. Marina с соавт. [83] из ризосферы растений томата выделили два оксалотрофных штамма *Stenotrophomonas* sp., которые были способны эндофитно колонизировать растения арабидопсиса и защищать их

от повреждений, вызванных высокими дозами ЩК, а также от фитопатогенов *S. sclerotiorum* и *B. cinerea*. Устойчивость к грибам сопровождалась индуцированным эндофитами отложением каллозы в клеточных стенках растений томата, экспрессией гена белка PR-1, связанного с патогенезом, а также с продукцией фенольных соединений.

Аналогичную способность уменьшать вредоносность фитопатогенов, продуцирующих ЩК, проявляют также не только эндофитные, но и ризосферные и почвенные оксалотрофные бактерии. Schoonbeek с соавт. [84] оценивали потенциал выделенных из почвы микробов, разрушающих оксалаты, в защите растений огурца, томата и винограда от грибов *B. cinerea* и *S. sclerotiorum*. Было выявлено четыре штамма бактерий, способных до 70% уменьшать симптомы поражения на листьях указанных растений. Наибольшую защитную активность проявили оксалотрофные изоляты *Cupriavidus campinensis*, *C. necator* и *C. oxalaticus*.

С поверхности ягод клубники был выделен оксалотрофный изолят бактерии *Pseudomonas abietaniphila* ODB36 [85]. С использованием патосистемы *Botrytis-Arabidopsis* у этой бактерии обнаружена способность защищать растения от фитопатогена. Геном бактерии содержал ген формил-КоА-трансферазы, отвечающей за деструкцию оксалата. Мутантный по этому гену штамм не защищал растения от инфекции, вызванной грибом *B. cinerea*, возбудителем серой гнили.

С целью поиска биологических методов защиты растений винограда от фитопатогена *Lasiodiplodia theobromae*, вызывающего поражение сосудистых тканей, Saucedo-Bazalar с соавт. [86], используя масс-спектрометрию MALDI, провели поиск противогрибковых молекул эндофитных бактерий *Bacillus velezensis* M1 и *B. amyloliquefaciens* M2, выделенных из виноградной лозы. В качестве противогрибковых веществ, наряду с антибиотиками бактерий фенгицином, итурином и сурфактином, авторы указали также оксалатдекарбоксилазу.

Yu с соавт. [87] среди органических кислот культуральной жидкости *Bacillus cereus* AR156 идентифицировали ЩК и показали, что она может вызывать запрограммированную гибель клеток растений томатов в зоне инфицирования при патогенезе, вызванном *Botrytis cinerea*. Оксалат значительно уменьшал степень поражения растений, вызванного грибом, существенно не подавляя его рост *in vitro*. ЩК, продуцируемая бактериями *Bacillus* sp. в небольших концентрациях, предотвращала гибель растительных клеток, вызванную высокими концентрациями этой кислоты. Предварительная обработка растений ЩК в концентрации 0.08 мкМ приводила к накоплению антиоксидантных ферментов в листьях

томатов и экспрессии генов, связанных с защитой от фитопатогена. Активация экспрессии генов находилась под контролем жасмоновой кислоты, но не салициловой. Авторы пришли к заключению, что ЩК, продуцируемая бактериями *Bacillus* spp., действует как ассоциированный с микроорганизмом молекулярный паттерн (microbe-associated molecular pattern, MAMP), индуцирующий системную устойчивость через жасмонат-этиленовый сигнальные пути.

Деструкторы ЩК и фотосинтез. Можно полагать, что углекислый газ, образующийся при деструкции оксалата бактериальной оксалатдекарбоксилазой или оксалил-КоА-декарбоксилазой способен вовлекаться в процесс фотосинтеза. Исследования оксалотрофных эндофитных бактерий в этом направлении не проводились, однако косвенные факты могут свидетельствовать об этом. Так, Tufail с соавт. [88], анализируя роль эндофитных штаммов бактерий в устойчивости растений к засухе, сделали вывод, что инокуляция клетками бактерий в условиях водного дефицита значительно увеличила концентрацию хлорофилла *a* (на 22%), хлорофилла *b* (на 19%), общее содержание хлорофилла (на 31%), скорость фотосинтеза (на 76%), относительное содержание воды (на 20%) и площадь листьев (на 94%) по сравнению с контрольными образцами, не заселенными эндофитами, а также по сравнению с действием эндофитных грибов. В значительном количестве экспериментов при инокуляции растений эндофитными бактериями в условиях стресса от засухи наблюдалось существенное увеличение показателя сухой биомассы. В связи с приведенными данными представляет интерес исследование влияния эндофитных оксалотрофов на фотосинтетические процессы растений-хозяев и возможность использования ими углерода ЩК в процессе фотосинтеза.

Эндофитные деструкторы ЩК и минеральное питание растений. Особый интерес представляет влияние деструкторов ЩК — эндофитов на минеральное питание растений. Используя метагеномный подход для изучения разнообразия и функций эпифитных бактериальных сообществ, связанных с подводными макрофитами, Wang с соавт. [89] показали, что бактерии семейства Oxalobacteraceae активно вовлекались в процессы ассимиляции и транспорта нитратов, а также контроля минерализации органических фосфатов. Выявлено, что флавоноидзависимые оксалобактерии (Oxalobacteraceae) способствовали развитию боковых корней растений кукурузы в бедной азотом почве, его усвоению и в конечном итоге росту растений при дефиците этого элемента питания [90]. При этом оксалобактерии не продуцировали ауксины и стимуляция роста корней, как авторы полагают, не была связана с активностью этого фитогормона.

Исследование влияния дефицита воды на активность редукции ацетилена корнями бобов (*Vicia faba* L.) с клубеньками, сформированными инокуляцией клетками трех штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* выявила, что редукция сопровождалась в цитозоле клубеньков уменьшением концентрации оксалата на 55%, при этом одновременно наблюдалась стимуляция бактериодной оксалактоксидазы [30]. Инкубация бактериодов с оксалатом способствовала редукции ацетилена. Авторы сделали вывод, что оксалат, присутствующий в высокой концентрации в клубеньках растения, может играть роль дополнительного субстрата для бактериодов, замедляя активность фиксации азота, вызванную водным дефицитом.

Sahin [77] из корней кислицы козьей (*Oxalis pes-caprae* L.) выделил азотфиксирующую оксалактоксилирующую бактерию, идентифицированную как *Azospirillum*, близкую, согласно анализу 16S рДНК, к бактериям *Azospirillum brasilense*, *A. doebereineriae* и *A. lipoferum*. Из измельченных черешков растений *Rumex* sp. Lang с соавт. [91] выделили граммотрицательную, подвижную, не образующую спор бактерию штамма NS12T, генетически наиболее близко связанную с видами *Azorhizobium doebereineriae* и *A. caulinodans*. На основе генетического, морфологического и биохимического сравнительных анализов авторы предложили отнести изолят к новому виду оксалотрофной бактерии *A. oxalatophilum* sp. nov.

Очевидно, что деструкция ЩК оксалотрофами должна уменьшать подвижность фосфатов, например, кальция, так как освобождение фосфат-иона без связывания кислотой кальция невозможно. Продукция же ЩК эндофитами должна способствовать доступности минеральных форм фосфора. Несмотря на то, что нет данных о влиянии оксалотрофов и продуцентов ЩК на подвижность фосфатов, имеются сведения о фосфатмобилизующей активности бактерий видов, среди представителей которых распространены деструкторы и/или продуценты этой кислоты [92].

Оценивая способность эндофитных бактерий разрушать или продуцировать ЩК во взаимосвязи с минеральным питанием растений, следует отметить, что свойства таких эндофитов влиять на обмен азота или фосфора в растительном организме можно предположить только исходя из способности их расти *in vitro* на специфических безазотистых средах или содержащих нерастворимые фосфаты. Данные же о непосредственном влиянии оксалотрофных эндофитов или продуцентов ЩК на поступление соединений азота или фосфора в растительные ткани и метаболизм таких веществ внутри растительного организма отсутствуют, что открывает одно

из новых направлений в исследованиях указанных бактерий.

Выше было отмечено, что ряд видов грибов, в том числе и патогенных, обладает способностью синтезировать ЩК, используя этот метаболит в качестве фактора вирулентности [87]. Обнаружено, что и микоризные грибы, формирующие эффективные симбиозы с растениями, синтезируют ЩК [93] и используют ее в качестве мобилизатора фосфора. Эндомикоризные грибы – продуценты ЩК и оксалотрофные бактерии-эндофиты могут одновременно проникать во внутрь корней растений и конкурировать за эту нишу. Эндофитные бактерии при наличии у них оксалактоксидазной активности способны уменьшать концентрацию ЩК в растительных тканях, а образующийся при этом пероксид водорода может приводить к защитным реакциям растительного организма, блокирующим микоризное инфицирование. Результат микоризно-бактериальной конкуренции является интригующим и вызывает интерес к изучению взаимоотношений эндофитных эндомикоризных продуцентов ЩК и оксалотрофных бактерий.

Эндофитные бактерии-продуценты ЩК и их роль во взаимоотношениях с растениями. В растениях ЩК образуется из глиоксилата, гликолята, оксалоацетата или аскорбата в процессе фотодыхания и глиоксилатного цикла [80]. Однако существует высокая вероятность того, что ее продуцентами могут быть также и бактерии, ассоциированные с растениями. Например, показано, что дитазотрофный азотфиксатор *Burkholderia* spp. UENF114111 в значительном количестве выделяет в среду ЩК [92]. На наш взгляд, выявление таких микроорганизмов и исследование их свойств представляет практический интерес. С целью выяснения механизмов поиска грибов, с которыми бактерии *Paraburkholderia terrae* вступают в ассоциацию, была проведена оценка роли ЩК как молекулы хемотаксиса микробов к грибам, а также как потенциального источника углерода [94]. Все изученные штаммы *P. terrae* проявляли хемотаксис на действие ЩК, при этом больший эффект проявлялся при низких концентрациях кислоты (0.1%) в сравнении с высокими. Эти же бактерии *P. terrae* проявляли также направленный хемотаксис по отношению к экссудатам штаммов почвенных грибов *Lyophyllum* sp. Karsten и *Trichoderma asperellum* 302, в метаболитах которых была выявлена ЩК. Авторы сделали вывод, что ЩК, продуцируемая грибами, возможно, в первую очередь действует для бактерий *P. terrae* как сигнальная молекула хемотаксиса.

Исследование длительного воздействия ЩК на состав почвенных бактериальных сообществ показало, что, начиная с седьмого дня, в образцах, обработанных ЩК, преобладают бактерии, принадлежащие к таксонам

Burkholderiales и *Oxalobacteraceae* [95]. Авторы предположили, что представители микроорганизмов этих видов могут быть вовлечены в минерализацию ЩК и играть потенциально важную роль в плодородии почвы, так как в эти семейства входят многочисленные эффективные солибилизаторы фосфора и стимуляторы роста растений.

Kirkland с соавт. [96] выявили, что кратковременная обработка надосадочной жидкостью культуральной среды энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* вызывала смертность у клещей нескольких видов, в том числе у взрослых особей *Amblyomma americanum* (L.), *A. maculatum* Koch и *Ixodes scapularis* Say. Анализ супернатанта методом ВЭЖХ выявил наличие оксалата в культуральной жидкости в качестве одного из основных активных ингредиентов с акарицидной активностью. Не исключено, что подобный защитный эффект против клещей могут проявлять и бактерии – продуценты ЩК.

Одной из функций ЩК для эндофитов может быть усиление сидерофорной активности. Например, введение ЩК в среду культивирования эндофитной бактерии *Serratia marcescens* AL2-16 было более эффективно для продукции сидерофоров этим эндофитом, в сравнении с культивированием на среде с яблочной или янтарной кислотой [97].

В связи с представленными данными возникают вопросы: может ли ЩК выступать сигналом хемотаксиса и для эндофитных бактерий, и как выращивание растений на среде, обогащенной оксалатами, или непосредственная обработка растений кислотой влияют на видовую и количественную структуру эндофитного микробиома? Практический интерес вызывает также изучение влияния инокуляции растений оксалотрофными эндофитными бактериями или продуцентами ЩК на популяционный состав микроорганизмов в различных растительных тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основное практическое направление современных исследований свойств эндофитных бактерий связано, преимущественно, с последующим использованием наиболее эффективных штаммов в качестве основных компонентов биологических средств защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенов и вредных насекомых, а также стимуляторов роста и устойчивости растений к различным неблагоприятным факторам окружающей среды [97].

Механизмы защиты растений эндофитами от фитопатогенов включают продукцию бактериями антибиотиков, ферментов – деструкторов клеточных стенок грибов, а также синтез веществ, индуцирующих локальную или систем-

ную устойчивость растений [98]. Стимуляция роста растений эндофитами определяется в том числе продукцией бактериями соответствующих фитогормонов, либо индуцированным симбионтом запуском их синтеза самими растениями. Анализ указанных свойств эндофитов посвящен не один десяток обзорных научных статей. Экспериментальные же работы посвящены поиску новых антагонистических или стимулирующих рост растений эндофитов, поиску новых микробных антибиотиков и регуляторов физиологических реакций их хозяев.

Потребительские свойства эндофитов определяются не только областью их использования, но защищенностью от воздействия различных факторов, способных неблагоприятно влиять на численность и видовую структуру их популяции, либо на хозяйственно полезные качества самих растений, так как ниша обитания таких микроорганизмов находится внутри растительного организма.

В последние десятилетия отчетливо выдвинулось направление исследований не отдельных эндофитов внутри различных тканей растений, а фитомикробиома в целом [99]. Основываясь на выявлении некультивируемых эндофитов и прогрессом в области ДНК-диагностики микроорганизмов, обсуждая генетический аспект эндофитности, можно утверждать об исследованиях внутрирастительного микробиологического генома (микробиогенома), рассматривая эндофитов как набор микробных геномов, локализованных внутри органов растений (“microbial genomes located inside plant organs”) [99].

Мы уверены, что вместе с этим направлением впоследствии будет развиваться также и изучение метаболической активности эндофитов, связанной не только с продукцией антибиотических и стимулирующих рост растений веществ, индукторов синтеза защитных растительных соединений и фитогормонов, но и “обычных” тривиальных соединений, к которым можно отнести ЩК. Подобно тому как незначительные малые изменения метеорологических факторов могут привести к катастрофе (“эффект бабочки”) [100], незначительные концентрации в растительных тканях тривиальных, на первый взгляд, веществ, или невысокая активность определенных ферментов могут определять глобальные физиологические процессы всего органа или целого растения. В качестве примера можно привести результаты экспериментов [87], в которых ЩК, продуцируемая бактериями *Bacillus* sp. в низких концентрациях ингибировала гибель растительных клеток, вызванную высокими концентрациями этой кислоты, хемотаксис бактерий *Paraburkholderia terrae* к грибам развивался быстрее и сильнее при низких концентрациях ЩК в сравнении с высокими [94].

Анализ результатов исследований влияния ЩК на физиологические процессы у растений свидетельствует, что это соединение может выполнять несколько различных функций. Очевидно, что деструкция ЩК может препятствовать проявлению этим соединением указанных выше функций, при этом в ее катаболизме способны принимать участие не только собственные растительные ферменты, но и эндофитов. Изменяя количество ЩК в тканях растений и способствуя модификации в них уровня определенных молекул, например, АФК, оксалотрофные эндофиты или продуценты ЩК способны включаться в регуляцию уровня свободного/связанного кальция, ионного гомеостаза, фитогормонов, а также процессы минерального питания, кальций-зависимого сигналинга, фотосинтеза, фиксации атмосферного азота, строительства клеточных стенок на различных стадиях онтогенеза, созревания и прорастания пылевых зерен, соматического и зиготического эмбриогенеза, созревания плодов и древесной ткани, участвовать в индукции цветения, защите от повреждения млекопитающими и насекомыми, устойчивости растений к фитопатогенам и абиотическим стресс-факторам окружающей среды, в изменении уровня окислителей/антиоксидантов в растительных тканях.

Мы не претендуем на открытие нового направления в изучении эндофитных бактерий, но лишь ставим вопросы, способны ли оксалотрофные эндофиты или продуценты щавелевой кислоты, используя это вещество, регулировать указанные процессы и какими биохимическими путями.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122041400162-3.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palmieri F., Estoppey A., House G.L., Lohberger A., Bindschedler S., Chain P.S.G., Junier P. Oxalic acid, a molecule at the crossroads of bacterial-fungal interactions // *Adv. Appl. Microbiol.* 2019. V. 106. P. 49. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.10.001>
2. Lawrie N.S., Cuetos N.M., Sini F., Salam G.A., Ding H., Vancolet A., Nelson J.M., Erkens R.H.J., Perversi G. Systematic review on raphide morphotype calcium oxalate crystals in angiosperms // *AoB Plants*. 2023. V. 15: plad031. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plad031>
3. Hartl W.P., Klapper H., Barbier B., Ensikat H.J., Dronskowski R., Müller P., Ostendorp G., Tye A., Bauer R., Barthlott W. Diversity of calcium oxalate crystals in *Cactaceae* // *Can. J. Bot.* 2007. V. 85. P. 501. <https://doi.org/10.1139/B07-046>
4. Ronzhina D.A., Ivanov L.A., Lambers G., P'yankov V.I. Changes in chemical composition of hydrophyte leaves during adaptation to aquatic environment // *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 355. <https://doi.org/10.1134/S102144370903008X>
5. Tooulakou G., Giannopoulos A., Nikolopoulos D., Bresta P., Dotsika E., Orkoulas M.G., Kontoyannis C.G., Fasseas C., Liakopoulos G., Klapa M.I., Karabourniotis G. Alarm photosynthesis: calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in plants // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 2577. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00111>
6. Paiva E.A.S. Do calcium oxalate crystals protect against herbivory? // *Sci. Nat.* 2021. V. 108: 24. <https://doi.org/10.1007/s00114-021-01735-z>
7. Dumas B., Freyssinet C., Pallett K.E. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings // *Plant Physiol.* 1995. V. 107. P. 1091. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1091>
8. Schürhoff P. Ozellen und Lichtkondensoren bei einigen *Peperomia* // *Biohefte Bot. Zentralblatt*. 1908. V. 23. P. 14.
9. Nakata P.A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants // *Plant Sci.* 2003. V. 164. P. 901. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00120-1)
10. Швартай В.В., Вирыч П.А., Маковейчук Т.И., Артеменко А.Ю. Кальций в растительных клетках // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія*. 2014. V. 22. P. 19. <https://doi.org/10.15421/011403>
11. Mulet J.M., Campos F., Yenush L. Editorial: ion homeostasis in plant stress and development // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11: 618273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618273>
12. Fenn L.B., Hasanein B., Burks C.M. Calcium-ammonium effects on growth and yield of small grains // *Agronomy J.* 1995. V. 87. P. 1041. <https://doi.org/10.2134/agronj1995.0002196200870060002x>
13. Glyn'ko A.K. Signaling systems of rhizobia (Rhizobiaceae) and leguminous plants (Fabaceae) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. P. 494. <https://doi.org/10.1134/S0003683815050063>
14. Li J., Yang Y. How do plants maintain pH and ion homeostasis under saline-alkali stress? // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14: 1217193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1217193>
15. Li P., Liu C., Luo Y., Shi H., Li Q., PinChu C., Li X., Yang J., Fan W. Oxalate in plants: metabolism, function, regulation, and application // *J. Agric. Food Chem.* 2022. V. 70. P. 16037. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04787>
16. Tian X., He M., Wang Z., Zhang J., Song Y., He Z., Dong Y. Application of nitric oxide and calcium nitrate enhances tolerance of wheat seedlings to salt stress // *Plant Growth Regul.* 2015. V. 77. P. 343. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0069-3>

17. Elliott D.C. Calcium involvement in plant hormone action // Molecular and cellular aspects of calcium in plant development / Ed. A.J. Trewavas. Plenum Press. 1986. P. 285.
18. Poovaiah B.W., Veluthambi K. The role of calcium and calmodulin in hormone action in plants: importance of protein phosphorylation, molecular and cellular aspects of calcium in plant development / Ed. A.J. Trewavas. Plenum Press. 1986. P. 83.
19. Leitenmaier B., Küpper H. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants // Front. Plant Sci. 2013. V. 4: 374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00374>
20. Adhikary T., Gill P.P.S., Jawandha S.K., Kaur N., Sinha A. Exogenous application of oxalic acid improves the storage quality of Asian pears (Patharnakh) by regulating physiological and biochemical changes // Acta Physiol. Plant. 2024. V. 46: 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03624-6>
21. Erbas D. Effect of oxalic acid treatments and modified atmosphere packaging on the quality attributes of rocket leaves during different storage temperatures // Hortic. 2023. V. 9. P. 718. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060718>
22. Chiriboga J. Purification and properties of oxalic acid oxidase // Arch. Bioch. Bioph. 1966. V. 116. P. 516. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(66\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(66)90057-9)
23. Lane B.G., Dunwell J.M., Rag J.A., Schmitt M.R., Cumin A.C. Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 12239. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31377-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31377-2)
24. Lu M., Han Y.P., Gao J.G., Wang X.J., Li W.B. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean // BMC Genom. 2010. V. 11: 620. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-620>
25. Wang T., Chen X., Zhu F., Li H., Li L., Yang Q., Chi X., Yu Sh., Liang X. Characterization of peanut germin-like proteins, AhGLPs in plant development and defense // PLoS One. 2013. V. 8: e61722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061722>
26. Dunwell J.M., Purvis A., Khuri S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? // Phytochem. 2004. V. 65. P. 7. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.08.016>
27. Карпилов Ю.С., Кузьмин А.Н., Биль К.Я. Распределение ферментов гликолиза в ассимиляционных тканях листьев С4-растений и их связь с особенностями реакций фотосинтеза и фотодыхания // Физиология растений. 1978. Т. 25. С. 1120.
28. Franceschi V. Calcium oxalate in plants // Trends Plant Sci. 2001. V. 6. P. 331. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02014-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02014-3)
29. Kuo-Huang L.L., Ku M.S.B., Franceschi V.R. Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shade adapted *Peperomia glabella* // Bot. Stud. 2007. V. 48. P. 155.
30. Trinchant J.C., Rigaud J. Bacteroid oxalate oxidase and soluble oxalate in nodules of faba beans (*Vicia faba* L.) submitted to water restricted conditions: possible involvement in nitrogen fixation // J. Exp. Bot. 1996. V. 4. P. 1865. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.12.1865>
31. Kost T., Stopnisek N., Agnoli K., Eberl L., Weisskopf L. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated *Burkholderia* species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans* // Front. Microbiol. 2014. V. 4. P. 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00421>
32. Suarez-Moreno Z.R., Caballero-Mellado J., Coutinho B.G., Mendonca-Previato L., James E.K., Venturi V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia* // Microb. Ecol. 2012. V. 63. P. 249. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9929-1>
33. Jooste M., Roets F., Midgley G.F., Oberlander K.C., Dreyer L.L. Nitrogen-fixing bacteria and *Oxalis* – evidence for a vertically inherited bacterial symbiosis // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. P. 441. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2049-7>
34. Patnaik D., Khurana P. Germins and germin-like proteins: an overview // Indian J. Exp. Biol. 2001. V. 39. P. 191. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01285-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01285-2)
35. He H., Veneklaas E.J., Kuo J., Lambers H. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants // Trends Plant Sci. 2014. V. 19. P. 166. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.002>
36. Schneider A. The probable function of calcium oxalate crystals in plants // Bot. Gaz. 1901. V. 32. P. 142.
37. Naude T.W., Naidoo V. Oxalates-containing plants // Veterinary toxicology: basic and clinical principles / Ed. R.C. Gupta. Elsevier. 2007. P. 880.
38. Gwaltney-Brant S.M. Oxalate-containing plants // Small animal toxicology / Eds. M.E. Peterson, P.A. Talcott. Elsevier. 2013. P. 725. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0717-1.00068-5>
39. Grigorieva L.A., Amosova L.I. Peculiarities of the peritrophic matrix in the midgut of tick females of the genus ixodes (*Acarina: Ixodidae*) // Parazitologiya. 2004. V. 38. P. 3. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.032>
40. Park S., Doege S.J., Nakata P.A., Korth K.L. *Medicago truncatula*-derived calcium oxalate crystals have a negative impact on chewing insect performance via their physical properties // Entomol. Exp. Appl. 2009. V. 131. P. 208. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00846.x>
41. Yoshida M., Cowgill S.E., Wightman J.A. Mechanism of resistance to *Helicoverpa armigera* (*Lepidoptera, Noctuidae*) in chickpea: role of oxalic acid in leaf exudate as an antibiotic factor // J. Econ. Entomol. 1995. V. 88. P. 1783. <https://doi.org/10.1093/jee/88.6.1783>
42. Prasad P., Shivay Y.S. Oxalic acid/oxalates in plants: from self-defence to phytoremediation // Curr. Sci. V. 112. P. 1665. <https://doi.org/10.18520/cs/v112/i08/1665-1667>
43. Nowakowska J. Gene expression and oxalate oxidase activity of two germin isoforms induced

- by stress // *Acta Physiol. Plant.* 1998. V. 20. P. 19. <https://doi.org/10.1007/s11738-998-0039-8>
44. Bose J., Babourina O., Rengel Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 2251. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq456>
 45. He H., Bleby T.M., Veneklaas E.J., Lambers H., Kuo J. Precipitation of calcium, magnesium, strontium and barium in tissues of four *Acacia* species (*Leguminosae: Mimosoideae*) // *PLoS One.* 2012. V. 7: e41563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041563>
 46. Jauregui-Zuniga D., Ferrer M.A., Calderon A.A., Munoz R., Moreno A. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris* // *J. Plant Physiol.* 2005. V. 162. P. 1183. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.03.002>
 47. Magro P., Marciano P., Di Lenna P. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1984. V. 24. P. 9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01234.x>
 48. Cessna S.G., Sears V.E., Dickman M.B., Low P.S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 2191. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2191>
 49. Guimaraes R.L., Stotz H.U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 3703. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049650>
 50. Rao D.V. Occurrence of magnesium oxalate crystals on lesions incited by *Mycena citricolor* on coffee // *Phytopathology.* 1989. V. 79. P. 783. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-783>
 51. Zhang Z., Collinge D.B., Thordal-Christensen H. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 139. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08010139.x>
 52. Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction // *Plant J.* 1997. V. 11. P. 1187. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x>
 53. Donaldson P.A., Anderson T., Lane B.G., Davidson A.L., Simmonds D.H. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001. V. 59. P. 297. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0369>
 54. Han Y., Joosten H.J., Niu W., Zhao Z., Mariano P.S., McCalman M., van Kan J., Schaap P.J., Dunaway-Mariano D. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 9581. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608961200>
 55. Watanabe T., Shitan N., Suzuki S., Umezawa T., Shimada M., Yazaki K., Hattori T. Oxalate efflux transporter from the brown rot fungus *Fomitopsis palustris* // *Appl. Env. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 7683. <https://doi.org/10.1128/AEM.00829-10>
 56. Urzua U., Kersten P.J., Vicuna R. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by produces extracellular hydrogen peroxide // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 68. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.68-73.1998>
 57. Johansson E.M., Fransson P.M.A., Finlay R.D., van Hees P.A.W. Quantitative analysis of exudates from soil-living basidiomycetes in pure culture as a response to lead, cadmium and arsenic stress // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. P. 2225. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.04.016>
 58. Gadd G.M., Bahri-Esfahani J., Li Q., Rhee Y.J., Wei Z., Fomina M., Liang X. Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation // *Fungal Biol. Rev.* 2014. V. 28. P. 36. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.05.001>
 59. Cromack J.K., Solkins P., Graustein W.C., Speidel K., Todd A.W., Spycher G., Li C.Y., Todd R.L. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crissum* // *Soil Biol. Bioch.* 1979. V. 11. P. 463. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(79\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(79)90003-8)
 60. Gharieb M.M., Sayer J.A., Gadd G.M. Solubilization of natural gypsum (CaSO₄×2H₂O) and the formation of calcium oxalate by *Aspergillus niger* and *Serpula himantoides* // *Mycol. Res.* 1998. V. 102. P. 825. <https://doi.org/10.1017/S0953756297005510>
 61. Verrecchia E.P., Braissant O., Cailleau G. The oxalate-carbonate pathway in soil carbon storage: the role of fungi and oxalotrophic bacteria // *Fungi in Biogeochemical Cycles*. Chapter 12 / Ed. G.M. Gadd. Cambridge University Press. 2006. P. 289. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511550522.013>
 62. Cailleau G., Braissant O., Verrecchia E.P. Turning sunlight into stone: the oxalate-carbonate pathway in a tropical tree ecosystem // *Biogeosciences*. 2011. V. 8. P. 1077. <https://doi.org/10.5194/bgd-8-1077-2011>
 63. Sessitsch A., Coenye T., Sturz A.V., Vandamme P., Barka E.A., Salles J.F., Van Elsas J.D., Faure D., Reiter B., Glick B.R., Wang-Pruski G., Nowak J. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1187. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>
 64. Belles-Sancho P., Beukes C., James E.K., Pessi G. Nitrogen-fixing symbiotic *Paraburkholderia* species: current knowledge and future perspectives // *Nitrogen*. 2023. V. 4: 135. <https://doi.org/10.3390/nitrogen4010010>
 65. Ghatge S.D., Shastry R.P., Rekha P.D. Rapid detection of oxalotrophic endophytic bacteria by colony PCR from *Colocasia esculenta* and *Remusatia vivipara* // *Ecol. Genet. Genom.* 2021. V. 21: 100102. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2021.100102>
 66. Carper D.L., Carrell A.A., Kueppers L.M., Frank A.C. Bacterial endophyte communities in *Pinus flexilis* are

- structured by host age, tissue type, and environmental factors // *Plant Soil*. 2018. V. 428. P. 335. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3682-x>
67. DeLeon-Rodriguez N., Lathemb T.L., Rodriguez-R.L.M., Barazesh J.M., Anderson B.E., Beyersdorf A.J., Ziemba L.D., Bergin M., Nenes A., Konstantinidis K.T. Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 2575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212089110>
 68. Ofek M., Hadar Y., Minz D. Ecology of root colonizing *Massilia* (Oxalobacteraceae) // *PLoS One*. 2012. V. 7: e40117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040117>
 69. Kumar K., Belur P.D. Production of oxalate oxidase from endophytic *Ochrobactrum intermedium* CL6 // *J. Pure Appl. Microbiol.* 2018. V. 12. P. 2327. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.75>
 70. Silva U.S., Cuadros-Orellana S., Silva D.R.C., Freitas-Junior L.F., Fernandes A.C., Leite L.R., Oliveira C.A., Dos Santos V.L. Genomic and phenotypic insights into the potential of rock phosphate solubilizing bacteria to promote millet growth *in vivo* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11: 574550. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574550>
 71. Graz M., Rachwal K., Zan R., Jarosz-Wilkolazka A. Oxalic acid degradation by a novel fungal oxalate oxidase from *Abortiporus biennis* // *Acta Bioch. Polonica*. 2016. V. 63. P. 595. http://dx.doi.org/10.18388/abp.2016_1282
 72. Don Cowan A., Babenko D., Bird R., Botha A., Breecker D.O., Clarke C.E., Francis M.L., Gallagher T., Lebre P.H., Nel T., Potts A.J., Trindade M., Van Zyl L. Oxalate and oxalotrophy: an environmental perspective // *Sustainable Microbiol.* 2024. V. 1: qvad004. <https://doi.org/10.1093/sumbio/qvad004>
 73. Tanner A., Bowater L., Fairhurst S.A., Bornemann S. Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity: overexpression and characterization of *Bacillus subtilis* YvrK and YoaN // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 43627. <https://doi.org/10.1074/jbc.m107202200>
 74. Svedruzic D., Jonsson S., Toyota C.G., Reinhardt L.A., Ricagnoc S., Lindqvist Y., Richards N.G. The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. V. 433. P. 176. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.032>
 75. Schneider K., Skovran E., Vorholta J.A. Oxalyl-coenzyme a reduction to glyoxylate is the preferred route of oxalate assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1 // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 3144. <https://doi.org/10.1128/jb.00288-12>
 76. Ensign S.A. Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 61. P. 274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05247.x>
 77. Sahin N. Isolation and characterization of a diazotrophic, oxalate-oxidizing bacterium from sour grass (*Oxalis pes-caprae* L.) // *Res. Microbiol.* 2005. V. 156. P. 452. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.009>
 78. Robertson C.F.M., Meyers P.R. Oxalate utilisation is widespread in the actinobacterial genus *Kribbella* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2022. V. 45: 126373. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126373>
 79. Kumar V., Irfan M., Datta A. Manipulation of oxalate metabolism in plants for improving food quality and productivity // *Phytochem.* 2019. V. 158. P. 103. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.029>
 80. Goldsmith M., Barad S., Peleg Y., Albeck S., Dym O., Brandis A., Mehlman T., Reich Z. The identification and characterization of an oxalyl-CoA synthetase from grass pea (*Lathyrus sativus* L.) // *RSC Chem. Biol.* 2022. V. 3. P. 320. <https://doi.org/10.1039/D1CB00202C>
 81. Foster J., Kim H.U., Nakata P.A., Browse J. A previously unknown oxalyl-CoA synthetase is important for oxalate catabolism in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096032>
 82. Da Silva L.F., Dias C.V., Cidade L.C., Mendes J.S., Pirovani C.P., Alvim F.C., Pereira G.A., Aragão F.J., Cascardo J.C., Costa M.G. Expression of an oxalate decarboxylase impairs the necrotic effect induced by nep1-like protein (nlp) of *Moniliophthora perniciosa* in transgenic tobacco // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2011. V. 24. P. 839. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-10-0286>
 83. Marina M., Romero F.M., Villarreal N.M., Medina A.J., Gárriz A., Rossi F.R., Martinez G.A., Pieckenstein F.L. Mechanisms of plant protection against two oxalate-producing fungal pathogens by oxalotrophic strains of *Stenotrophomonas* spp. // *Plant Mol. Biol.* 2019. V. 100. P. 659. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00888-w>
 84. Schoonbeek H.J., Jacquat-Bovet A.C., Mascher F., Metraux J.P. Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007. V. 20. P. 1535. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-12-1535>
 85. Lee Y., Choi O., Kang B., Bae J., Kim S., Kim J. Grey mould control by oxalate degradation using non-antifungal *Pseudomonas abietaniphila* strain ODB36 // *Sci. Rep.* 2020. V. 10: 1605. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58609-z>
 86. Saucedo-Bazalar M., Masias P., Nouchi-Moromizato E., Santos C., Mialhe E., Cedeño V. MALDI mass spectrometry-based identification of antifungal molecules from endophytic *Bacillus* strains with biocontrol potential of *Lasioidiplodia theobromae*, a grapevine trunk pathogen in Peru // *Curr. Res. Microb. Sci.* 2023. V. 5: 100201. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100201>
 87. Yu Y.Y., Si F.J., Wang N., Wang T., Jin Y., Zheng Y., Yang W., Luo Y.M., Niu D.D., Guo J.H., Jiang C.H. *Bacillus*-secreted oxalic acid induces tomato resistance against gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* by activating the JA/ET pathway // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2022. V. 35. P. 659. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-21-0289-R>

88. Tufail M.A., Ayyub M., Irfan M., Shakoar A., Chibani C.M., Schmitz R.A. Endophytic bacteria perform better than endophytic fungi in improving plant growth under drought stress: a meta-comparison spanning 12 years (2010–2021) // *Physiol. Plant.* 2022. V. 174: e13806. <https://doi.org/10.1111/ppl.13806>
89. Wang X., Liu Y., Qing C., Zeng J., Dong J., Xia P. Analysis of diversity and function of epiphytic bacterial communities associated with macrophytes using a metagenomic approach // *Microb. Ecol.* 2024. V. 87: 37. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02346-7>
90. Yu P., He X., Baer M., Beirinckx S., Tian T., Moya Y.A.T., Zhang X., Deichmann M., Frey F.P., Bresgen V., Li C., Razavi B.S., Schaaf G., von Wirén N., Su Z. et al. Plant flavones enrich rhizosphere *Oxalobacteraceae* to improve maize performance under nitrogen deprivation // *Nat. Plants.* 2021. V. 7. P. 481. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00897-y>
91. Lang E., Schumann P., Adler S., Sproer C., Sahin N. *Azorhizobium oxalatophilum* sp. nov., and emended description of the genus *Azorhizobium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1505. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045229-0>
92. Busato J.G., Lima L.S., Aguiar N.O., Canellas L.P., Olivares F.L. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 110. P. 390. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.126>
93. Andriano A., Guggenberger G., Kernchen S., Mikutta R., Sauheitl L., Boy J. Production of organic acids by arbuscular mycorrhizal fungi and their contribution in the mobilization of phosphorus bound to iron oxides // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12: 661842. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.661842>
94. Haq I.U., Zwahlen R.D., Yang P., van Elsas J.D. The response of *Paraburkholderia terrae* strains to two soil fungi and the potential role of oxalate // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9: 989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00989>
95. Macias-Benitez S., Garcia-Martinez A.M., Jimenez P.C., Gonzalez J.M., Moral M.T., Parrado Rubio J. Rhizospheric organic acids as biostimulants: monitoring feedbacks on soil microorganisms and biochemical properties // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11: 633. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00633>
96. Kirkland B.H., Eisa A., Keyhani N.O. Oxalic acid as a fungal acaricidal virulence factor // *J. Med. Entomol.* 2005. V. 42. P. 346. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.346>
97. Devi K.A., Pandey P., Sharma G.D. Plant growth-promoting endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 enhances the growth of *Achyranthes aspera* L., a medicinal plant // *HAYATI J. Biosci.* 2016. V. 23: 173. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.006>
98. Maksimov I.V., Maksimova T.I., Sarvarova E.R., Blagova D.K., Popov V.O. Endophytic bacteria as effective agents of new-generation biopesticides // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. P. 128. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020072>
99. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., van Themaat E.V.L., Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 807. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
100. Chen N., Tian Sh., Wang F., Shi P., Liu L., Xiao M., Liu E., Tang W., Rahman M., Somos-Valenzuela M. Multi-wing butterfly effects on catastrophic rockslides // *Geosci. Front.* 2023. V. 14: 101627. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2023.101627>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ФИЗИОЛОГИЮ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. А. Г. Хина^{a, b, *}, Г. В. Лисичкин^a, Ю. А. Крутяков^{a, c}

^aФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, химический факультет, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана” (национальный исследовательский университет), Центр национальной технологической инициативы “Цифровое материаловедение”, Москва, Россия

^cНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия^b

*e-mail: alex-khina@inbox.ru

Поступила в редакцию 25.07.2024 г.

После доработки 28.07.2024 г.

Принята к публикации 29.07.2024 г.

В обзоре обобщены результаты работ по экспериментальному изучению физиологических процессов, происходящих в организме высших растений при их взаимодействии с высокодисперсным серебром. Показано, что наночастицы серебра способны к интернализации корнями и листьями растений, а затем к перемещению по всему растительному организму по апопластному и симпластическому путям. Попадая в организм растения, наночастицы серебра вызывают каскад внутриклеточных реакций. В зависимости от условий воздействия наночастиц, они могут приводить как к усилению роста растений и активизации в них процессов специфической и неспецифической защиты, так и к негативным последствиям, таким как угнетение развития. Показаны ключевые факторы, определяющие направленность и интенсивность воздействия наночастиц серебра на высшие растения, такие как доза и путь поступления наночастиц, а также их физико-химические параметры, включая размер наночастиц и природу поверхностного стабилизатора. Рассмотрены перспективные направления дальнейших исследований.

Ключевые слова: активные формы кислорода, внекорневые обработки, нанопрайминг, наночастицы серебра, про-/антиоксидантный баланс, протеомика, фитогормоны, фотосинтетический аппарат

DOI: 10.31857/S0015330324060021, EDN: MAWELA

ВВЕДЕНИЕ

Развитие технологий, которые позволяют создавать новые материалы, содержащие наноразмерные частицы, является одной из наиболее перспективных и быстроразвивающихся областей современной науки и техники [1, 2]. Среди различных металлических наночастиц (НЧ) в виду уникального набора присущих им физико-химических, оптических и биологических свойств особое положение занимают НЧ серебра [3, 4]. В частности, для НЧ серебра харак-

терны выраженные антимикробные свойства, включающие антибактериальную [5, 6], фунгицидную [7, 8] и противовирусную активность [9, 10], а также низкая токсичность в отношении клеток млекопитающих [11]. Это позволило использовать препараты на основе НЧ серебра в ветеринарии и медицине в качестве альтернативы традиционным антибиотикам в терапии инфицированных бактериями ран и ожогов [12], а также воспалительных оториноларингологических [13], стоматологических [14], офтальмологических [15], гинекологических [16] и других заболеваний. Кроме того, НЧ серебра массово применяются в качестве компонента косметических препаратов [17], дезинфицирующих и моющих средств [18], упаковочных материалов [19], антибактериальных покрытий медицинских изделий [5], фильтров для дезинфекции воды [20], микроэлектронных схем [21] и других товаров массового потребления.

Сокращения: АПГТМ — амфополикарбосиглицинат таллового масла; АПО — аскорбат-пероксидаза; АФК — активные формы кислорода; ГР — глутатион-редуктаза; ГПО — глутатион-пероксидаза; КАТ — каталаза; НЧ — наночастицы; ПВП — поливинилпирролидон; ПГМБ — полигексаметиленбигуанид; ПО — пероксидаза; ПФО — полифенолоксидаза; СОД — супероксиддисмутаза; ЦТАБ — цетилтриметиламмоний бромид; ζ-потенциал — электрокинетический потенциал.

Сравнительно новой областью научных исследований является изучение возможности применения НЧ серебра и других благородных металлов в растениеводстве в качестве действующего вещества средств защиты растений [22] и стимуляторов роста [23, 24]. Работы, нацеленные на изучение фундаментальных процессов, лежащих в основе взаимодействия НЧ благородных металлов и высших растений, ведутся в России, например, в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) [25–27], Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва) [28–30], а также за рубежом [31, 32]. В опубликованных за последние два десятилетия исследованиях было показано, что НЧ серебра обладают высокой активностью в отношении фитопатогенных бактерий [33] и грибов [34], что приводит к существенному снижению инфекционной нагрузки, оказываемой вредоносными микроорганизмами на растения [35, 36]. При этом важно отметить, что в отличие от большинства действующих веществ современных пестицидов, обладающих внутри своего класса высокой биохимической специфичностью путей воздействия и потому проявляющих свою активность в отношении лишь узкого спектра фитопатогенов, НЧ серебра способны действовать по нескольким различным механизмам, и потому могут быть эффективны в отношении широкого спектра возбудителей болезней растений. Так, ионы серебра (Ag^+), выделяющиеся с поверхности НЧ, способны связываться с азот- и серосодержащими мембранными белками клеток фитопатогенов и нарушать их работу [37], проникать в цитоплазму и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами [38], вызывать изменения в экспрессии генов [39], а также приводить к развитию окислительного стресса [40]. Кроме того, НЧ серебра обладают специфическими относительно ионов Ag^+ механизмами антимикробного действия. Они связаны с возможностью ассоциации НЧ серебра с клеточной мембраной, что приводит к нарушению ее структуры и увеличению внутриклеточной концентрации бактерицидных Ag^+ [41]. Исходя из этого очевидно, что важным преимуществом применения НЧ серебра в качестве средств защиты растений является низкий потенциал развития фитопатогенными микроорганизмами резистентности к их действию [42].

Несмотря на то, что НЧ серебра достоверно не обладают цитотоксичностью в отношении клеток млекопитающих в концентрациях, достаточных для проявления ими антибактериальной и фунгицидной активности [11], результаты научных исследований, направленных на изучение физиологических последствий взаимодействия НЧ серебра и высших растений, имеют

весьма противоречивый характер. В то время как широкий ряд работ описывает отрицательные последствия фитотоксического воздействия НЧ серебра на высшие растения [43, 44], другие работы, напротив, демонстрируют положительный ростостимулирующий эффект [45, 46]. Исходя из этого, целью настоящего обзора является обобщение и систематизация опубликованных экспериментальных результатов, полученных в ходе исследований физиологических процессов, происходящих на внутриклеточном и морфологических уровнях, при действии НЧ серебра на высшие растения. Кроме того, были определены условия, при которых НЧ серебра могут способствовать улучшению роста и развития растений или же, напротив, проявлять фитотоксическое действие.

МЕХАНИЗМЫ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ И ТРАНСПОРТА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОРГАНИЗМЕ РАСТЕНИЙ

В большинстве работ обсуждается два основных пути, по которым различные НЧ, в том числе и НЧ серебра, способны проникать в организм растения, а именно, через его подземную (корни) и надземную части (листья) [31]. В листья растений НЧ могут проникать через кутикулу и устьичные отверстия. Воскообразная гидрофобная кутикула имеет небольшие полярные поры размером около 2 нм, что позволяет частицам меньшего диаметра проникать в ткани растения непосредственно через кутикулу [47, 48]. Более крупные НЧ способны поступать в листья через устьичные отверстия, размер которых для различных видов растений варьирует от нескольких до десятков микрометров [49]. В работе [50] при изучении генетически модифицированных растений *Arabidopsis thaliana* с различной чувствительностью к регуляции закрытия устьиц при воздействии абсцизовой кислоты (АБК) методами электронной микроскопии в комбинации с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией было показано, что именно путь проникновения через устьица является ключевым при внекорневых обработках дисперсиями НЧ серебра.

О механизмах проникновения НЧ металлов в организм растения через корни известно значительно меньше. Предполагается, что сравнительно небольшие НЧ способны напрямую проходить через поры стенок корневых клеток, размер которых достигает 20 нм. Более крупные НЧ, вероятно, попадают в клетку за счет разрушения клеточных филаментов [51]. Остаются не до конца выясненными и пути преодоления наночастицами клеточной мембраны. По данному вопросу существуют различные гипотезы, включающие проникновение НЧ через

аквапорины и ионные каналы, разрушение плазмалеммы и эндоцитоз [52]. Однако, известно, что ионные каналы способны функционировать исключительно в отношении определенных ионов, а каналы аквапоринов, хотя и не обладают высокой специфичностью, как правило, их полость не превышает в диаметре 1 нм [53]. Проникновение НЧ в цитоплазматическое пространство посредством разрушения мембраны также представляется маловероятным в виду вызываемого в таком случае лизиса и потери жизнеспособности клеток. Наиболее вероятным путем проникновения НЧ металлов в цитоплазму клеток растений представляется эндоцитоз. Так, в работе [54] методами электронной и конфокальной микроскопии впервые была продемонстрирована возможность эндоцитоза НЧ металла клетками растений. Было показано, что клетки пылевых трубок растений табака способны поглощать НЧ золота путем эндоцитоза при помощи транспортных везикул. В другой работе была показана возможность эндоцитоза НЧ полистирола и CdSe/ZnS клетками растений белого клена [55]. Хотя прямые свидетельства реализации описанных механизмов для НЧ серебра на данный момент отсутствуют, сама возможность их поглощения корнями растений была показана в работе [44] методом отслеживания миграции стабильных изотопов ^{107}Ag и ^{109}Ag в тканях растений риса (*Oryza sativa* L.). Авторы исследования продемонстрировали, что после внесения в гидропонный раствор нитрата и НЧ серебра, происходит накопление металла в тканях корней, а затем и надземной части растений. При этом скорость накопления серебра в тканях растений при воздействии НЧ была значительно выше, чем в случае воздействия ионной формы, что однозначно указывает на возможность прямого поглощения НЧ поверхностью корней.

Поглощенные корнями или листьями НЧ серебра могут затем мигрировать в другие части растения по апопластному и симпластическому путям. Апопласт — внеклеточная структура высших растений, состоящая из клеточных стенок и межклетников, по которой за счет капиллярных сил осуществляется транспорт воды и растворенных в ней веществ. О возможности переноса НЧ серебра по апопластному пути свидетельствует их накопление в срединной пластинке [56]. Несмотря на то, что большая часть НЧ серебра, вероятно, задерживается на клеточной стенке, некоторые НЧ способны проникать в цитоплазму растений и затем переноситься между клетками по симпластическому пути через цитоплазматические мостики — плазмодесмы [57]. Затем, перемещаясь от клетки к клетке по симпластическому пути, НЧ серебра способны проникать в проводящие пучки (основные элементы транспортной системы сосудистых

растений) и переноситься по всему организму растения [58].

В последние десятилетия был проведен ряд исследований по изучению кинетики поглощения растениями НЧ серебра. Было установлено, что скорость поглощения НЧ серебра корнями растений линейно зависит от времени воздействия и концентрации НЧ в питательной среде [59], а общее количество поглощенного растениями серебра может быть рассчитано как сумма поглощенных НЧ и ионов серебра, выделяющихся с их поверхности в ходе окислительного растворения [60]. Кроме того, на кинетику поглощения наносеребра растениями важное влияние оказывают коллоидно-химические параметры НЧ. Так, в работах [61, 62] было показано, что НЧ серебра меньших размеров лучше аккумулируются в тканях растений при гидропонном пути поступления. Другим параметром НЧ серебра, влияющим на скорость их поглощения корнями растений, является знак и величина электрокинетического потенциала (ζ -потенциал), создаваемого вблизи поверхности НЧ слоем молекул стабилизаторов, используемых для поддержания коллоидной стабильности НЧ. Поскольку поверхность корня растений несет отрицательный заряд, положительно заряженные НЧ серебра имеют к ней лучшую адгезию, что в результате приводит к более быстрому накоплению НЧ [63, 64].

Для оценки количества НЧ серебра, переносимых из корневой в надземную часть растений используют фактор элонгации, рассчитываемый как отношение количества серебра, детектируемого в стебле или листьях растения, к количеству серебра, обнаруженного в его корнях [31]. Известно, что данный фактор также зависит от физико-химических параметров НЧ серебра, таких как размер (увеличивается с уменьшением размера НЧ) [65, 66] и тип используемого стабилизатора [67, 68], и для большинства высших растений не превышает 5% [31].

Помимо физико-химических свойств НЧ на скорость интернализации наносеребра корнями растений также, очевидно, оказывают влияние видовые особенности растений. В качестве примера можно привести две работы, в которых методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой исследовалась скорость накопления НЧ серебра в проростках пшеницы [59] и риса [69]. Испытания в них проводили в гидропонной среде со схожим минеральным составом, а также схожими характеристиками НЧ серебра (стабилизатор — поливинилпирролидон (ПВП), размер частиц 15 нм [59] и 12.2 ± 3.8 нм [69]). Было обнаружено, что даже с учетом использования меньшей концентрации НЧ серебра (2.0 и 1.0 мг/л серебра, соответственно) в гидропонном растворе, скорость накопления НЧ серебра

в проростках пшеницы была ниже в 4.3 раза, чем в проростках риса (8 и 34.4 мг/(кг·ч), соответственно) [59, 69]. Возможными значимыми морфологическими факторами биодоступности НЧ серебра для растений могут являться площадь поверхности корня и количество его боковых отростков. Говоря о пути поступления НЧ серебра через листья, такими факторами могут служить площадь листовой поверхности, размеры устьиц, толщина кутикулы и т.д. Примечательно, что указанные параметры зависят от условий окружающей среды и стадии онтогенеза растений, что также приводит к изменениям в способности растений усваивать НЧ серебра.

Таким образом, несмотря на некоторые пробелы в понимании конкретных механизмов, на сегодняшний день достоверно известно, что НЧ серебра способны достаточно эффективно проникать в организм растений через листья и корни, а затем перемещаться по всему растительному организму по апопластному и симпластическому путям. Важно отметить, что подавляющее большинство исследований, касающихся пути проникновения НЧ серебра в организм растений через корни, было проведено в модельных гидропонных условиях. Однако известно, что при попадании в почву НЧ и ионы серебра вступают во множество химических реакций с ее компонентами, иммобилизуются в виде малорастворимых и химически инертных соединений (например, Ag_2S), а также подвергаются химическим изменениям, связанными с биотическими и абиотическими факторами, что многократно и достоверно снижает их биодоступность [70, 71]. Исходя из указанных предпосылок, можно с уверенностью говорить о весьма низкой корреляции полученных в модельных гидропонных экспериментах данных с результатами реального поведения НЧ серебра и их биодоступности при выращивании растений в условиях открытого и закрытого грунта. Следует отметить, что похожие выводы были получены нами при оценке релевантности экспериментальных данных по фитотоксичности меди, полученных в модельных колоночных экспериментах, в отношении биодоступности металла в реальных почвенно-климатических условиях [72, 73].

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Наиболее часто оцениваемыми показателями ростовых процессов при определении направленности и интенсивности воздействия различных факторов при выращивании растений являются процент всхожести семян, длина корня и стебля, общая и сухая биомасса корней, стеблей и листьев и др. Кроме того, при оценке

влияния факторов внешней среды на продуктивность сельскохозяйственных растений, часто используют интегральные показатели урожайности, например массу зерна на единицу площади или среднее количество плодов. В табл. 1, 2 и 3 обобщены экспериментальные данные, полученные в работах последних десятилетий, которые отражают изменения указанных параметров растений при воздействии на них НЧ серебра [36, 44, 46, 56, 57, 62, 63, 74–125]. Из представленных данных видно, что НЧ серебра способны оказывать как положительное (табл. 1), так и отрицательное (табл. 2) влияние на морфометрические показатели высших растений в зависимости от вида растения, условий эксперимента, таких как концентрация и способ применения НЧ серебра, а также физико-химических параметров НЧ, таких как размер и поверхностный стабилизатор.

Так, рядом исследователей были получены результаты, демонстрирующие что в низких концентрациях НЧ серебра благоприятно влияют на рост и развитие растений, а при увеличении их концентрации оказываемое положительное влияние сменяется на угнетающее (табл. 3). Например, при изучении влияния НЧ серебра на морфометрические параметры растений фасоли и кукурузы было обнаружено, что полив молодых проростков дисперсиями НЧ серебра в концентрациях 20–60 мг/л приводил к увеличению длины их стеблей и корней, площади поверхности листьев, а также общей и сухой биомассы, но внесение дисперсий с НЧ серебра в более высоких концентрациях (80–100 мг/л), напротив, вело к снижению этих показателей относительно контрольного варианта [123]. Отметим, что аналогичный дозозависимый эффект также наблюдался при взаимодействии высших растений с НЧ других металлов и их оксидов [126].

Другими факторами, определяющими влияние НЧ серебра на растения, являются физико-химические характеристики НЧ, такие как диаметр и тип химического стабилизатора поверхности. Так, в работе [57] исследовалось влияние воздействия НЧ серебра различного размера (20, 40 и 80 нм), стабилизированных цитратом, на растения арабидопсиса в условиях гидропонного эксперимента. Воздействие НЧ серебра приводило к закономерному дозозависимому снижению длины корней исследуемых растений, которое также коррелировало с размером НЧ и приобретало более выраженный характер при его уменьшении. В другой работе [63] исследовалось влияние НЧ серебра, функционализированных тремя различными поверхностными стабилизаторами, на растения репчатого лука. Было обнаружено, что НЧ серебра, стабилизированные положительно заряженными молекулами ПВП, и, особенно, цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ), оказывают

Таблица 1. Позитивное влияние наночастиц (НЧ) Ag на ростовые процессы у растений

Вид растения	Стабилизатор НЧ	Размер НЧ, нм	Способ воздействия	Концентрация НЧ, мг/л	Морфологические эффекты	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i>		47 ± 7 (треугольной формы); 8 ± 2 (сферические); 45 ± 5 (десятигранные)	Корни, твердая питательная среда	10	Увеличение длины корней (наиболее выражено для десятигранных НЧ Ag)	[74]
<i>Betula pubescens</i>	Сульфозтокси-латадодеканол	10–30	Корни	5	Увеличение высоты и приживаемости побегов, увеличение числа листьев	[75]
<i>Brassica juncea</i>	Цитрат	29	Корни, твердая питательная среда	25–400	Увеличение биомассы побегов (максимальное при 50–100 мг/л НЧ Ag), длины корней и стебля (максимальное при 200 мг/л НЧ Ag)	[76]
<i>Brassica juncea</i>	α-амилаза		Корни, гидропоника	100–1000	Увеличение длины корней и стеблей (максимальное при 100 мг/л НЧ Ag)	[77]
<i>Cajanus cajan</i>	Цитрат	20	Корни, гидропоника	0.13 × 10 ⁻³	Увеличение всхожести семян, сухой биомассы и длины корней	[78]
<i>Capsicum annuum</i>	Цитрат	45 ± 7	Листья	40–80	Увеличение сырой и сухой биомассы стеблей и корней	[79]
<i>Crocus sativus</i>			Замачивание клубнелуковиц	40–120	Увеличение длины корней, сырой и сухой биомассы корней и листьев	[80]
<i>Glycine max</i>	ПГМБ	6 ± 1	Нанопрайминг и листья	1.25–3.75 (нанопрайминг), 0.067–0.2 (листья)	Увеличение количества и массы корневых узелков, высоты растений, площади поверхности листьев и урожайности растений	[81]
<i>Lathyrus Sativus</i>	ПВП	20	Нанопрайминг	5–15	Увеличение длины корней, длины, сырой и сухой биомассы стеблей	[82]
<i>Oryza sativa</i>	ПВП	7.6 ± 2.2	Корни, гидропоника	0.05	Увеличение биомассы, длины и ширины корней	[56]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Цитрат	10	Нанопрайминг	0.25–2.5	Увеличение всхожести семян, высоты растений, сырой и сухой биомассы стеблей, количества корневых клубеньков	[83]
<i>Physcomitrella patens</i>	Без стабилизатора; ПВП; цитрат	37 ± 4; 29 ± 6.3; 21.5 ± 4.2, соотв.	Корни	5–10	Снижение площади разрастания, сырой и сухой биомассы растений (наиболее выраженное для НЧ Ag стабилизированных цитратом)	[84]
<i>Ricinus communis</i>	ПВП	70 ± 4.9	Корни	500–4000	Увеличение длины корней и стеблей, нет влияния на всхожесть семян	[85]

<i>Solanum lycopersicum</i>	АПГТМ	17–31	Листья	100	Увеличение площади поверхности листьев, общей урожайности, среднего числа и веса плодов	[86]
<i>Solanum tuberosum</i>	ПГМБ	4.9 ± 2.7	Предпосевная обработка клубней, листья	5 (предпосевная обработка), 0.33 (листья)	Увеличение высоты стеблей, массы листьев, массы наземной части растений, количества и средней массы клубней	[36]
<i>Solanum tuberosum</i>	АПГТМ		Листья	25–100	Увеличение урожайности (максимальное при концентрации НЧ Ag 50 мг/л)	[87]
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Цитрат		Листья	20–60	Увеличение длины стеблей, количества листьев, сухой биомассы растений, количества бобов, количества и массы семян (максимальное при 40 мг/л НЧ Ag)	[88]
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Выделен из бактериальный <i>Bacillus subtilis</i>	15–29	Корни, твердая питательная среда	1	Увеличение числа листьев, длины корней и стеблей, биомассы	[89]
<i>Trigonella foenum-graecum</i>		20	Нанопрайминг	10–40	Увеличение всхожести семян, длины, сырой и сухой биомассы корней	[90]
<i>Triticum aestivum</i>	Выделен из грибов <i>Aspergillus terreus</i>	15–29	Нанопрайминг	0.22–1.08	Увеличение сырой и сухой биомассы (максимальное – при 0.22–0.55 мг/л НЧ Ag)	[91]
<i>Triticum aestivum</i>	Экстракт растений <i>Moringa oleifera</i>		Корни и листья	25–100	Увеличение сырой и сухой биомассы, длины корней и стеблей, количества и площади поверхности листьев (максимальное – при 75 мг/л НЧ Ag)	[92]
<i>Triticum aestivum</i>	Экстракт растительный <i>Moringa oleifera</i>		Листья	25–100	Увеличение сырой и сухой биомассы, длины стеблей и площади поверхности корней (максимальное – при 75 мг/л НЧ Ag)	[93]
<i>Triticum aestivum</i>	Хитозан	2–10	Нанопрайминг	–	Увеличение длины корней, длины стеблей и биомассы растений	[94]
<i>Solanum tuberosum</i>	ПГМБ	6 ± 1	Предпосевная обработка клубней, листья	2.5–5 (предпосевная обработка), 0.125 (листья)	Увеличение сырой и сухой биомассы и среднего размера клубней	[46]
<i>Triticum aestivum</i>			Нанопрайминг, листья	2–4 (нанопрайминг), 0.067–0.133 (листья)	Увеличение всхожести семян, количества плодородных стеблей и урожайности	
<i>Malus</i>			Листья	0.075–0.125	Увеличение урожайности	

Таблица 2. Негативное влияние наночастиц (НЧ) Ag на ростовые процессы у растений

Вид растения	Стабилизатор НЧ	Размер НЧ, нм	Способ воздействия	Концентрация НЧ, мг/л	Морфологические эффекты	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Цитрат	20; 40; 80	Корни, гидропоника	0.067–0.534	Снижение длины корней (наиболее выражено для наночастиц наименьшего размера)	[57]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Цитрат	10	Корни, гидропоника	1–2.5	Снижение длины и массы корней и биомассы растений	[95]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		9	Корни, твердая питательная среда	0.2–3	Снижение длины корней и массы листьев	[96]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		41 ± 1.5	Корни	300–3000	Снижение длины корней и площади поверхности листьев	[97]
<i>Brassica sp.</i>	Экстракт <i>Aloe vera</i>	47	Корни, гидропоника	100–325	Снижение длины и биомассы корней и стеблей	[98]
<i>Capsicum annuum</i>	Цитрат	14.1 ± 8.7	Корни, гидропоника/ почва	0.1–1	Снижение биомассы листьев, стеблей и корней, а также высоты растения	[99]
<i>Cucurbita pepo</i>	–	100	Корни, гидропоника	1000	Снижение биомассы	[100]
<i>Lemna gibba</i>	–	50	Корни	0–10	Ингибирование роста	[101]
<i>Oryza sativa</i>	Сахароза	20–150	Корни, гидропоника	0.1–1000	Снижение длины, сырой и сухой биомассы корней и стеблей (наиболее выражено для НЧ Ag больших размеров)	[62]
<i>Oryza sativa</i>	–	20	Корни, гидропоника	0.2–1	Снижение длины и биомассы корней и стеблей, площади поверхности листьев	[102]
<i>Raphanus sativus</i>	–	2	Нанопрайминг	125–500	Снижение длины корней и стеблей, нет влияния на всхожесть семян	[103]
<i>Solanum lycopersicum</i>	–	–	Нанопрайминг	50–5000	Снижение биомассы растений и длины корней, нет влияния на всхожесть семян	[104]
<i>Triticum aestivum</i>	–	3.1–8.7	Корни, почва	20–2000	Снижение длины корней, высоты стеблей, биомассы корней и стеблей, длины колосьев, массы и количества зерен	[105]

<i>Triticum aestivum</i>	Без стабили- затора	10	Корни, почва	0.5–5	Снижение длины и сухой биомассы корней и стеблей	[106]
<i>Triticum aestivum</i>	ПВП	5–15.5	Нанопрайминг	1–10	Снижение длины корней и стеблей	[107]
<i>Vicia faba</i>	ПВП	5–50	Корни, почва	0.1–0.8	Снижение всхожести семян, длины и сухой биомассы корней и стеблей, площади поверхности листьев	[108]
<i>Vigna radiata</i>		20	Корни, твердая питательная среда	5–50	Снижение длины и уменьшение массы корней и стеблей	[109]
<i>Linum usitatissimum</i>	Полиэтилен- гликоль сорбат лаурат (ПЭГСЛ); цитрат; не указан	20 ± 2.5; 5.2, соотв.	нанопрайминг; корни (жидкая питательная среда)	10–100	Нет влияния на процент всхожести семян, снижение длины стеблей (наиболее выражено для НЧ Ag стабилизированных цитратом)	[44]
<i>Lolium perenne</i>					Снижение всхожести семян и длины стеблей (наиболее выражено для НЧ Ag стабилизированных ПЭГСЛ)	
<i>Hordeum vulgare</i>					Снижение всхожести семян (наиболее выражено для НЧ Ag диаметром 2 нм, стабилизатор не указан) и длины стебля (наиболее выражено для НЧ Ag стабилизированных ПЭГСЛ)	
<i>Glycine max</i>	ПВП	17	Корни (почва) и листья	1–30	Снижение биомассы корней и стеблей (более выраженное в случае корневого воздействия)	[110]
<i>Oryza sativa</i>				0.1–1 (корни); 1–30 (листья)	Снижение биомассы корней и стеблей (более выраженное в случае корневого воздействия)	
<i>Zea mays</i>	Цитрат	56.1 ± 13.8	Корни	0.05–73.4	Снижение длины корней при концентрации НЧ Ag > 1 мг/л, нет влияния на длину корней при концентрации НЧ Ag ≤ 1 мг/л	[111]
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>					Снижение длины корней при концентрации НЧ Ag > 1 мг/л, нет влияния на длину корней при концентрации НЧ Ag ≤ 1 мг/л	
<i>Phaseolus radiatus</i>	Цитрат	5–25	Корни, твердая питательная среда и почва	5–40 (питательная среда), 100–2000 (почва)	Снижение длины ростков (более выраженное при введении НЧ Ag в питательную среду)	[112]
<i>Sorghum bicolor</i>						

Таблица 3. Смешанное либо отсутствие влияния наночастиц (НЧ) Ag на ростовые процессы у растений

Вид растения	Стабилизатор НЧ	Размер НЧ, нм	Способ воздействия	Концентрация НЧ, мг/л	Морфологические эффекты	Ссылка
<i>Allium cepa</i>	Цитрат		Корни, гидропоника	0.003–0.011	Увеличение сухой биомассы корней, нет влияния на длину корней	[63]
	ПВП				Смешанное влияние на длину и биомассу корней (в зависимости от концентрации НЧ Ag)	
	ЦТАБ				Снижение длины и биомассы корней	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ПВП	20	Корни, твердая питательная среда	1–20	Увеличение биомассы при 1–2.5 мг/л НЧ Ag, уменьшение биомассы при 5–20 мг/л НЧ Ag	[113]
<i>Erica sativa</i>	ПВП	14 ± 0.3	Нанопрайминг	0.1–100	Увеличение длины корней при 0–20 мг/л НЧ Ag, уменьшение длины корней при 100 мг/л НЧ Ag	[114]
<i>Lactuca sativa</i>	Без стабилизатора		Листья	0.001–0.1	Нет изменений биомассы	[115]
<i>Lupinus termis</i>	Экстракт кориандра	1–16	Нанопрайминг	100–900	Увеличение всхожести семян и длины корней (при концентрации НЧ Ag ≤ 100–150 мг/л), уменьшение при более высоких концентрациях	[116]
<i>Oryza sativa</i>		18.3	Корни (почва)	30–60	Увеличение сухой биомассы корней (при 30 мг/л НЧ Ag), уменьшение сухой биомассы корней (при 60 мг/л НЧ Ag), снижение сухой биомассы стеблей при любой концентрации НЧ Ag	[117]
<i>Pennisetum glaucum</i>	Экстракт <i>Cassia auriculata</i>	13	Корни, жидкая питательная среда	20–50	Увеличение всхожести семян, снижение длины корней и стеблей и общей длины ростков	[118]
<i>Quercus robur</i>	–		Листья	5–50	Нет значимого влияния на длину и массу надземных частей растения, длину, массу и диаметр корней	[119]
<i>Solanum lycopersicum</i>		20	Нанопрайминг и корни, гидропоника	0.05–2.5	Увеличение длины корней, общей и сухой биомассы проростков при 0.05–1.5 мг/л НЧ Ag, снижение этих показателей при более высокой концентрации	[120]
<i>Thymus vulgaris</i>	–		Нанопрайминг	10–30	Снижение всхожести семян, длины корней и стеблей в нормальных условиях, увеличение этих показателей в условиях воздействия солевого стресса (максимальное при 10 мг/л НЧ Ag)	[121]

<i>Zea mays</i>	20	Нанопрайминг	0.05–2.5	Снижение длины корней, смешанное влияние на сырую биомассу (уменьшение при 0.05–0.1 мг/л НЧ Ag, увеличение при больших концентрациях) и сухую биомассу (уменьшение при всех концентрациях НЧ Ag, кроме 0.5 и 1 мг/л)	[122]
<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.)				Смешанное влияние на длину корней и сырую биомассу (уменьшение при 0.05–0.1 мг/л НЧ Ag, увеличение при больших концентрациях), снижение сухой биомассы	
<i>Cucurbita pepo</i>				Увеличение длины корней (максимальное при 0.5 мг/л НЧ Ag), сырой биомассы (максимальное при 0.1 мг/л НЧ Ag) и сухой биомассы (максимальное при 0.05 мг/л НЧ Ag)	
<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Zea mays</i>	10–30	Корни, почва	20–100	Увеличение длины стеблей и корней, площади поверхности листьев, общей и сухой биомассы при концентрациях НЧ Ag 20–60 мг/л, снижение этих показателей при больших концентрациях	[123]
<i>Triticum aestivum</i>	30	Листья	50–75	Увеличение длины, сухой и сырой биомассы стеблей (максимальное при 50 мг/л НЧ Ag), снижение длины, сухой и сырой биомассы корней	[124]
<i>Vigna sinensis</i>				Увеличение длины, сухой и сырой биомассы стеблей и корней (максимальное при 50 мг/л НЧ Ag)	
<i>Brassica juncea</i>				Увеличение длины, сухой и сырой биомассы стеблей, общей и сухой биомассы корней, снижение длины корней	
<i>Cyperaceae</i> (5 видов), <i>Juncus effuses</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Panicum virgatum</i> , <i>Eupatorium fistulosum</i> , <i>Lobelia cardinalis</i> , <i>Phytolacca americana</i>	21.0 ± 17.0	Нанопрайминг	1–40	Нет влияния на всхожесть семян. Снижение длины листьев <i>Lolium multiflorum</i> . Нет влияния на длину листьев других растений. Снижение длины корней <i>Carex crinita</i> , <i>Carex scoparia</i> , <i>Carex vulpinoidea</i> , <i>Scirpus superinus</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Lobelia cardinalis</i> . Увеличение длины корней <i>Carex lurida</i> . <i>Panicum virgatum</i> , <i>Phytolacca americana</i>	[125]
	6.0 ± 1.7	Гуммиарабик		Снижение всхожести семян <i>Scirpus superinus</i> , <i>Juncus effusus</i> , <i>Phytolacca americana</i> . Снижение длины листьев всех растений семейства <i>Cyperaceae</i> и растений <i>Lolium multiflorum</i> . Снижение длины корней всех исследованных растений, кроме <i>Phytolacca americana</i>	

более выраженное токсическое действие, чем НЧ серебра, стабилизированные отрицательно заряженными цитрат-анионами, что выразилось в снижении длины и биомассы корней исследуемых растений. Авторами исследований [57, 63] было установлено, что наблюдаемые эффекты тесно связаны с кинетическими факторами поглощения НЧ серебра тканями растений, подробно описанными в предыдущем разделе. Так, воздействие НЧ серебра меньших размеров и стабилизированных ПАВ катионного типа приводило к ускоренному поглощению НЧ корнями растений, что и обуславливало большую фитотоксичность таких НЧ.

Помимо вышеуказанных факторов, влияющих на характер изменения показателей роста и развития растений при их взаимодействии с НЧ серебра, нами было обнаружено, что ключевую роль в этом вопросе играет способ воздействия НЧ серебра. Так, в большинстве рассмотренных работ, в которых экспозиция наносеребром осуществлялась через корень (введение НЧ серебра в питательную среду или почву при выращивании растений), наблюдали снижение морфометрических показателей (отрицательное влияние НЧ серебра наблюдалось в 18 работах, положительное — в 10 работах, смешанное или отсутствие влияния — в 6 работах). В то же время воздействие НЧ на надземную часть растений (опрыскивания), напротив, чаще приводило к положительным эффектам (отрицательное влияние НЧ серебра наблюдали в 1 работе, положительное — в 9 работах, смешанное или отсутствие влияния — в 3 работах). Примечательно, что единственная работа, в которой наблюдали негативное влияние НЧ серебра при внекорневой обработке растений, как раз была посвящена исследованию влияния пути поступления НЧ серебра на скорость их накопления в тканях и оказываемый фитотоксический эффект [110]. Авторы исследования показали, что, несмотря на то что скорость накопления НЧ серебра в надземных частях растения при листовых обработках растений риса и сои в 17–200 раз превышала скорость накопления НЧ при поливе растений дисперсиями наносеребра, токсичность НЧ серебра оставалась значительно более низкой именно при листовых обработках. Вероятно, наблюдаемый эффект связан с различной чувствительностью тканей корней и надземных частей растения к действию НЧ серебра, однако, данный вопрос требует проведения дополнительных исследований. Другим предпочтительным способом обработок растений НЧ серебра является замачивание семян в разбавленных водных коллоидных дисперсиях НЧ (нанопрайминг). Среди рассмотренных в данном обзоре исследований (табл. 1, 2 и 3) предварительный прайминг семян растений

НЧ серебра в 7 случаях приводил к увеличению морфометрических показателей, в 4 случаях — к их снижению, а в 6 случаях оказывал смешанное или разнонаправленное действие. Отметим, что в ряде работ было продемонстрировано, что прайминг семян коллоидными дисперсиями НЧ золота приводит к значительному увеличению морфометрических показателей растений, интенсификации процесса фотосинтеза, а также повышению устойчивости растений к действию неблагоприятных температур [30, 127].

Из представленных в табл. 1, 2 и 3 данных также видно, что результаты исследований последствий взаимодействия НЧ серебра зачастую различаются для различных видов растений даже в схожих условиях эксперимента. По-видимому, это связано с различиями в проницаемости корней и стеблей и, следовательно, в кинетике накопления серебра в тканях, а также в способности различных видов растений эффективно адаптироваться к стрессовым воздействиям. Важно отметить, что многие из рассмотренных работ, в которых наблюдались негативные эффекты при воздействии НЧ серебра при их поступлении через корни, проводились в беспочвенных модельных условиях, что значительно усиливает негативные эффекты, оказываемые НЧ серебра. Так, в работе [112] было показано, что для достижения схожих негативных эффектов роста растений вигны лучистой и сорго двухцветного при выращивании в почве требуется концентрация НЧ серебра на два порядка превышающая концентрацию НЧ в случае выращивания растений на твердых питательных средах, что связано с иммобилизацией НЧ серебра компонентами почвы, протеканием химических реакций между ними и, в результате, значительного снижения биологической активности НЧ [70, 71].

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ПРО-/АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС

Наиболее хорошо изученным следствием взаимодействия НЧ серебра с растениями является генерация в их клетках избыточного количества молекул активных форм кислорода (АФК), являющихся естественными побочными продуктами клеточного окислительного метаболизма. К наиболее биологически значимым АФК относят свободные радикалы (синглетный кислород $^1\text{O}_2$, супероксидный анион-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, гидроксил $\text{HO}^\cdot$, гидроксипероксил $\text{HO}_2^\cdot$ и др.), а также некоторые молекулы, например, пероксид водорода H_2O_2 [128]. Известно, что повышение концентрации АФК при взаимодействии биологических клеток с НЧ или ионами серебра происходит по нескольким механизмам, включая нарушения в дыхательной

функции клеток за счет связывания ионов серебра с тиол-содержащими группами ферментов электронно-транспортной цепи [129, 130], изменение активности ферментов, участвующих в неспецифической или адаптивной защитной реакции, ингибирования работы ферментов, участвующих в утилизации АФК [131], а также катализ ионами серебра реакций переноса электронов, подобных реакции Фентона [132].

В работе [102] воздействие НЧ серебра на проростки риса при их введении в гидропонный раствор в концентрации от 0 до 1 мг/л приводило к дозозависимому увеличению содержания H_2O_2 в корнях и листьях растений. Схожие данные по дозозависимому увеличению концентрации АФК при воздействии НЧ серебра были получены на водных растениях рясок *Lemna gibba* [101] и *L. polyrrhiza* [133]. В ранее упомянутой работе [63] исследовалось влияние НЧ серебра с тремя различными поверхностными стабилизаторами на растения репчатого лука в гидропонных условиях. Было показано, что содержание АФК в клетках корней репчатого лука зависит не только от концентрации НЧ серебра, но и от природы стабилизирующего агента. Так, наибольший прирост в концентрации АФК был получен для НЧ серебра, стабилизированных ЦТАБ и ПВП, а эффект от НЧ, стабилизированных цитратом, оказался наименьшим.

Долгое время АФК рассматривались в основном как побочный и вредный продукт клеточного метаболизма, однако, в последние 20 лет было обнаружено, что АФК также являются важными сигнальными молекулами в организме растений [134]. Вызывая окислительные посттрансляционные модификации сенсорных белков и окисляя клеточные метаболиты, АФК влияют на широкий спектр белков-эффекторов, регулируя многие жизненно важные функции растения [135]. АФК являются хорошо описанными вторичными мессенджерами при адаптации растений к стрессовым воздействиям окружающей среды, таким как повышенная или пониженная температура, засуха, УФ-облучение, воздействие избыточного количества соли и др. [136–138]. Ряд исследований демонстрирует положительное влияние НЧ серебра на показатели роста растений в условиях воздействия различных факторов абиотического стресса, таких как недостаточное или избыточное количество воды, высокие и низкие температуры и засоление почвы [139, 140]. Вероятно, это связано в том числе с присутствием некоторого избыточного количества АФК в организме растений, подвергшихся воздействию НЧ Ag и активизации каскадов соответствующих адаптационных реакций. АФК также вовлечены во многие регуляторные пути онтогенеза растений. Хорошо изученными процессами, связанными с важной ролью апопла-

стных АФК, являются образование пылевых трубок [141–143], рост корневых волосков [144], бобово-ризобийный симбиоз [145] и многие другие.

Также хорошо известна роль АФК в защите растений от стрессов биогенной природы. Наиболее ранней реакцией растения на воздействие фитопатогенов является окислительный взрыв — процесс образования большого количества АФК с вовлечением пероксидаз клеточной стенки, в результате которого происходит гибель клеток патогена и части клеток растения-хозяина, а также формирование некротических участков с механическими барьерами, препятствующими дальнейшему распространению патогена по тканям растения [146, 147]. Кроме того, АФК способствуют устойчивости к биотическому стрессу растений за счет активации продуцирования фитоалексинов [148], снижения проницаемости кутикулы [149] и развития системной приобретенной устойчивости [150].

Однако, повышенное содержание АФК в клетках растений, возникающее в результате воздействия стрессов биогенной и абиогенной природы, приводит к интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ), повреждению нуклеиновых кислот, нарушению работы ферментов и, в конечном итоге, клеточной гибели [151]. Так, интенсификация ПОЛ наблюдалась при гидропонном воздействии НЧ серебра на модельные растения *A. thaliana* [152], а также растения риса [102] и маша [109]. В упомянутой ранее работе [63] при воздействии на растения репчатого лука НЧ серебра, стабилизированных ЦТАБ, ПВП и цитратом было обнаружено, что высокие концентрации (более 50 мкМ) НЧ серебра вызывают повреждения ДНК, при этом степень повреждения коррелирует с концентрацией АФК.

Направление воздействия АФК в организме растения определяется хрупким окислительно-восстановительным равновесием между производством молекул АФК и их утилизацией за счет действия антиокислительной системы, состоящей из ферментных и неферментных антиоксидантов [153]. К ферментным антиоксидантам относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатион-редуктаза (ГР), аскорбат-пероксидаза (АПО) и др. [154]. В большинстве исследований, посвященных влиянию НЧ серебра на растения, отмечается изменение активности указанных антиоксидантных ферментов (табл. 4). Так, в работе [155] было показано, что при введении НЧ серебра в МС-среду при выращивании растений табака, в их ростках наблюдается повышение активности СОД, которое коррелирует со снижением окислительного стресса. В работе [156] в схожих условиях было изучено воздействие ионов и НЧ

Таблица 4. Влияние наночастиц (НЧ) Ag на про-/антиоксидантный баланс у растений

Вид растения	Стабилизатор НЧ	Размер НЧ, нм	Способ воздействия	Концентрация НЧ, мг/л	Влияние на про-/антиоксидантный баланс	Ссылка
<i>Allium cepa</i>	Цитрат, ПВП, ЦТАБ		Корни, гидропоника	$2.7 \times 10^{-3} - 0.011$	Увеличение содержания АФК, снижение активности АПО, снижение активности КАТ в клетках корней	[63]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		9	Корни, твердая питательная среда	0.2–3	Увеличение экспрессии генов ферментов СОД, КАТ, АПО и ГПО (максимальное при 0.2–0.5 г/л НЧ Ag. Дальнейшее увеличение концентрации приводит к снижению экспрессии генов ферментов)	[96]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		41 ± 1.5	Корни	300–3000	Увеличение содержания H ₂ O ₂ в клетках при концентрации НЧ серебра ≥ 500 мг/л. Отсутствие влияния при меньших концентрациях	[97]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		20	Корни, гидропоника	0.5–1	Увеличение содержания малонового диальдегида (маркер перекисного окисления липидов), активности GR и глутатион-трансферазы в ростках	[152]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ПВП	20	Корни, твердая питательная среда	1–20	Увеличение регуляции генов ферментов СОД, ПО и оксидазы, а также других генов связанных с окислительным стрессом	[113]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		47 ± 7 (треугольной формы); 8 ± 2 (сферические); 45 ± 5 (десятигранные)	Корни, твердая питательная среда	10	Увеличение содержания СОД в ростках (наиболее выражено для сферических НЧ Ag)	[74]
<i>Brassica juncea</i>	Цитрат	29	Корни, твердая питательная среда	25–400	Увеличение активности КАТ и АПО, снижение содержания H ₂ O ₂ и малонового диальдегида (максимальное при 25–50 мг/л НЧ Ag)	[76]

<i>Brassica sp.</i>	Экстракт <i>Aloe vera</i>	47	Корни, гидропоника	100–325	Снижение активности АПО и КАТ, увеличение окислительных повреждений корней растений	[98]
<i>Sajanus sajan</i>	Цитрат	20	Корни, гидропоника	0.13×10^{-3}	Снижение содержания H_2O_2 , $\text{O}_2^{\times-}$, малонового диальдегида, окисленной формы глутатиона. Увеличение содержания восстановленной формы глутатиона	[78]
<i>Capsicum annuum</i>	Цитрат	14.1 ± 8.7	Корни, гидропоника/ почва	0.1–1	Увеличение содержания H_2O_2 в листьях, повышение показателей перекисного окисления липидов при концентрации НЧ Ag ≥ 1 мг/л	[99]
<i>Erusa sativa</i>	ПВП	14 ± 0.3	Нанопрайминг	0.1–100	Увеличение регуляции генов кодирующих ферменты СОД и ПО	[114]
<i>Glycine max</i>	ПГМБ	6 ± 1	Нанопрайминг и листья	1.25–3.75 (нанопрайминг) 0.067–0.2 (листья)	Увеличение активности ПФО и ПО в листьях, снижение активности этих ферментов в корнях	[81]
<i>Lemna gibba</i>		50	Корни	0–10	Увеличение содержания АФК в клетках	[101]
<i>Lemna polyrhiza</i>	Гуммиарабик	6	Корни, гидропоника	0.5–10	Увеличение содержания АФК, увеличение активности СОД, КАТ и ПО	[133]
	ПВП	20		10	Увеличение содержания малонового диальдегида и глутатиона	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Цитрат	50	Корни, твердая питательная среда		Увеличение активности АФК, содержания малонового диальдегида, активности СОД, АПО в проростках. Смешанное влияние на активность КАТ (в зависимости от концентрации НЧ Ag)	[155]

Вид растения	Стабилизатор НЧ	Размер НЧ, нм	Способ воздействия	Концентрация НЧ, мг/л	Влияние на про-/антиоксидантный баланс	Ссылка
<i>Oryza sativa</i>		20	Корни, гидропоника	0.2–1	Увеличение содержания H_2O_2 и малонового диальдегида в корнях и листьях растений при концентрации НЧ $Ag \geq 0.5$ мг/л. Изменение уровней экспрессии генов, кодирующих ферменты СОД, КАТ, АПО (различается для разных ферментов и зависит от концентрации НЧ Ag и исследуемой части растения)	[102]
<i>Ricinus communis</i>	ПВП	70 ± 4.9	Корни	500–4000	Увеличение активности КАТ, СОД и ПО в проростках (максимальное при концентрации 1000–2000 мг/л НЧ Ag)	[185]
<i>Solanum lycopersicum</i>	–		Корни, гидропоника	100–1000	Увеличение активности СОД при концентрации НЧ $Ag \geq 1000$ мг/л	[104]
<i>Solanum tuberosum</i>		20	Корни, твердая питательная среда	2–20	Увеличение содержания $O_2^{\cdot -}$ и общего содержания АФК в листьях растений. Увеличение активности СОД, КАТ, АПО (максимальное при 10 мг/л НЧ Ag). Увеличение активности ГР при 2–10 мг/л НЧ Ag , снижение активности ГР при более высоких концентрациях. Снижение содержания аскорбата и восстановленной формы глутатиона. Увеличение содержания дегидроаскорбата и окисленной формы глутатиона	[156]
<i>Solanum tuberosum</i>	ПГМБ	4.9 ± 2.7	Предпосевная обработка клубней, листья	5 (предпосевная обработка), 0.33 (листья)	Увеличение активности КАТ, ПФО и ПО	[36]
<i>Triticum aestivum</i>	Без стабилизатора	10	Корни, почва	0.5–5	Увеличение содержания окисленной формы глутатиона	[106]

<i>Triticum aestivum</i>	Выделены из грибов <i>Aspergillus terreus</i>	15–29	Нанопрайминг	0.22–1.08	Увеличение содержания малонового диальдегида и H_2O_2 в проростках (при концентрации НЧ Ag ≥ 0.5 –1 мг/л). Снижение этих показателей в сравнении растениями подвергшихся солевому стрессу. Снижение активности ПО и увеличение активности КАТ	[91]
<i>Triticum aestivum</i>	Экстракт растений <i>Moringa oleifera</i>		Листья	25–100	Снижение повышенной активности СОД, КАТ и ПО, вызванной действием на растения фитопатогена <i>Ricinia striiformis</i> (максимальное при 75 мг/л НЧ Ag)	[93]
<i>Vigna radiata</i>		20	Корни, твердая питательная среда	5–50	Отсутствие влияния на содержание H_2O_2 в стебле растений. Увеличение содержания H_2O_2 в корнях при концентрации НЧ Ag ≥ 20 мг/л	[109]
<i>Solanum tuberosum</i>	ПГМБ	6 ± 1 Нанопрайминг, листья Листья	Предпосевная обработка клубней, листья	2.5–5 (предпосевная обработка), 125×10^{-3} (листья)	Увеличение активности КАТ, снижение активности ПФО	[46]
<i>Triticum aestivum</i>			2–4 (нанопрайминг), 0.067–0.133 (листья)	Увеличение активности КАТ. Нет влияния на активность ПФО		
<i>Malus</i>			0.075–0.125	Увеличение активности КАТ, ПФО		
<i>Glycine max</i>	ПВП	17	Корни (почва) и листья 0.5–1 (корни), 1–30 (листья)	1–30	Увеличение содержания малонового диальдегида и H_2O_2 в листьях (более выраженное в случае корневого воздействия)	[110]
<i>Oryza sativa</i>				Увеличение содержания малонового диальдегида и H_2O_2 в стеблях (более выраженное в случае корневого воздействия)		

серебра с точки зрения накопления серебра, производства АФК и реакции на окислительный стресс системы антиоксидантной защиты растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.). Авторы обнаружили, что при повышении концентрации серебра в питательной среде от 0 до 10 мг/л происходит постепенное увеличение содержания серебра в тканях растения, что сопровождается ростом концентрации АФК, а также активности ферментов СОД, КАТ, ГР и АПО. Однако, при дальнейшем повышении концентрации серебра в питательной среде до 20 мг/л происходило резкое увеличение концентрации АФК в тканях растения, которое сопровождалось снижением активности указанных антиокислительных ферментов, что свидетельствует о серьезном повреждении антиоксидантной системы. В нашем исследовании внекорневые обработки дисперсиями НЧ серебра, стабилизированных гидрохлоридом полигексаметиленбигуанида (ПГМБ) в концентрации 330 мкг/л, приводили к увеличению активности ферментов пероксидазы (ПО), КАТ и полифенолоксидазы (ПФО) в листьях растений картофеля [36].

Таким образом, в зависимости от концентрации, АФК могут играть в организме растения как роль сигнальной молекулы, активирующей каскады реакций свойственных нормальному метаболизму и развитию растительного организма, так и быть опасным и даже губительным источником развития окислительного стресса. В невысоких концентрациях АФК выступают факторами регуляции стрессовых реакций растений, что может благотворно сказываться на их развитии, особенно в условиях наличия негативных факторов внешней среды. В более высоких же концентрациях, АФК вызывают окислительный стресс и связанные с ним негативные процессы окисления внутриклеточных компонентов. Вероятно, указанная разнонаправленность влияния АФК на растительный организм, в зависимости от их концентрации и является одной из основной причин, обуславливающей экстремальный характер концентрационной зависимости изменений морфометрических параметров растений при их взаимодействии с наносеребром (табл. 3).

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ

Другими часто исследуемыми параметрами, характеризующими общее состояние организма растения и его способность к росту и развитию в условиях взаимодействия с НЧ серебра, являются содержание и показатели флуоресценции хлорофилла. Выбор хлорофилла в качестве биологического маркера последствий взаимодействия НЧ серебра и растений обусловлен

ключевой ролью этого пигмента в процессе фотосинтеза, протекание которого в свою очередь крайне чувствительно к неблагоприятным условиям воздействия окружающей среды [157]. В табл. 5 представлены результаты экспериментальных работ по исследованию изменений содержания и флуоресценции хлорофилла, а также других показателей, связанных с работой фотосинтетического аппарата высших растений при их взаимодействии с НЧ серебра.

В многочисленных исследованиях было показано, что введение НЧ серебра в гидропонную среду или МС-среду в концентрациях от 0.2 до 300 мг/л при выращивании растений *A. thaliana* приводит к снижению общего содержания и флуоресценции хлорофилла [95–97]. Однако влияние НЧ серебра на содержание и активность хлорофилла в других высших растениях не так однозначно. В работе [102] введение в гидропонную среду НЧ серебра размером ~20 нм в концентрации до 1 мг/л приводило к дозозависимому снижению содержания хлорофилла в проростках риса (*Oryza sativa* L.). Авторы исследования связывают наблюдаемый эффект с избыточным ПОЛ мембран хлоропластов, что подтверждается увеличением концентрации пероксида водорода в проростках при воздействии НЧ серебра. Аналогичные данные по дозозависимому снижению содержания хлорофилла при введении в гидропонный раствор НЧ серебра были получены для растений капусты *Brassica* sp. [98]. Помимо снижения общего содержания хлорофилла, авторы также отмечают снижение показателей его флуоресценции, таких как фотохимическое тушение qP и отношение переменной и максимальной флуоресценции, что свидетельствует о снижении эффективности процесса фотосинтеза. Важно отметить, что общее снижение содержания хлорофилла в работе [98] составило около 25%, в то время как в работе [102] оно составило ~50%, несмотря на значительно меньшую концентрацию используемых НЧ серебра (1 и 325 мг/л, соответственно). Вероятно, причина наблюдаемых различий в активности НЧ серебра заключается в том, что в работе [102] использовались НЧ значительно меньшего размера, чем в работе [98] (20 и 47 нм, соответственно). Другим возможным объяснением может служить различие в чувствительности растений риса и капусты к действию НЧ серебра. В работе [94] воздействие на растения пшеницы НЧ серебра размером 2–10 нм, покрытых хитозаном, оказывало положительное влияние на содержание хлорофилла в тканях растений. В другом исследовании изучалось влияние ионов и НЧ серебра, размером 20–30 нм стабилизированных экстрактом дрожжей (в концентрациях до 100 мг/л), при выращивании растений пшеницы и подсолнечника [158]. Было показано, что

воздействие ионов серебра приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции хлорофилла и показателя в тканях исследуемых видов, а воздействие НЧ серебра практически не оказывает негативного влияния на эти параметры. Более того, на некоторых фазах развития растений подсолнечника при воздействии НЧ серебра наблюдалось увеличение эффективности фотохимических реакций, отражаемое в увеличении значений показателя. Наконец, в работе [123] исследовалось влияние НЧ серебра диаметром 20 ± 10 нм на растения фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) при введении НЧ в почву в концентрациях 0–100 мг/кг. Было показано, что зависимость содержания хлорофилла от концентрации серебра в почве имела экстремальный характер и проходила через максимум при содержании НЧ серебра в диапазоне 20–60 мг/кг для обоих видов растений. Таким образом, в результате анализа литературных данных можно сделать вывод о том, что направление и уровень влияния НЧ серебра на процессы фотосинтеза, выражаемое в виде изменения содержания и параметров флуоресценции хлорофилла, зависит от ряда факторов, таких как вид растения, концентрация, размеры и другие физико-химические свойства НЧ, а также условий проведения эксперимента.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА РЕГУЛЯЦИЮ БЕЛКОВ И ГОРМОНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ

Важной вехой в понимании молекулярных механизмов взаимодействия НЧ серебра и растений стало привлечение протеомных исследований, связанных с количественным анализом изменений регуляции клеточных белков. Исследования протеомного ответа растений на воздействия НЧ серебра были впервые применены Vannini с соавт. [114], которые методом двумерного электрофореза изучали протеомный ответ растений рукколы (*Eruca sativa* Mill.) после 4-часовой обработки их семян водной дисперсией НЧ серебра, стабилизированных ПВП в концентрации 10 мг/л. Затем аналогичные исследования были проведены тем же коллективом авторов на растениях пшеницы (*Triticum aestivum* L.) [107]. В результате проведения протеомного анализа авторами было установлено несколько путей воздействия НЧ серебра на клетки высших растений. Так, обнаружено, что НЧ серебра оказывают существенное влияние на первичный клеточный метаболизм, связанный с основными жизненно важными клеточными процессами, такими как дыхание, фотосинтез, синтез нуклеиновых кислот, белков и липидов. В тканях растений пшеницы существенно возросло содержание ферментов, участвующих

в энергетическом обмене, таких как альфа-амилаза (участвует в гидролизе крахмала и других полисахаридов), фруктозобисфосфат-(фруктозодифосфат)-альдозаза (катализирует реакцию расщепления фруктозо-дифосфата) и аконитазы (катализирует реакцию изомеризации цитрата в цикле Кребса).

Увеличение содержания ферментов, участвующих в энергетическом обмене, приводит к выделению большего количества энергии, которая необходима для обеспечения окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках растений в ответ на стрессовое воздействие оказываемое НЧ серебра [107, 114]. Такая активация энергетического обмена в тканях растения может способствовать ускорению многих клеточных процессов синтеза различных веществ и в результате оказывать ростостимулирующий эффект. Однако, слишком большие энергетические затраты на обеспечение защитных реакций, напротив, могут приводить к замедлению роста. В таком случае можно предположить, что относительно небольшое ускорение энергообменных реакций, реализуемое в присутствии сравнительно малых концентраций НЧ серебра, может приводить к активации дыхания, фотосинтеза и синтеза различных клеточных компонентов. Напротив, интенсивный метаболический ответ растения на воздействие более высоких концентраций НЧ серебра приведет к слишком большим энергетическим затратам на преодоление оказываемого стресса и, в итоге, замедлению развития и роста. Авторы также отмечают снижение регуляции белка HCF136, необходимого для биогенеза фотосистемы, что хорошо коррелирует с ранее описанными данными по снижению содержания и показателей флуоресценции хлорофилла в различных видах растений при воздействии на них НЧ серебра. Вышеизложенные процессы также хорошо согласуются, с описанными ранее концентрационными зависимостями между морфометрическими параметрами растений, а также содержанием хлорофилла в их тканях при воздействии НЧ серебра в различных концентрациях, обнаруженными, например, в исследовании [123] для растений фасоли и кукурузы.

Кроме того, Vannini с соавт. обнаружили существенные изменения в регуляции белков, отвечающих за клеточную защиту растений от воздействий ионов металлов и АФК [107, 114]. В растениях пшеницы и рукколы возрастало содержание ферментов, участвующих в биосинтезе серосодержащей аминокислоты цистеина, которая способна хелатировать и деактивировать с биологической точки зрения ионы и НЧ серебра [159], а также является составляющей частью глутатиона, ключевого субстрата оксидаз, участвующих в деактивации АФК.

Таблица 5. Влияние наночастиц (НЧ) Ag на фотосинтетический аппарат

Вид растения	Стабилизатор НЧ	Размер НЧ, нм	Способ воздействия	Концентрация НЧ, мг/л	Влияние на фотосинтетический аппарат	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Цитрат	10	Корни, гидропоника	1–2.5	Снижение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> и общего хлорофилла. Снижение показателей флуоресценции хлорофилла	[95]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		9	Корни, твердая питательная среда	0.2–3	Снижение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> и общего хлорофилла. Небольшие изменения в структуре хлоропластов	[96]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		41 ± 1.5	Корни	300–3000	Снижение показателя F_v/F_m	[97]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		47 ± 7 (треугольной формы); 8 ± 2 (сферические); 45 ± 5 (десятигранные)	Корни, твердая питательная среда	10	Увеличение регуляции протохлорофиллид оксидоредуктазы, участвующей в биогенезе хлорофилла	[74]
<i>Brassica juncea</i>	Цитрат	29	Корни, твердая питательная среда	25–400	Увеличение содержания хлорофилла <i>a</i> и общего содержания хлорофилла (максимальное при 100 мг/л НЧ Ag). Увеличение F_v/F_m (максимальное при 25 мг/л НЧ Ag), снижение F_v/F_m при концентрациях НЧ Ag > 200 мг/л. Нет влияние на содержание хлорофилла <i>b</i>	[76]
<i>Brassica juncea</i>	α-амилаза		Корни, гидропоника	100–1000	Увеличение содержания хлорофилла (максимальное при 1000 мг/л НЧ Ag)	[77]
<i>Brassica sp.</i>	Экстракт <i>Aloe vera</i>	47	Корни, гидропоника	100–325	Снижение общего содержания хлорофилла и каротиноидов. Снижение показателей F_v/F_m , qP и рост показателя нефотохимического тушения флуоресценции NPQ	[98]
<i>Capsicum annuum</i>	Цитрат	14.1 ± 8.7	Корни, гидропоника/ почва	0.1–1	Снижение содержания хлорофилла <i>a</i> и хлорофилла <i>b</i> (более выражено в условиях гидропоники). Увеличение содержания каротиноидов при 0.1 мг/л НЧ Ag. Снижение содержания каротиноидов при более высоких концентрациях НЧ Ag	[99]
<i>Lactuca sativa</i>	Без стабилизатора		Листья	0.001–0.1	Нет влияния на содержание хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> и каротиноидов	[115]
<i>Oryza sativa</i>		20	Корни, гидропоника	0.2–1	Снижение общего содержания хлорофилла и каротиноидов	[102]
<i>Oryza sativa</i>		18.3	Корни, почва	30–60	Увеличение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> и каротиноидов	[117]

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Цитрат	10	Нанопрайминг	0.25–2.5	Увеличение общего содержания хлорофилла в листьях растений и увеличение скорости нетто-фотосинтеза при концентрации НЧ Ag ≤ 1.25 мг/л. Снижение этих показателей при более высоких концентрациях	[83]
<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Zea mays</i>	–	10–30	Корни, почва	20–100	Увеличение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> , общего хлорофилла и каротиноидов при 20–60 мг/л НЧ Ag. Снижение этих показателей при больших концентрациях	[123]
<i>Physcomitrella patens</i>	Без стабилизатора	37 $\pm$ 4	Корни	5–10	Увеличение содержания хлорофилла <i>a</i> (максимальное при 10 мг/л НЧ Ag). Снижение содержания хлорофилла <i>b</i> , а также тилакоидов в хлоропластах	[84]
	ПВП	29 $\pm$ 6.3			Снижение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> , а также тилакоидов в хлоропластах	
	Цитрат	21.5 $\pm$ 4.2			Нет влияния на содержание хлорофилла <i>a</i> . Снижение содержания хлорофилла <i>b</i> , а также тилакоидов в хлоропластах	
<i>Quercus robur</i>	–	–	Листья	5–50	Изменения в микроструктуре хлоропластов (повышенное содержание крахмала)	[119]
<i>Solanum lycopersicum</i>	АПГТМ	17–31	Листья	100	Увеличение скорости нетто-фотосинтеза	[86]
<i>Solanum lycopersicum</i>	–	–	Нанопрайминг	50–5000	Снижение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> и общего хлорофилла	[104]
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Цитрат	–	Листья	20–60	Увеличение содержания хлорофилла <i>a</i> и хлорофилла <i>b</i> (максимальное при 40 мг/л НЧ Ag)	[88]
<i>Triticum aestivum</i>	Выделены из грибов <i>Aspergillus terreus</i>	15–29	Нанопрайминг	0.22–1.08	Увеличение общего содержания хлорофилла (максимальное при 0.54 мг/л НЧ Ag)	[91]
<i>Triticum aestivum</i>	Экстракт растений <i>Moringa oleifera</i>	–	Листья	25–100	Увеличение содержания хлорофилла <i>a</i> , хлорофилла <i>b</i> и общего хлорофилла (максимальное при 75 мг/л НЧ Ag). Снижение содержания хлорофилла при более высоких концентрациях	[93]
<i>Triticum aestivum</i>	Хитозан	2–10	Нанопрайминг		Увеличение содержания хлорофилла.	[94]
<i>Vigna radiata</i>	–	20	Корни, твердая питательная среда	5–50	Снижение общего содержания хлорофилла при концентрации НЧ Ag ≥ 20 мг/л	[109]

Помимо этого, в растениях пшеницы отмечался рост содержания гликозилированных полипептидов, участвующих в биосинтезе полисахаридов клеточной стенки, а также некоторых хитиназ и других связанных с патогенезом белков, вовлеченных в защиту растений от биотического стресса. Увеличение регуляции белков семейства DUF642, участвующих в биосинтезе клеточной стенки, также наблюдалось при воздействии на арабидопсис НЧ золота [160]. **Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что подвергшиеся воздействию НЧ серебра растения активируют каскады защитных реакций, нацеленных на снижение негативного воздействия НЧ серебра за счет ограничения их поглощения при утолщении клеточной стенки и связывания выделяющихся ионов серебра внутри клетки или в апопласте клеточными экссудатами, а также активизации системы поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза.** Однако повышенная регуляция систем защиты от серебра приводит к активизации и смежных систем защиты растения, в том числе от факторов биогенной природы. Так, наблюдаемые изменения про-/антиоксидантного баланса и связанные с ним изменения продуцирования фитоалексинов и регуляции толщины клеточной стенки будут способствовать развитию системной приобретенной устойчивости к действию фитопатогенов у растений, подвергшихся воздействию НЧ серебра, выступающих, таким образом, в роли своеобразного экзогенного элиситора [161].

Схожие результаты по протеомному определению путей воздействия НЧ серебра на клетки растений были получены при исследовании влияния введения НЧ серебра в МС-среду в концентрации 100 мкМ при выращивании растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) [155]. В качестве маркеров ускорения первичного клеточного метаболизма, авторами было отмечено увеличение регуляции белка CF1 (субъединицы АТФ-синтазы), бета-карбоангидразы (фермента, катализирующего обратимое превращение HCO_3^- в CO_2), а также белков, связанных с гликолизом, таких как альдолаза, триозофосфатизомераза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и фосфоглицератмутаза. Как и в работах Vannini с соавт. [107, 114], авторы исследования [155] также обнаружили увеличение активности некоторых белков, связанных с реакцией растений табака на стресс, например, шаперонина Hsp70, связанного с защитой от тяжелых металлов [147], а также некоторых связанных с патогенезом белков, таких как фермент хитиназа, играющего важную роль в иммунном ответе растения на инвазию грибов. Кроме того, воздействие НЧ серебра на растения табака приводило к изменению регуляции белков, связанных с процессами трансляции и дальнейшей упаковкой белковых молекул. Так,

воздействие НЧ серебра приводило к увеличению регуляции РНК-связывающих белков и их прекурсоров, являющихся регуляторными факторами, контролирующими посттранскрипционный метаболизм РНК во время роста и развития растений и при их реакции на стресс [162, 163].

Среди белков, участвующих в сворачивании полипептидных звеньев, воздействие НЧ серебра приводило к увеличению активности циклофилина и некоторых других белков, катализирующих цис-транс изомеризацию — ключевую стадию при сворачивании полипептидных фрагментов [164]. Также результаты протеомных исследований позволили установить наличие связи при воздействии НЧ серебра на растения с их гормональной системой. В работе [74] было показано, что при воздействии НЧ серебра на растения *A. thaliana* происходят изменения в активности белков, связанных с фитогормонами, такими как ауксин, АБК и этилен, регулирующими процессы роста и развития корней и стеблей растений, а также созревания плодов.

За последнее десятилетие появились работы, посвященные изучению молекулярных механизмов влияния низких доз НЧ серебра (15 нм, 2–5 мг/л) на развитие проростков сои в стрессовых условиях вымокания (избыточной влаги) [165–167]. Известно, что вымокание оказывает весьма негативный эффект на развитие сои, особенно на начальных этапах и сопровождается гипоксией, дефицитом CO_2 , этилена и других сигнальных соединений, что приводит к нарушению нормального метаболизма и накоплению в клетках фитотоксичных метаболитов [168]. В этих работах был продемонстрирован положительный эффект от воздействия НЧ серебра на растения, находящиеся в условиях абиотического стресса. Изучение изменений транскриптомного и протеомного профилей показало, в частности, уменьшение активности глиоксалазы II, уменьшение экспрессии генов *алкогольдегидрогеназы 1* и *пируватдекарбоксилазы 3*, что может свидетельствовать о нивелировании эффекта гипоксии и уменьшении образования сопутствующих цитотоксичных метаболитов гликолиза (глиоксала и др.). В целом изменения в протеомном профиле проростков сои под действием НЧ серебра касались белков, ответственных за адаптивный ответ на стресс, сигнальные функции и клеточный метаболизм [165, 166]. Такие изменения являлись причиной метаболических сдвигов, характерных для функционирования растительных клеток в нормальных условиях, что приводило к положительному эффекту на рост и развитие растений сои в условиях стресса [167].

В середине 70-х годов прошлого века было надежно установлено [169], что в растительном организме к наиболее подверженным действию

серебра относятся физиологические процессы, регулируемые фитогормоном этиленом. В настоящем обзоре мы намеренно не касаемся этой темы, поскольку она давно и детально проработана, однако не упомянуть об этом было бы неверно. Зачастую наблюдаемое биологическое действие ионов серебра в низких и средних дозах — это действие ингибитора отклика растения на этилен [170, 171]. Считается, что именно блокированием отклика рецепторов на действие этилена обусловлено, в частности, замедление увядания срезанных цветов, обработанных солями серебра. Разумеется, аналогичными путями воздействия будут обладать и НЧ серебра, генерация ионов Ag^+ с поверхности которых активно происходит в ходе окислительного растворения НЧ, в том числе, и внутри растительного организма [56].

С другой стороны, наносеребро, как было показано ранее, стимулирует рост стебля, корня и листьев (табл. 1), ветвление корней, а также способствует раннему цветению, предотвращает опадание листьев и увядание цветков. Наблюдаются и многие другие эффекты, традиционно ассоциируемые с ингибированием биосинтеза этилена или с уменьшением чувствительности растений к нему, в частности стимуляция транспорта ауксинов, усиление продуцирования биогенных полиаминов [172], что в свою очередь ускоряет пролиферацию клеток. Как хорошо известно, причиной такого действия серебра является способность Ag^+ вытеснять сходные по электронной структуре ионы Cu^+ из локализованного на клеточной мембране рецептора этилена ETR1 (Ethylene Receptor 1) [173]. Ионы меди и, в меньшей степени, ионы серебра способствуют связыванию этилена с клеточной мембраной. Тем не менее, ингибирование клеточного ответа на воздействие этилена позволяет заключить, что ионы серебра, даже способствуя связыванию этилена, нарушают нормальное функционирование рецептора, не позволяя ему передать сигнал клетке [174]. На основе анализа взаимодействия ионов меди и серебра с различными рецепторами этилена и их мутантными формами было показано, что рецепторы ETR1 с ионами серебра вместо ионов меди действительно хуже связывают этилен, но основная причина блокирования клеточного ответа на этилен состоит в том, что ионы Ag^+ более крупные, чем Cu^+ , поэтому блокируют изменение конформации рецептора, которое необходимо для дальнейшей передачи сигнала в клетку [175].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре проведен анализ опубликованных за последние два десятилетия экспериментальных работ, направленных на изучение физиологиче-

ских изменений в организме высших растений при их взаимодействии с НЧ серебра. Было показано, что при контакте с корнями или листьями растений НЧ серебра способны проникать в их ткани, а затем мигрировать по всему растительному организму по апопластному и симпластическому путям. При этом скорость поглощения НЧ серебра зависит от пути проникновения (через корень или через лист), морфометрических особенностей строения различных видов растений, физико-химических параметров НЧ, таких как средний диаметр и природа химического стабилизатора поверхности, а также условий окружающей среды.

Попадая в организм растения, НЧ вызывают внутриклеточные изменения в их тканях, среди которых: изменения про-/антиоксидантного баланса (увеличение концентрации АФК и изменение регуляции антиокислительных ферментов); ускорение первичного клеточного метаболизма (увеличение содержания ферментов, участвующих в энергетическом обмене, увеличение регуляции субъединиц АТФ-синтазы, а также белков, связанных с гликолизом); активация механизмов специфической защиты от металлов (увеличение регуляции аминокислоты цистеина, а также белка шаперона Hsp70, способных к хелатированию тяжелых металлов), регуляция концентрации фитогормонов и др. Описанные внутриклеточные изменения, в зависимости от условий эксперимента, способны приводить как к положительным, так и отрицательным изменениям ростовых параметров растений, а также параметров фотосинтеза. Кроме того, НЧ серебра способны вызывать утолщение клеточной стенки, изменения в регуляции хитиназ и других связанных с патогенезом белков. Это, в совокупности с описанными изменениями про-/антиоксидантного баланса в клетках растений, открывает перспективы для использования НЧ серебра в качестве экзогенного элиситора, способствующего развитию системной приобретенной устойчивости растений к факторам биотического стресса.

В результате проведенного анализа сделан вывод о том, что одним из ключевых факторов, определяющих направленность и величину влияния НЧ серебра на показатели высших растений является доза применяемых НЧ. Было показано, что наибольший положительный эффект удастся достигнуть при определенной концентрации НЧ серебра, при этом ее уменьшение может приводить к ослаблению полученных эффектов, а значительное увеличение и вовсе к негативному влиянию. Однако, такая оптимальная концентрация НЧ серебра может сильно, на 1–2 порядка, различаться в зависимости от других условий эксперимента. Важную роль играют природа НЧ серебра (размер

НЧ и тип поверхностного стабилизатора), особенности строения различных видов растений и условия окружающей среды. К настоящему времени проведено недостаточное количество исследований по определению изолированного вклада указанных факторов условий эксперимента на физиологию растений. Также, важно отметить, что большинство работ по изучению взаимодействия высших растений с НЧ серебра проводились в беспочвенных условиях с использованием молодых растений. Это накладывает существенные ограничения на возможность переноса полученных экспериментальных данных на реальные полевые условия на взрослые растения, ввиду значительных химических изменений, происходящих с НЧ серебра в почвах, приводящих к снижению их биологической активности, а также различной чувствительности растений к стрессовым факторам внешней среды в зависимости от стадии их развития и условий выращивания.

Кроме того, нами была впервые высказана гипотеза о ключевой роли пути воздействия НЧ серебра. Так, в представленной работе показано, что для обеспечения положительных эффектов, оказываемых НЧ серебра на рост и развитие растений, следует отдавать предпочтение листовым обработкам, которые, в сравнении с внесением НЧ в почву или питательные среды, намного чаще приводят к улучшению интегральных показателей. Другим перспективным методом воздействия является нанопрайминг, представляющий собой замачивание семян растений в разбавленных водных дисперсиях НЧ серебра.

Перспективными направлениями дальнейших исследований, с нашей точки зрения, являются изучение влияния и роли приведенных выше изолированных факторов эксперимента на физиологические изменения, происходящие в высших растениях на молекулярном, клеточном и морфологическом уровнях при их взаимодействии с НЧ серебра в лабораторных, а затем в почвенно-климатических условиях, максимально приближенным к реальным. Другим возможным направлением могут стать исследования, нацеленные на углубление в понимании биохимических процессов, происходящих при действии НЧ серебра на высшие растения, в том числе, с привлечением мультиомных методов исследований. Кроме того, особый интерес представляют исследования свойств НЧ серебра, стабилизированных молекулами веществ, проявляющих собственную биологическую активность и способных, таким образом, дополнять и усиливать ростостимулирующие и фитопротекторные эффекты, оказываемые НЧ серебра на растения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит ка-

ких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Malik S., Muhammad K., Waheed Y.* Nanotechnology: a revolution in modern industry // *Molecules*. 2023. V. 28. P. 661. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>
2. *Haleem A., Javaid M., Singh R. P., Shanay Rab S. R., Suman R.* Applications of nanotechnology in medical field: a brief review // *Global Health Journal*. 2023. V. 7. P. 70. <https://doi.org/10.1016/j.glohj.2023.02.008>
3. *Dawadi S., Katuwal S., Gupta A., Lamichhane U., Thapa R., Jaisi S., Lamichhane G., Bhattarai D. P., Parajuli N.* Current research on silver nanoparticles: synthesis, characterization, and applications // *J. Nanomater.* 2021. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2021/6687290>
4. *Krut'yakov Yu., Kudrinskiy A. A., Olenin A., Lisichkin G.* Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects // *Russ. Chem. Rev.* 2008. V. 77. P. 233. <https://doi.org/10.1070/RC2008v077n03ABEH003751>
5. *Bruna T., Maldonado-Bravo F., Jara P., Caro N.* Silver nanoparticles and their antibacterial applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 137202. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
6. *Hamad A., Khashan K. S., Hadi A.* Silver nanoparticles and silver ions as potential antibacterial agents // *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 2020. V. 30. P. 4811. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01744-x>
7. *Mussin J., Giusiano G.* Biogenic silver nanoparticles as antifungal agents // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 1023542. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1023542>
8. *Mansoor S., Zahoor I., Baba T. R., Padder S. A., Bhat Z. A., Koul A. M., Jiang L.* Fabrication of silver nanoparticles against fungal pathogens // *Front. Nanotechnol.* 2021. V. 3. P. 679358. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.679358>
9. *Ratan Z. A., Mashrur F. R., Chhoan A. P., Shahriar S. M., Haidere M. F., Runa N. J., Kim S., Kweon D. H., Hosseinzadeh H., Cho J. Y.* Silver nanoparticles as potential antiviral agents // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13: 2034. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122034>
10. *Luceri A., Francese R., Lembo D., Ferraris M., Balagna C.* Silver nanoparticles: review of antiviral properties, mechanism of action and applications // *Microorganisms*. 2023. V. 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030629>
11. *Lansdown A. B. G.* A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices // *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* 2010. V. 2010: 910686. <https://doi.org/10.1155/2010/910686>
12. *Souto E. B., Ribeiro A. F., Ferreira M. I., Teixeira M. C., Shimojo A. A. M., Soriano J. L., Naveros B. C., Durazzo A., Lucarini M., Souto S. B., Santini A.* New nanotechnologies for the treatment and repair of skin burns infections // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21: 393. <https://doi.org/10.3390/ijms21020393>

13. Spalek J., Ociepa P., Deptuła P., Piktel E., Daniluk T., Król G., Gózdź S., Bucki R., Okła S. Biocompatible materials in otorhinolaryngology and their antibacterial properties // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23: 2575. <https://doi.org/10.3390/ijms23052575>
14. Yin I.X., Zhang J., Zhao I.S., Mei M.L., Li Q., Chu C.H. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry // Int. J. Nanomedicine. 2020. V. 15. P. 2555. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
15. Waszczykowska A., Żyro D., Ochocki J., Jurowski P. Clinical application and efficacy of silver drug in ophthalmology: a literature review and new formulation of EYE drops with drug silver (I) complex of metronidazole with improved dosage form // Biomedicines. 2021. V. 9: 210. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020210>
16. Gurunathan S., Choi Y.J., Kim J.H. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles on endometritis caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in dairy cattle // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19: 1210. <https://doi.org/10.3390/ijms19041210>
17. Fytianos G., Rahdar A., Kyzas G.Z. Nanomaterials in cosmetics: recent updates // Nanomaterials. 2020. V. 10. P. 979. <https://doi.org/10.3390/nano10050979>
18. Deshmukh S.P., Patil S.M., Mullani S.B., Delekar S.D. Silver nanoparticles as an effective disinfectant: a review // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2019. V. 97. P. 954. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>
19. Kraśniewska K., Galus S., Gniewosz M. Biopolymers-based materials containing silver nanoparticles as active packaging for food applications – a review // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21: 698. <https://doi.org/10.3390/ijms21030698>
20. Krutyakov Y.A., Zherebin P.M., Kudrinskiy A.A., Zubavichus Y.V., Presniakov M., Yapryntsev A.D., Karabtseva A.V., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V. New frontiers in water purification: highly stable amphopolycarboxyglycinate-stabilized Ag–AgCl nanocomposite and its newly discovered potential // J. Phys. D Appl. Phys. 2016. V. 49: 375501. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/37/375501>
21. Gautam A., Komal P., Gautam P., Sharma A., Kumar N., Jung J.P. Recent trends in noble metal nanoparticles for colorimetric chemical sensing and micro-electronic packaging applications // Metals. 2021. V. 11: 329. <https://doi.org/10.3390/met11020329>
22. Usman M., Farooq M., Wakeel A., Nawaz A., Cheema S.A., Rehman H.U., Ashraf I., Sanaullah M. Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities // Sci. Total Environ. 2020. V. 721: 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
23. Mehmood A. Brief overview of the application of silver nanoparticles to improve growth of crop plants // IET Nanobiotechnol. 2018 V. 12. P. 701. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0273>
24. Mahajan S., Kadam J., Dhawal P. Barve S., Kakodkar S. Application of silver nanoparticles in in-vitro plant growth and metabolite production: revisiting its scope and feasibility // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2022. V. 150. P. 15. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02249-w>
25. Venzhik Y.V., Moshkov, I.E., Dykman L.A. Gold nanoparticles in plant physiology: principal effects and prospects of application // Russ. J. Plant. Physiol. 2021. V. 68. P. 401. <https://doi.org/10.1134/S1021443721020205>
26. Saylor Y., Irby V. Metal nanoparticles: properties, synthesis and applications // Nova Science Publishers, Inc. 2018. 352 p.
27. Selivanov N.Y., Selivanova O.G., Sokolov O.I., Sokolova M.K., Sokolov A.O., Bogatyrev V.A., Dykman L.A. Effect of gold and silver nanoparticles on the growth of the *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture // Nanotechnol. Russ. 2017. V. 12. P. 116. <https://doi.org/10.1134/S1995078017010104>
28. Venzhik Y.V., Deryabin A.N. The use of nanomaterials as a plant-protection strategy from adverse temperatures // Russ. J. Plant. Physiol. 2023. V. 70: 68. <https://doi.org/10.1134/S1021443723600344>
29. Venzhik Y.V., Deryabin A.N. Regulation of pro-/antioxidant balance in higher plants by nanoparticles of metals and metal oxides // Russ. J. Plant. Physiol. 2023. V. 70: 14. <https://doi.org/10.1134/S1021443722602312>
30. Venzhik Y., Deryabin A., Popov V., Dykman L., Moshkov I. Priming with gold nanoparticles leads to changes in the photosynthetic apparatus and improves the cold tolerance of wheat // Plant Physiol. Biochem. 2022. V. 190. P. 145. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.09.006>
31. Yang Q., Shan W., Hu L., Zhao Y., Hou Y., Yin Y., Liang Y., Wang F., Cai Y., Liu J., Jiang G. Uptake and transformation of silver nanoparticles and ions by rice plants revealed by dual stable isotope tracing // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 625. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02471>
32. Yang J., Cao W., Rui Y. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms // J. Plant Interact. 2017. V. 12. P. 158. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944>
33. Paul A., Roychoudhury A. Go green to protect plants: repurposing the antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles to combat phytopathogens // Nanotechnol. Environ. Eng. 2021. V. 6. P. 10. <https://doi.org/10.1007/s41204-021-00103-6>
34. Hernández-Díaz J.A., Garza-García J.J., Zamudio-Ojeda A., León-Morales J.M., López-Velázquez J.C., García-Morales S. Plant-mediated synthesis of nanoparticles and their antimicrobial activity against phytopathogens // J. Sci. Food Agric. 2021. V. 101. P. 1270. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10767>
35. Ansari M., Ahmed S., Khan M.T., Hamad N.A., Ali H.M., Abbasi A., Mubeen I., Intisar A., Hasan M.E., Jasim I.K. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of green synthesized silver nanoparticles against early blight in tomato // Horticulturae. 2023. V. 9: 369. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030369>
36. Krutyakov Yu. A., Khina A. G., Mukhina M. T., Shapoval O. A., Lisichkin G. V. Effect of treatment with colloidal

- silver dispersions stabilized with polyhexamethylene biguanide on the yield and biochemical parameters of potato plants in a field trial // *Nanobiotechnology Rep.* V. 18. P. 362. <https://doi.org/10.1134/S2635167623700246>
37. Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Häse C.C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. P. 2668. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2668-2670.2002>
 38. Yamanaka M., Hara K., Kudo J. // Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 7589. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7589-7593.2005>
 39. Sadoon A.A., Khadka P., Freeland J., Gundampati R.K., Manso R.H., Ruiz M., Krishnamurthi V.R., Thallapuram S.K., Chen J., Wang Y. // Silver ions caused faster diffusive dynamics of histone-like nucleoid-structuring proteins in live bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86: e02479-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-19>
 40. Park H.J., Kim J.Y., Kim J., Lee J.H., Hahn J.S., Gu M.B., Yoon J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity // *Water Res.* 2009. V. 43. P. 1027. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.002>
 41. Khina A.G., Krutyakov Y.A. Similarities and differences in the mechanism of antibacterial action of silver ions and nanoparticles // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. P. 683. <https://doi.org/10.1134/S0003683821060053>
 42. Krutyakov Y.A., Khina A.G. Bacterial resistance to nanosilver: molecular mechanisms and possible ways to overcome them // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. P. 493. <https://doi.org/10.1134/S0003683822050106>
 43. Siddiqi K. S., Husen, A. Plant response to silver nanoparticles: a critical review // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2022. V. 42. P. 973. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1975091>
 44. El-Temsah Y.S., Joner E.J. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil // *Environ. Toxicol.* 2012. V. 27. P. 42. <https://doi.org/10.1002/tox.20610>
 45. Yan A., Chen Z. Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: 1003. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
 46. Krutyakov Y.A., Kudrinsky A.A., Gusev A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Yaprntsev A.D., Zhrebina P.M., Shapoval O.A., Lisichkin G.V. Synthesis of positively charged hybrid PHMB-stabilized silver nanoparticles: the search for a new type of active substances used in plant protection products // *Mater. Res. Express.* 2017. V. 4: 075018. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa7a2e>
 47. Eichert T., Kurtz A., Steiner U., Goldbach H.E. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles // *Physiol. Plant.* 2008. V. 134. P. 151. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x>
 48. Eichert T., Goldbach H.E. Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway // *Physiol. Plant.* 2008. V. 132. P. 491. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01023.x>
 49. Hetherington A.M., Woodward F.I. The role of stomata in sensing and driving environmental change // *Nature.* 2003. V. 424. P. 901. <https://doi.org/10.1038/nature01843>
 50. He J., Zhang L., He S.Y., Ryser E.T., Li H., Zhang W. Stomata facilitate foliar sorption of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana* // *Environ. Pollut.* 2022. V. 292: 118448. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118448>
 51. Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi // *Ecotoxicology.* 2008. V. 17. P. 372. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
 52. Lv J., Christie P., Zhang Sh. Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges // *Environ. Sci. Nano.* 2019. V. 6. P. 41. <https://doi.org/10.1039/c8en00645h>
 53. Luu D.T., Maurel C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status // *Plant Cell Environ.* 2005. V. 28. P. 85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01295.x>
 54. Moscatelli A., Ciampolini F., Rodighiero S., Onelli E., Cresti M., Santo N., Idilli A. Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold // *J. Cell. Sci.* 2007. V. 120. P. 3804. <https://doi.org/10.1242/jcs.012138>
 55. Etcheberria E., Gonzalez P., Baroja-Fernandez E., Romero J.P. Fluid phase endocytic uptake of artificial nano-spheres and fluorescent quantum dots by sycamore cultured cells: evidence for the distribution of solutes to different intracellular compartments // *Plant Signal Behav.* 2006. V. 1. P. 196. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3142>
 56. Yang Q., Shan W., Hu L., Zhao Y., Hou Y., Yin Y., Liang Y., Wang F., Cai Y., Liu J., Jiang G. Uptake and transformation of silver nanoparticles and ions by rice plants revealed by dual stable isotope tracing // *Environ. Sci. Technol.* 2019. V. 53. P. 625. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02471>
 57. Geisler-Lee J., Wang Q., Yao Y., Zhang W., Geisler M., Li K., Huang Y., Chen Y., Kolmakov A., Ma X. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. // *Nanotoxicology.* 2013. V. 7. P. 323. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.658094>
 58. Ma Y., He X., Zhang P., Zhang Z., Ding Y., Zhang J., Wang G., Xie C., Luo W., Zhang J., Zheng L., Chai Z., Yang K. Xylem and phloem based transport of CeO₂ nanoparticles in hydroponic cucumber

- plants // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. P. 5215. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05998>
59. Zhang W.Y., Wang Q., Li M., Dang F., Zhou D.M. Nonselective uptake of silver and gold nanoparticles by wheat // Nanotoxicology. 2019. V. 13. P. 1073. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640909>
 60. Dang F., Wang Q., Cai W., Zhou D., Xing B. Uptake kinetics of silver nanoparticles by plant: relative importance of particles and dissolved ions // Nanotoxicology. 2020. V. 14. P. 654. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1735550>
 61. Wang J., Koo Y., Alexander A., Yang Y., Westerhof S., Zhang Q., Schnoor J.L., Colvin V.L., Braam J., Alvarez P.J. Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag at sublethal concentrations // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 5442. <https://doi.org/10.1021/es4004334>
 62. Thuesombat P., Hannongbua S., Akasit S., Chadchawan S. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2014. V. 104. P. 302. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.022>
 63. Cyjetko P., Milošić A., Domijan A.M., Vinković Vrček I., Tolić S., Peharec Štefanić P., Letofsky-Papst I., Tkalec M., Balen B. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2017. V. 137. P. 18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
 64. Zhu Z.J., Wang H., Yan B., Zheng H., Jiang Y., Miranda O.R., Rotello V.M., Xing B., Vachet R.W. Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. P. 12391. <https://doi.org/10.1021/es301977w>
 65. Souza L.R.R., Corrêa T.Z., Bruni A.T., da Veiga M.A.M.S. The effects of solubility of silver nanoparticles, accumulation, and toxicity to the aquatic plant *Lemna minor* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2021. V. 28. P. 16720. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11862-1>
 66. Noori A., Ngo A., Gutierrez P., Theberge S., White J.C. Silver nanoparticle detection and accumulation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) // J. Nanopart. 2020. V. 22. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04866-y>
 67. Spielman-Sun E., Avellan A., Bland G., Tappero R., Acerbo A., Unrine J., Giraldo J., Lowry G. Nanoparticle surface charge influences translocation and leaf distribution in vascular plants with contrasting anatomy // Environ. Sci. Nano. 2019. V. 6. P. 2508. <https://doi.org/10.1039/C9EN00626E>
 68. Zhu Z.J., Wang H., Yan B., Zheng H., Jiang Y., Miranda O.R., Rotello V.M., Xing B., Vachet R.W. Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. P. 12391. <https://doi.org/10.1021/es301977w>
 69. Li M., Dang F., Fu Q., Zhou D., Yin B. Effects of molecular-weight-fractionated natural organic matter on the phytoavailability of silver nanoparticles // Environ. Sci. Nano. 2018. V. 5. P. 969. <https://doi.org/10.1039/C7EN01173C>
 70. Wang P., Menzies N.W., Dennis P.G., Guo J., Forstner C., Sekine R., Lombi E., Kappen P., Bertsch P.M., Kopittke P.M. Silver nanoparticles entering soils via the wastewater-sludge-soil pathway pose low risk to plants but elevated Cl concentrations increase Ag bioavailability // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 8274. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01180>
 71. Wang D., Jaisi D.P., Yan J., Jin Y., Zhou D. Transport and retention of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in natural soils // Vadose Zone J. 2015. V. 14: vzj2015.01.0007. <https://doi.org/10.2136/vzj2015.01.0007>
 72. Santa Cruz J., Vasenev I., Gaete H., Peñaloza P., Krutyakov Yu., Neaman A. Metal ecotoxicity studies with artificially contaminated versus anthropogenically contaminated soils: literature review, methodological pitfalls and research priorities // Russ. J. Ecol. 2021. V. 52. P. 479. <https://doi.org/10.1134/S1067413621060126>
 73. Santa-Cruz J., Robinson B., Krutyakov Y.A., Shapoval O.A., Peñaloza P., Yáñez C., Neaman A. An assessment of the feasibility of phytoextraction for the stripping of bioavailable metals from contaminated soils // Environ. Toxicol. Chem. 2023. V. 42. P. 558. <https://doi.org/10.1002/etc.5554>
 74. Syu Y.Y., Hung J.H., Chen J.C., Chuang H.W. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression // Plant Physiol. Biochem. 2014. V. 83. P. 57. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.010>
 75. Evlakov P.M., Fedorova O.A., Grodetzskaya T.A., Zakharova O.V., Gusev A.A., Krutyakov Yu.A., Baranov O.Yu. Influence of copper oxide and silver nanoparticles on microclonal sprouts of downy birch (*Betula pubescens* Ehrh.) // Nanotechnol. Russ. 2020. V. 15. P. 476. <https://doi.org/10.1134/S1995078020040035>
 76. Sharma P., Bhatt D., Zaidi M.G., Saradhi P.P., Khanna P.K., Arora S. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 167. P. 2225. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9759-8>
 77. Pandey C., Khan E., Mishra A., Sardar M., Gupta M. Silver nanoparticles and its effect on seed germination and physiology in *Brassica juncea* L. (Indian mustard) // Adv. Sci. Lett. 2014. V. 20. P. 1673. <https://doi.org/10.1166/asl.2014.5518>
 78. Yadu B., Chandrakar V., Korram J., Satnam M.L., Kumar M., Keshavkant S. Silver nanoparticle modulates gene expressions, glyoxalase system and oxidative stress markers in fluoride stressed *Cajanus cajan* L. // J. Hazard Mater. 2018. V. 353. P. 44. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.061>
 79. Aqeel M., Khalid N., Nazir A., Irshad M.K., Hakami O., Basahi M.A., Alamri S., Hashem M., Noman A. Foliar application of silver nanoparticles mitigated nutritional and biochemical perturbations in chilli pepper fertigated with domestic wastewater //

- Plant Physiol. Biochem. 2023. V. 194. P. 470. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.005>
80. Rezvani N., Sorooshzadeh A., Farhadi N. Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress // Int. J. Agricult. Biosyst. Eng. 2012. V. 6. P. 519.
 81. Krutyakov Y.A., Mukhina M.T., Shapoval O.A., Zargar M. Effect of foliar treatment with aqueous dispersions of silver nanoparticles on legume-rhizobium symbiosis and yield of soybean (*Glycine max* L. Merr.) // Agronomy. 2022. V. 12: 1473. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061473>
 82. Hojjat S.S. Effect of interaction between Ag nanoparticles and salinity on germination stages of *Lathyrus sativus* L. // Open Acc. J. Envi. Soi. Sci. 2019. V. 2. P. 193. <https://doi.org/10.32474/OAJESS.2019.02.000132>
 83. Prażak R., Świącilo A., Krzepińko A., Michałek S., Arczewska M. Impact of Ag nanoparticles on seed germination and seedling growth of green beans in normal and chill temperatures // Agriculture. 2020. V. 10: 312. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080312>
 84. Liang L., Tang H., Deng Z., Liu Y., Chen X., Wang H. Ag nanoparticles inhibit the growth of the bryophyte, *Physcomitrella patens* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 164. P. 739. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.021>
 85. Yasur J., Rani P.U. Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology // Environ. Sci. Pollut. Res. 2013. V. 20. P. 8636. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1798-3>
 86. Zakharova O.V., Gusev A.A., Zherebin P.M., Skripnikova E.V., Skripnikova M.K., Ryzhikh V.E., Lisichkin G.V., Shapoval O.A., Bukovskii M.E., Krutyakov Yu.A. Sodium tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles suppress early and late blight of *Solanum lycopersicum* and stimulate the growth of tomato plants // BioNanoSci. 2017. V. 7. P. 692. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0406-2>
 87. Пашкевич Е.Б., Королев П.С., Пряхин Ю.Д., Крутяков Ю.А. Влияние фолитарной обработки дисперсиями стабилизированного коллоидного серебра на урожайность, качество, биохимические показатели картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и численность микроорганизмов в почве // Проблемы агрохимии и экологии. 2020. Т. 1. С. 42. <https://doi.org/10.26178/AE.2020.2019.4.013>
 88. Sadak M.S. Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*) // Bull. Natl. Res. Cent. 2019. V. 43. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0077-y>
 89. Jasim B., Thomas R., Mathew J., Radhakrishnan E.K. Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) // Saudi Pharm. J. 2017. V. 25. P. 443. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.09.012>
 90. Hojjat S.S., Hojjat H. Effect of nano silver on seed germination and seedling growth in fenugreek seed // Int. J. Food Eng. 2015. V. 1. P. 106. <https://doi.org/10.18178/ijfe.1.2.106-110>
 91. Mohamed A.K.S.H., Qayyum M.F., Abdel-Hadi A.M., Rehman R.A., Ali S., Rizwan M. Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat. // Arch. Agron. Soil Sci. 2017. V. 63. P. 1736. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1300256>
 92. Iqbal M., Raja N.I., Mashwani Z.U.R., Hussain M., Ejaz M., Yasmeen F. Effect of silver nanoparticles on growth of wheat under heat stress // Iran J. Sci. Technol. Trans. Sci. 2019. V. 43. P. 387. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0417-4>
 93. Sabir S., Arshad M., Ilyas N., Naz F., Amjad M.S., Malik Z., Khalil S. Protective role of foliar application of green-synthesized silver nanoparticles against wheat stripe rust disease caused by *Puccinia striiformis* // Green Process. Synth. 2022. V. 11. P. 29. <https://doi.org/10.1515/gps-2022-0004>
 94. Mondéjar-López M., López-Jimenez A.J., Ahrazem O., Gómez-Gómez L., Niza E. Chitosan coated – biogenic silver nanoparticles from wheat residues as green antifungal and nanoprimg in wheat seeds // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 225. P. 964. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.159>
 95. Ke M., Qu Q., Peijnenburg W.J.G.M., Li X., Zhang M., Zhang Z., Lu T., Pan X., Qian H. Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways // Sci. Total Environ. 2018. V. 644. P. 1070. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.061>
 96. Qian H., Peng X., Han X., Ren J., Sun L., Fu Z. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana* // J. Environ Sci. 2013. V. 25. P. 1947. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(12)60301-5)
 97. Sosan A., Svistunenko D., Straltsova D., Tsiurkina K., Smolich I., Lawson T., Subramaniam S., Golovko V., Anderson D., Sokolik A., Colbeck I., Demidchik V. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants // Plant J. 2016. V. 85. P. 245. <https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
 98. Vishwakarma K., Shweta, Upadhyay N., Singh J., Liu S., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Tripathi D.K., Sharma S. Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica* sp. // Front Plant Sci. 2017. V. 8: 1501. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501>
 99. Vinković T., Štolfá-Čamagajevac I., Tkalec M., Goessler W., Domazet Jurašin D., Vinković Vreck I. Does plant growing condition affects biodistribution and biological effects of silver nanoparticles? // Span. J. Agric. Res. 2018. V. 16: e0803. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018164-13580>
 100. Stampoulis D., Sinha S.K., White J.C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to

- plants // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. P. 9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
101. Oukarroum A., Barhoumi L., Pirastru L., Dewez D. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba* // Environ Toxicol. Chem. 2013. V. 32. P. 902. <https://doi.org/10.1002/etc.2131>
 102. Nair P.M., Chung I.M. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings // Chemosphere. 2014. V. 112. P. 105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.056>
 103. Zuverza-Mena N., Armendariz R., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 90. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00090>
 104. Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J., Lee E.J. Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2013. V. 93. P. 60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033>
 105. Yang J., Jiang F., Ma C., Rui Y., Rui M., Adeel M., Cao W., Xing B. Alteration of crop yield and quality of wheat upon exposure to silver nanoparticles in a life cycle study // J. Agric. Food Chem. 2018. V. 66. P. 2589. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04904>
 106. Dimkpa C.O., McLean J.E., Martineau N., Britt D.W., Haverkamp R., Anderson A.J. Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 1082. <https://doi.org/10.1021/es302973y>
 107. Vannini C., Domingo G., Onelli E., De Mattia F., Bruni I., Marsoni M., Bracale M. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings // J. Plant Physiol. 2014. V. 171. P. 1142. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.002>
 108. Abd-Alla M.H., Nafady N.A., Khalaf D.M. Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*-*Glomus aggregatum* symbiosis: implications for induction of autophagy process in root nodule // Agric. Ecosyst. Environ. 2016. V. 218. P. 163. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.11.022>
 109. Nair P.M.G., Chung I.M. Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.) // Acta Physiol. Plant. 2015. V. 37. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1719-1>
 110. Li C.C., Dang F., Li M., Zhu M., Zhong H., Hintelmann H., Zhou D.M. Effects of exposure pathways on the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice // Nanotoxicology. 2017. V. 11. P. 699. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1344740>
 111. Pokhrel L.R., Dubey B. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles // Sci. Total Environ. 2013. V. 452. P. 321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.059>
 112. Lee W.M., Kwak J.I., An Y.J. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity // Chemosphere. 2012. V. 86. P. 491. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.013>
 113. Kaveh R., Li Y.S., Ranjbar S., Tehrani R., Brueck C.L., Van Aken B. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 10637. <https://doi.org/10.1021/es402209w>
 114. Vannini C., Domingo G., Onelli E., Prinsi B., Marsoni M., Espen L., Bracale M. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate // PLoS One. 2013. V. 8: e68752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068752>
 115. Larue C., Castillo-Michel H., Sobanska S., Cécillon L., Bureau S., Barthès V., Ouerdane L., Carrière M., Sarret G. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation // J. Hazard Mater. 2014. V. 264. P. 98. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>
 116. Al-Huqail A.A., Hatata M.M., Al-Huqail A.A., Ibrahim M.M. Preparation, characterization of silver phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. P. 319. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.013>
 117. Mirzajani F., Askari H., Hamzelou S., Farzaneh M., Ghassempour A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2013. V. 88. P. 48. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.018>
 118. Parveen A., Rao S. Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum* // J. Clust. Sci. 2015. V. 26. P. 693. <https://doi.org/10.1007/s10876-014-0728-y>
 119. Olchowik J., Bzdyk R.M., Studnicki M., Bederska-Błaszczak M., Urban A., Aleksandrowicz-Trzcńska M. The effect of silver and copper nanoparticles on the condition of english oak (*Quercus robur* L.) seedlings in a container nursery experiment // Forests. 2017. V. 8: 310. <https://doi.org/10.3390/f8090310>
 120. Almutairi Z. Influence of silver nano-particles on the salt resistance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) during germination // Int. J. Agricult. Biol. 2016. V. 18. P. 449. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0114>
 121. Mansureh G. Effect of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth in *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak under salinity stress // J. Range. Sci. 2018. V. 8. P. 93.
 122. Almutairi Z.M., Alharbi A. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants // J. Adv. Agricult. 2015. V. 4. P. 280.
 123. Salama H.M. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.) // Int. Res. J. Biotechnol. 2012. V. 3. P. 190.
 124. Pallavi M.C., Srivastava R., Arora S., Sharma A.K. Impact assessment of silver nanoparticles on plant

- growth and soil bacterial diversity // 3 Biotech. 2016. V. 6: 254. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0567-7>
125. Yin L., Colman B.P., McGill B.M., Wright J.P., Bernhardt E.S. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants // PLoS One. 2012. V. 7: e47674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047674>
 126. Landa P. Positive effects of metallic nanoparticles on plants: overview of involved mechanisms // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 161. P. 12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.039>
 127. Venzhik Y., Deryabin A., Popov V., Dykman L., Moshkov I. Gold nanoparticles as adaptogens increasing the freezing tolerance of wheat seedlings // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. V. 29. P. 55235. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19759-x>
 128. Mittler R., Zandalinas S.I., Fichman Y., Van Breusegem F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2022. V. 23. P. 663. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00499-2>
 129. Zou L., Wang J., Gao Y., Ren X., Rottenberg M.E., Lu J., Holmgren A. Synergistic antibacterial activity of silver with antibiotics correlating with the upregulation of the ROS production // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 11131. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29313-w>
 130. Costa C.S., Ronconi J.V., Daufenbach J.F., Gonçalves C.L., Rezin G.T., Streck E.L., Paula M.M. In vitro effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain // Mol. Cell. Biochem. 2010. V. 342. P. 51. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0467-9>
 131. Flores-López L.Z., Espinoza-Gómez H., Somanathan R. Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review // J. Appl. Toxicol. 2019. V. 39. P. 16. <https://doi.org/10.1002/jat.3654>
 132. He W., Zhou Y.T., Wamer W.G., Boudreau M.D., Yin J.J. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles // Biomaterials. 2012. V. 33. P. 7547. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.076>
 133. Jiang H.S., Qiu X.N., Li G.B., Li W., Yin L.Y. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* // Environ. Toxicol. Chem. 2014. V. 33. P. 1398. <https://doi.org/10.1002/etc.2577>
 134. Foyer C., Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context // Plant Cell Environ. 2005. V. 28. P. 1056. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
 135. Waszczak C., Carmody M., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling // Annu. Rev. Plant. Biol. 2018. V. 69. P. 209. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>
 136. Desikan R., A-H-Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress // Plant. Physiol. 2001. V. 127. P. 159. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.159>
 137. Neill S., Desikan R., Hancock J. Hydrogen peroxide signalling // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 388. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00282-0)
 138. Yan J., Tsuichihara N., Etoh T., Iwai S. Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening // Plant Cell Environ. 2007. V. 30. P. 1320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01711.x>
 139. Alabdallah N.M., Hasan M.M. Plant-based green synthesis of silver nanoparticles and its effective role in abiotic stress tolerance in crop plants // Saudi J. Biol. Sci. 2021. V. 28. P. 5631. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.081>
 140. Hashimoto T., Mustafa G., Nishiuchi T., Komatsu S. Comparative analysis of the effect of inorganic and organic chemicals with silver nanoparticles on soybean under flooding stress // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21: 1300. <https://doi.org/10.3390/ijms21041300>
 141. Lassig R., Guterth T., Bey T.D., Konrad K.R., Romeis T. Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth // Plant J. 2014. V. 78. P. 94. <https://doi.org/10.1111/tpj.12452>
 142. Boisson-Dernier A., Lituiev D.S., Nestorova A., Franck C.M., Thirugnanarajah S., Grossniklaus U. ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases // PLoS Biol. 2013. V. 11: e1001719. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001719>
 143. Kaya H., Nakajima R., Iwano M., Kanaoka M.M., Kimura S., Takeda S., Kawarazaki T., Senzaki E., Hamamura Y., Higashiyama T., Takayama S., Abe M., Kuchitsu K. Ca_v^{2+} -activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 1069. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120642>
 144. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M., Dolan L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // Nature. 2003. V. 422. P. 442. <https://doi.org/10.1038/nature01485>
 145. Glyan'ko A.K. Signaling systems of rhizobia (*Rhizobiaceae*) and leguminous plants (*Fabaceae*) upon the formation of a legume-rhizobium symbiosis // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 494. <https://doi.org/10.1134/S0003683815050063>
 146. Lamb C., Dixon R.A. The oxidative burst in plant disease resistance // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>
 147. Zanetti M.E., Terrile M.C., Arce D., Godoy A.V., Segundo B.S., Casalangué C. Isolation and characterization of a potato cDNA corresponding to a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene differentially activated by stress // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 2455. <https://doi.org/10.1093/jxb/>
 148. Devlin W.S., Gustine D.L. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the

- hypersensitive reaction // *Plant Physiol.* 1992. V. 100. P. 1189. <https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1189>
149. Roos G., Messens J. Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 51. P. 314. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031>
 150. Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishikawa A., Dixon R.A., Lamb C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity // *Cell.* 1998. V. 92. P. 773. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81405-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81405-1)
 151. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)
 152. Nair P.M., Chung I.M. Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014. V. 21. P. 8858. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2822-y>
 153. Sharma P., Jha A., Dubey R., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // *J. Bot.* 2012. V. 2012. P. 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
 154. Tkalec M., Peharec Štefanić P., Balen B. Phytotoxicity of silver nanoparticles and defense mechanisms // *Compr. Anal. Chem.* 2019. V. 84. P. 145. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.010>
 155. Štefanić P.P., Cvjetko P., Biba R., Domijan A.M., Letofsky-Papst I., Tkalec M., Šikić S., Cindrić M., Balen B. Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate // *Chemosphere.* 2018. V. 209. P. 640. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.128>
 156. Bagherzadeh Homae M., Ehsanpour A.A. Silver nanoparticles and silver ions: oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown *in vitro* // *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2016. V. 57. P. 544. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0083-z>
 157. Richardson A.D., Duigan S.P., Berlyn G.P. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content // *New Phytol.* 2002. V. 153. P. 185. <https://doi.org/10.1046/J.0028-646X.2001.00289.X>
 158. Pardha-Saradhi P., Shabnam N., Sharmila P., Ganguli A.K., Kim H. Differential sensitivity of light-harnessing photosynthetic events in wheat and sunflower to exogenously applied ionic and nanoparticulate silver // *Chemosphere.* 2018. V. 194. P. 340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.122>
 159. Gondikas A.P., Morris A., Reinsch B.C., Marinakos S.M., Lowry G.V., Hsu-Kim H. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation // *Environ. Sci. Technol.* 2012. V. 46. P. 7037. <https://doi.org/10.1021/es3001757>
 160. Ferrari E., Barbero F., Busquets-Fité M., Franz-Wachtel M., Köhler H.R., Puentes V., Kemmerling B. Growth-promoting gold nanoparticles decrease stress responses in *Arabidopsis* seedlings // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. P. 3161. <https://doi.org/10.3390/nano11123161>
 161. Kohan-Baghkheirati E., Geisler-Lee J. Gene expression, protein function and pathways of *Arabidopsis thaliana* responding to silver nanoparticles in comparison to silver ions, cold, salt, drought, and heat // *Nanomaterials.* 2015. V. 5. P. 436. <https://doi.org/10.3390/nano5020436>
 162. Lorković Z.J. Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.007>
 163. Lee K., Kang H. Emerging roles of RNA-binding proteins in plant growth, development, and stress responses // *Mol. Cells.* 2016. V. 39. P. 179. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2359>
 164. Kaur G., Singh S., Singh H., Chawla M., Dutta T., Kaur H., Bender K., Snedden W.A., Kapoor S., Pareek A., Singh P. Characterization of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase- and calmodulin-binding activity of a cytosolic *Arabidopsis thaliana* cyclophilin AtCyp19-3 // *PLoS One.* 2015. V. 10: e0136692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136692>
 165. Mustafa G., Sakata K., Hossain Z., Komatsu S. Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress // *J. Proteomics.* 2015. V. 122. P. 100. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.030>
 166. Mustafa G., Sakata K., Komatsu S. Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress // *J. Proteomics.* 2016. V. 148. P. 113. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.027>
 167. Hashimoto T., Mustafa G., Nishiuchi T., Komatsu S. Comparative analysis of the effect of inorganic and organic chemicals with silver nanoparticles on soybean under flooding stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21: 1300. <https://doi.org/10.3390/ijms21041300>
 168. Pezeshki S.R., DeLaune R.D. Soil oxidation-reduction in wetlands and its impact on plant functioning // *Biology.* 2012. V. 1. P. 196. <https://doi.org/10.3390/biology1020196>
 169. Beyer EM. A potent inhibitor of ethylene action in plants // *Plant Physiol.* 1976. V. 58. P. 268. <https://doi.org/10.1104/pp.58.3.268>
 170. Mohiuddin A., Chowdhury M., Abdullah Z.C., Suhaimi N. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1997. V. 51. P. 75. <https://doi.org/10.1023/A:1005814514409>
 171. Strader L.C., Beisner E.R., Bartel B. Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response // *Plant Cell.* 2009. V. 21. P. 3585. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065185>
 172. Aleksandrowicz-Trzcińska M., Olchowik J., Studnicki M., Urban A. Do silver nanoparticles stimulate the formation of ectomycorrhizae in seedlings of pedunculate oak (*Quercus robur* L.)? // *Symbiosis.* 2019. V. 79. P. 89. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00628-0>

173. Rodríguez F.I., Esch J.J., Hall A.E., Binder B.M., Schaller G.E., Bleeker A.B. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis* // Science. 1999. V. 283. P. 996. <https://doi.org/10.1126/science.283.5404.996>
174. Zhao X.C., Qu X., Mathews D.E., Schaller G.E. Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 1983. <https://doi.org/10.1104/pp.011635>
175. McDaniel B.K., Binder B.M. Ethylene receptor 1 (etr1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by silver in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 26094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.383034>

УДК 581.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯВЛЕНИЯ РЕЮВЕНИЛИЗАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЕГЕТАТИВНОГО ПОТОМСТВА ДРЕВЕСНЫХ

© 2024 г. В. Н. Шмаков^{a,*}, В. И. Бельков^{a, b}, Ю. М. Константинов^{a, b}^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Иркутский государственный университет”, Иркутск, Россия

*e-mail: vladwork70@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 05.07.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Вегетативное размножение обеспечивает возможность масштабирования ценного растительного материала в наиболее короткие сроки. Особую важность оно приобретает при разведении древесных культур с сохранением ценных биологических и морфологических сортовых особенностей отдельных особей. Использование такого подхода позволяет быстро размножать особо ценные произрастающие в парках и лесах растения, в то время как при семенном воспроизводстве не сохраняются их ценные наследственные признаки. В связи с этим создание и совершенствование надежных способов вегетативного размножения древесных видов не теряет своей актуальности. Как известно, вегетативное размножение деревьев достигается в ювенильной фазе развития, а не на стадии зрелости, что сильно ограничивает использование этого подхода. Такая ситуация может быть преодолена путем применения технологий, основанных на активном использовании реювенилизации — явления, биологическая природа которого на сегодняшний день остается недостаточно изученной. Тем не менее, накоплен значительный исследовательский опыт инициации реювенилизации, т.е. проведения процедур искусственного возвращения взрослых растений или отдельных их частей в юное состояние. В настоящей статье приводится обзор технологий, позволяющих реализовать процесс переключения стратегии развития растения с фазы зрелости к ювенильному состоянию. К ним относятся культивирование меристем, химическая обработка растительного материала, сильная обрезка и хеджирование, использование корневых отпрысков и коппинг, инициация развития пазушных и эпикормических почек, прививка и микропрививка, повторное субкультивирование, а также соматический эмбриогенез. Для дальнейшего успешного развития этого направления требуется применение комплексного подхода, основанного на совокупности омиксных технологий и методов молекулярной генетики, молекулярной и клеточной биологии.

Ключевые слова: вегетативное размножение, древесные виды, искусственные методы, лес, реювенилизация (омоложение)

DOI: 10.31857/S0015330324060032, EDN: MAWCHU

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность искусственного лесоразведения и лесовосстановления

С древних времен деревья сопровождают жизнь человека и являются возобновляемыми источниками пищевых ресурсов, кормов,

топлива, волокон, строительного материала и другого хозяйственно ценного сырья [1]. Общепризнано, что деревья составляют неотъемлемую часть лесных сообществ. Леса же, в свою очередь, являются важнейшим ресурсом для достижения целей в области устойчивого развития, разработанных в 2015 г. Генеральной ассамблеей ООН в качестве “плана достижения лучшего и более устойчивого будущего для всех”, связанных с устойчивым производством и потреблением, борьбой с бедностью, продовольственной безопасностью, сохранением биоразнообразия и изменениями климата [2].

Сокращения: SAM — апикальные меристемы побегов; ОС — организационный центр; IBA — индол-3-масляная кислота; BA — 6-бензиладенин; KN — кинетин; CPPU — N-(2-хлор-4-пиридил)-N-фенилмочевина; Zip — 2-изопентениладенин; TDZ — тиadiaзурон; Z — зеатин; AGP — водорастворимые арабиногалактановые белки.

При этом все возрастающие потребности человечества в древесине и продуктах ее переработки, а также изменяющиеся климатические условия на планете привели к тому, что лесной покров Земли неуклонно, хотя и с тенденцией к замедлению, но сокращается. Уменьшение площади лесов, угроза сохранению их биоразнообразия в конечном итоге может привести к снижению качества жизни людей. Поэтому все более актуальной становится потребность в сохранении древесных экосистем, как с точки зрения их экологической, так и эстетической ценности. Для поддержания лесного фонда широко используются традиционные подходы к созданию, размножению и улучшению плантационных и других лесных культур. Однако такие методы ограничены несколькими присущими им узкими местами, поскольку деревья, как правило, являются медленно растущими, долгоживущими, сексуально несовместимыми и сильно гетерозиготными растениями. Из-за преобладания высокой гетерозиготности у этих видов в популяциях сохраняется ряд рецессивных вредных аллелей, что приводит к высокой генетической нагрузке и депрессии инбридинга [1]. Традиционно восстановление большинства лесных древесных видов на специально отведенных площадях основано на их размножении семенами. Но семенные сады (плантации) имеют ограничения: не все родительские формы вносят свой вклад в семенной ассортимент, некоторые семена являются результатом самоопыления, что приводит к появлению слабого (некондиционного) потомства, пыльца низкого качества может попадать из-за пределов сада (плантации). Возможна также отрицательная корреляция между фертильностью и вегетативным ростом [3]. В частности, что касается хвойных, они часто хорошо цветут только с интервалом в несколько лет, в нерегулярном цикле [4]. Как следствие, семенной материал, полученный из семенных садов (плантаций) в результате контролируемого опыления, доступен не каждый год и часто только в малых количествах. Это, в свою очередь, ограничивает использование традиционных методов селекции, таких как самоопыление и обратное скрещивание, и затрудняет поддержание желаемых аллелей в определенном генетическом фоне [5]. Традиционная селекция довольно медленна и низкопродуктивна, и ее нельзя эффективно использовать для генетического улучшения деревьев. Чтобы обойти эти препятствия, на смену традиционным методам пришло вегетативное клональное размножение. Оно более пригодно для отбора, сохранения и восстановления доминантных, аддитивных и эпистатических генетических эффектов перспективных генотипов [1].

Вегетативное размножение

Вегетативное размножение, в частности, микроразмножение древесных пород предлагает быстрые средства производства клонального посадочного материала для программ лесоразведения, производства древесной биомассы и сохранения элитного и редкого материала в виде зародышевой плазмы. Все более широко обсуждается идея плантационного клонального лесоводства в сочетании с традиционными программами селекции для удовлетворения растущего спроса на древесину в течение следующих нескольких десятилетий [1, 6].

В настоящее время имеется много способов вегетативного размножения. В первую очередь это традиционные хорошо себя зарекомендовавшие методы размножения с помощью видоизмененных побегов (клубни, луковицы, корневища, усы-столоны), частями вегетативных органов (стебли, листья, корни) или путем прививки (копулировка – черенками или окулировка – почками). Однако такие способы вегетативного размножения зачастую не дают возможности получать многочисленное потомство от одного дерева или его части в течение всего года, не гарантируют отсутствия вирусов в посадочном материале и сохранение характеристик родительского растения [7].

Очевидно, решить эту важную проблему можно лишь с помощью принципиально новых методов вегетативного клонального размножения, основанных на культивировании изолированных клеток, тканей и органов растений в стерильных условиях – на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* [8]. Такие способы размножения дают возможность получать посадочный материал независимо от урожая семян и наиболее полно сохранять в потомстве хозяйственно-ценные признаки и свойства материнского растения, фиксируя их генетические преимущества и позволяя произвести достаточное количество растительного материала [9]. Такое клонирование осуществляется *in vitro* с помощью прививки, укоренения черенков, микроразмножения, соматического эмбриогенеза, культуры верхушечных или пазушных почек, органогенеза через культуру каллуса или индукцию адвентивных почек [10]. Эти методы эффективны при массовом клонировании лесных древесных видов, в том числе хвойных пород, и многие из них могут привести к получению генетически улучшенного посадочного материала [11].

Основные методы клонального размножения были разработаны и апробированы на ювенильном растительном материале (зиготных зародышах, сеянцах, саженцах) [4]. Поэтому для клонального размножения часто отбирают образцы, когда они еще слишком молоды для надлежащей оценки [12].

*Проблемы вегетативного (клонального)
размножения*

Использование для клонального размножения материала от юных растений менее предпочтительно, чем применение для этих целей частей взрослых растений. Многие хозяйственно ценные характеристики растений становятся очевидными только после полового созревания организма, когда деревья уже достигли зрелости [13–15]. Полный потенциал генетического развития молодых растений менее известен, по сравнению с взрослыми деревьями [10, 15]. С практической точки зрения более интересны деревья, которые доказали свои качественные характеристики, такие как показатели роста и устойчивость в течение длительного периода времени [16]. Такая оценка часто проводится в половине ротационного возраста [12]. Но отрицательным моментом такой расширенной оценки является то, что к этому времени большинство особей утратили способность к вегетативному размножению. Более того, даже когда возможно вегетативное размножение отдельных взрослых особей, оно часто связано с невозможностью или неправильным корнеобразованием и плагиотропизмом [4, 17]. Так, у хвойных очень низкий уровень естественного укоренения — около 1–5%. Кроме того, у них очень сложно получить корнеобразование даже в случае применения стимуляторов роста [18].

Учитывая эти факты, нельзя ожидать максимальной выгоды от клонального размножения, пока не будут найдены подходящие средства либо для клонирования старых деревьев, либо для определения в молодом возрасте того, какими будут деревья в конце их ротации [12].

*Реювенилизация в решении проблемы
вегетативного размножения лесных видов*

Исходя из того, что вегетативное размножение деревьев намного проще провести тогда, когда они находятся в ювенильной фазе, чем в фазе зрелости [19], решение проблемы клонирования может осуществляться, как минимум, двумя способами. Первый — это использование в качестве эксплантов ювенильных тканей взрослых деревьев, поскольку ювенильность некоторых частей (и органов взрослых) деревьев может сохраняться в течение длительного времени [20]. Такие ткани, обладающие более высокой морфогенной способностью, расположены по всему организму растения [21]. Так, например, ювенильные признаки могут сохраняться в основании дерева (онтогенетически молодая ткань), тогда как созревание происходит на периферии растения в онтогенетически более старой, но молодой хронологически ткани [1]. Михалевской и Шабашевой [22] также описан факт

спонтанного развития побегов с ювенильной структурой не только из спящих почек в нижней части ствола дерева сосны канарской (*Pinus canariensis* C. Sm.), но и на побегах во всех частях кроны этого дерева, высота которого около 6 м. Такие побеги с ювенильными структурами вполне могут быть использованы для вегетативного размножения данного вида.

Вторая возможность решения проблемы клонирования взрослых деревьев — это стимуляция переключения развития растения со стадии зрелости к ювенильной стадии через омоложение и возврат к ювенильным характеристикам организма [23].

Ключевым моментом в омоложении растений является обращение вспять стадии развития (органов и/или тканей) взрослых или стареющих растений, возвращение их хронологического возраста до статуса ювенильности и восстановление потенциала развития молодых особей [20]. У растительных видов, в том числе деревьев, в процессе их развития отмечены фазовые изменения, которые приводят к снижению способности к вегетативному размножению, микроразмножению, а также к соматическому эмбриогенезу. При этом, изменяя условия *ex vitro* и/или *in vitro*, в которых находится исходный материал или эксплантат, зачастую можно добиться омоложения и увеличения степени размножения [10].

Омоложение растений происходит за счет перепрограммирования клеток или регулирования факторов окружающей среды. Перепрограммирование клеток, с одной стороны, потенциально достижимо путем стимуляции существующих эмбриональных стволовых клеток в растениях, используемых для получения ювенильных растений. С другой стороны, в зависимости от тотипотентности растительных клеток, дифференцированные клетки могут быть индуцированы сначала к дедифференциации с последующей новой дифференциацией и, в конечном итоге, к формированию растений-регенерантов [24]. На репродуктивную жизнеспособность также влияют факторы окружающей среды, такие как фотопериод, интенсивность света, температура и доступность воды [25]. Обращение старения (возврат к более ранним стадиям развития) может быть достигнуто с помощью различных искусственных способов, которые продемонстрировали возможность стимулировать реювенилизацию у зрелых (не ювенильных) растений, не поддающихся обычным (традиционным) методам вегетативного размножения (рис. 1) [20, 26]. Среди этих способов известна сильная обрезка (хеджирование); использование прикорневых (пневых) побегов и коппинг эпикормальных побегов и материала ювенильных частей взрослых растений; использование

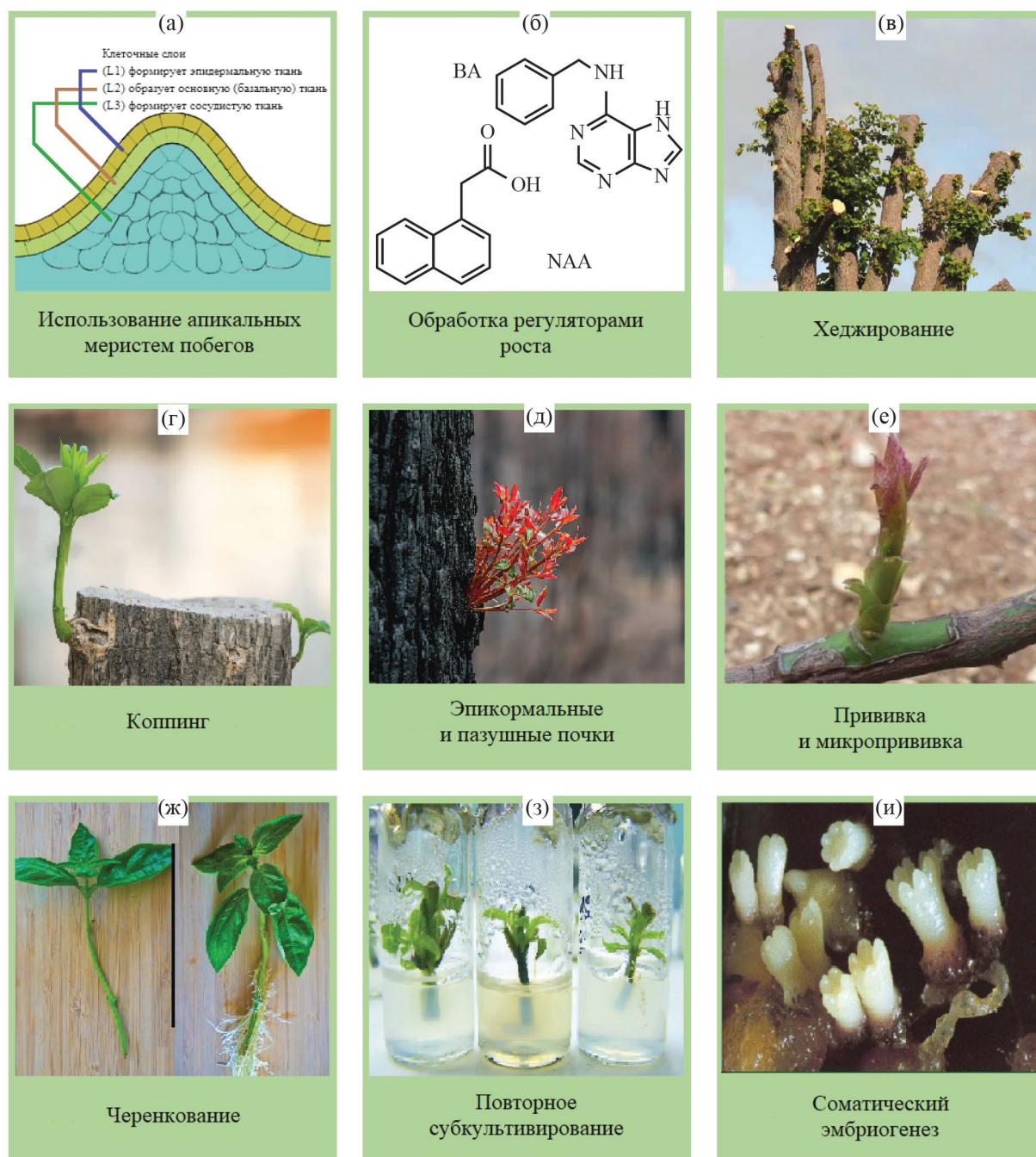


Рис. 1. Методы реювенилизации взрослого растительного материала.

(выгонка) побегов из придаточных почек; прививка взрослых черенков на молодые подвои; последовательная многократная прививка; обработка взрослых растений или их частей химическими веществами, регулирующими рост; удаление листьев со взрослых деревьев, что приводит к элиминации ингибирования процесса укоренения; использование различных методов размножения *in vitro* [27–30]. Методы *in vitro* включают в себя культивирование выбранных (тщательно отобранных) эксплантов, такие как культивирование меристем, повторное субкультивирование, микропрививка на ювениль-

ные укорененные побеги, образование адвентивных почек в культуре органов, органогенез, соматический эмбриогенез и перенос генов [1, 31]. Далее остановимся на ряде основных из перечисленных методов.

МЕТОДЫ РЕЮВЕНИЛИЗАЦИИ

1. Культивирование меристем. Использование ювенильных тканей взрослого растения

Известно, что в различных частях растительного организма всегда имеются определенные ткани и/или клетки (плюри- или тотипотент-

ные), которые в большей степени компетентны к формированию нового вегетативного растения. У лиственных деревьев и некоторых голосеменных такие ткани обнаруживаются в прикорневой зоне, а также в зонах близких к месту активного мейоза примерно в то время, когда этот мейоз происходит [21]. Другим потенциально активным участком является верхушка побега при условии удаления с него значительной части или всех зачатков листы или хвои [15]. Верхушки побегов содержат в своем составе области, отличающиеся большей морфогенетической компетентностью, чем окружающие [32]. Такие области, в основном, представлены меристемами.

Меристемы часто функционируют как автономные ткани; они поддерживают специфическую программу роста, независимую от факторов, возникающих где-либо внутри растения, или от внешних воздействий, т.е. они детерминированы [33]. Отдельные меристемы (ингибированные меристемы небольшого размера, которые обычно не образуют сосудистых соединений с остальной частью дерева) могут быть источником ювенильной ткани [12]. Такие меристемы были обнаружены у деревьев как голосеменных, так и покрытосеменных видов [34].

Для целей омоложения часто используют апикальные меристемы побегов (SAM, shoot apical meristems), в состав которых входят плюрипотентные стволовые клетки [21]. SAM представляет собой три отдельных клеточных слоя [35]. Первый (L1) формирует эпидермальную ткань, второй (L2) образует основную (базальную) ткань, а третий (L3) – сосудистую ткань (рис. 1а). Все они находятся под контролем центрального организационного центра (ОС, organizing center), который регулирует содержание небольшой популяции стволовых клеток, расположенных непосредственно над ним. Эти стволовые клетки имеют низкую скорость деления и являются поставщиками клеток в периферийную зону, где они начинают делиться быстрее, инициируя развитие клеточных линий, которые образуют различные клеточные слои. Очевидно, что маленькие, изолированные части меристемы обладают сильной регенеративной способностью. Считается, что культивирование таких небольших участков SAM *in vitro* способствует как омоложению, так и преодолению неспособности растений к микрорепродуктивному размножению [21]. Большая работа по установлению связи между использованием эксплантов мельчайших меристем и процедурой омоложения была проведена на кукурузе. Меристемы, взятые от зрелых растений кукурузы, давали начало молодому потомству, если меристема содержала зачатки одного-двух листьев, или листья

зрелого типа, в случае наличия в зоне меристемы большого количества зачатков [32].

Что касается хвойных, то было проведено несколько экспериментов с использованием изолированных меристем, которые позволили получить ювенильные растения из тканей побега зрелых особей. Так, из большого числа эксплантов апексов побегов 100-летнего дерева *Sequoiadendron giganteum* с прилежащими к экспланту только одним или двумя зачатками (примордиями) хвои, один продуцировал нормальные растения, неотличимые от тех, которые обычно получают от семян этого вида [36]. В аналогичном эксперименте с 3–7-летним *Pinus radiata* несколько меристематических куполов с двумя или тремя примордиями хвои образовывали побеги, которые были потенциально способны к укоренению [37].

Меристематическим материалом, имеющим потенциал для реювенилизации, могут быть ткани и клетки, выделенные из генеративных органов взрослых растений [38]. Наибольшее распространение с целью омоложения/размножения получило использование незрелых пыльников, что, возможно, связано с мейотическим процессом, проходящем в зоне их формирования [21]. Адвентивные побеги формировались из диплоидной соматической ткани женских стробил *Larix decidua*, при этом только в течение короткого времени, ограниченного процессом мейоза [39]. Точно так же Wang с соавт. [40] инициировали образование адвентивных побегов из срезов женских шишек *Picea abies*, собранных во время мейоза. Другие ткани цветков и соцветий, которые были использованы для регенерации растений, представляют собой неоплодотворенные яйцеклетки и нуклеолы (например, цитрусовые [41]) и семенные покровы (например, *Hevea brasiliensis* [42]).

Источником эксплантов с хорошей морфогенной активностью также может являться прокамбий, содержащий плюрипотентные сосудистые стволовые клетки [6, 43]. Прокамбий дает начало перicycle, и эта ткань также заслуживает внимания как потенциальный источник плюрипотентных или тотипотентных клеток [44]. Другие ткани в прокамбиальной области, которые обладают некоторым морфогенным потенциалом, связаны со смоляными ходами, расположенными в стеблях, хвое и зонах раневого повреждения хвойных [45]. Различные типы организованных структур возникали из смоляных каналов адвентивной хвои, полученной *in vitro* в культуре побегов нескольких видов хвойных [46]. Эпителиальные клетки смоляных каналов являются в течение короткого периода времени сильно недифференцированными по структуре, что, возможно, объясняет их морфогенный потенциал [6].

Говоря о выборе тканей и/или клеток, наиболее пригодных для использования в качестве эксплантов, следует обратить внимание также на молодые ткани корня [47].

2. Химическая или физическая обработка тканей и органов растений

2.1. Обработка стимуляторами роста растений

Обновлению растительных тканей и получению омоложенных растений может способствовать обработка этих тканей химическими веществами, в первую очередь растительными гормонами [20].

Хорошо известно, что изменения в эндогенных и экзогенных уровнях растительных гормонов являются условием реверсирования развития растений. Поскольку омоложение растений включает ремоделирование клеточной судьбы взрослых тканей, гормоны могут действовать при омоложении растений путем повторного перевода клеток на их эмбриональный и меристематический путь развития [20].

Для омоложения растительного материала используются такие регуляторы роста растений, как ауксины (NAA — нафтил-уксусная кислота; NOA — нафтоксиуксусная кислота; IAA — индол-3-уксусная кислота; IBA — индол-3-масляная кислота), цитокинины (BA — 6-бензиладенин; KN — кинетин; CPPU — N-(2-хлор-4-пиридил)-N-фенилмочевина; 2ip — 2-изопентениладенин; TDZ — тиadiaзурон, Z — зеатин) [1].

Известно, что взаимодействие ауксина и цитокинина способствует регуляции образования каллуса и органогенеза в природе или в системе *in vitro* [48]. При этом и процесс микроразмножения взрослых растений может быть улучшен путем обработки взрослых деревьев цитокининами, либо отдельно, либо в сочетании с ауксинами [10].

Применение бензиладенина в культуре зрелой растительной ткани стимулирует рост боковых почек или образование адвентивных побегов [28]. При этом сам процесс образования адвентивных побегов может рассматриваться как процесс омоложения, так как все адвентивные побеги обладают ювенильными характеристиками [49]. При клональном размножении хвойных растений цитокинины использовались для “омоложения” нескольких древесных пород: BA для взрослых деревьев *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus lambertiana*, *Larix decidua*; BA и TDZ для 30-летних деревьев *L. decidua*; BA с NAA для *L. gmelinii*; Z для *Cedrus atlantica*, *C. libani*, *Picea abies*; TDZ для *Pinus pinea*, *Araucaria excelsa* [18]. А поэтапно применяя BA и NAA, удалось регене-

рировать целые растения из верхушечных побегов *Arachis hypogaea* [50].

Предполагается, что гиббереллины также влияют на омоложение, поскольку гибберелловая кислота (GA) является важным гормоном, участвующим в созревании [51]. Путем опрыскивания GA было достигнуто повторное появление ювенильных морфологических характеристик или улучшение укоренения ряда растений [12]. Так его применение (GA3) может вызвать превращение зрелых растений *Hedera* в ювенильную форму [28]. Известно, что обработка гибберелином GA4 обеспечивает переключение с инициации стволовых клеток на клеточное деление [52].

Этилен и абсцизовая кислота (АБК) играют роль в омоложении растений, вызывая появление бокового корня [53]. При этом состояние покоя у *Theobroma cacao* контролируется эндогенными уровнями АБК, а омоложение побегов контролируется эндогенными цитокининами [50]. Также известно, что абсцизовая кислота и замедлители роста могут стабилизировать зрелую форму растения [28].

2.2. Омоложение, связанное с действием стресса

Некоторые из вышеперечисленных веществ, помимо прочего, являются стрессовыми для растения агентами. При этом известно, что вызванный в тканях растения стресс оказывает на них омолаживающее действие [54]. Следовательно, стрессовое воздействие гормонов роста на клетки, в том числе, может объяснять омолаживающее действие этих веществ на растительные ткани. Этим же можно объяснить стимуляцию образования соматических эмбрионов (о соматическом эмбриогенезе как методе реювенилизации речь пойдет ниже) на апикальных ростках проростков моркови в течение 1–3 недельного стрессового воздействия на них солями тяжелых металлов (кобальт, никель, цинк, кадмий) [55]. Аналогичный эффект на формирование соматических эмбрионов оказывала обработка каллусной культуры *Acacia catechu* пролином — аминокислотой, связанной со стрессом [56].

Показано, что омоложения тканей, в том числе и инициации процесса соматического эмбриогенеза, можно добиться при использовании продуктов деградации клеточной стенки (водорастворимые арабиногалактановые белки (AGP) и связанным с патогенезом ферментом — хитиназой [57]. Например, бактериальные факторы нодуляции способствуют эмбриогенезу в суспензионной культуре моркови [58]. AGP, продуцируемые эмбрионными культурами, часто вызывают эмбриогенез в культурах, которые обычно не эмбриогенны, даже если эмбриогенные и неэмбриогенные культуры при-

надлежат к разным видам [10]. Эти соединения действуют как антагонисты ауксина, хотя они также могут проявлять активность ауксина [57]. Хитиназа регулируется развитием интактных растений. В верхних листьях ее содержание ниже, чем в нижних листьях и корнях [59]. Хитиназы могут накапливаться *in vitro* в ответ на различные виды стресса [60, 61]. Было установлено, что гликозилированная кислая эндохитиназа с молекулярной массой 32 кДа играет важную роль в правильном раннем развитии соматических зародышей [60]. Ее основной функцией, по-видимому, является стимуляция нормального развития протодермы у ранних эмбрионов, что является важным этапом в переходе от пре-глобулярных к глобулярным соматическим зародышам [60]. Подобные механизмы перехода могут происходить во время эмбриогенеза и у хвойных. В эмбрионных культурах *Picea abies* были обнаружены два морфологически различных типа эмбрионов. Один из них (тип А) продуцирует нормальные зародыши и побеги легче, чем другой (тип В). Тип А в процессе культивирования выделяет во внешнюю среду внеклеточный белок, похожий на хитиназу. Когда на культуры типа В воздействовали внеклеточными белками, выделенными клетками типа А, эмбрионы в культурах типа В перешли на более высокую стадию развития [62].

Помимо непосредственного стрессового воздействия химическими агентами на ткани взрослых растений с целью их реювенилизации могут быть использованы и различные физические методы. Примеры стресс-стимулирующего омоложения включают повторное обрезание ветвей взрослых деревьев, коппинг, прививку, повторное укоренение черенков и другие [10].

3. Сильная обрезка и хеджирование

Хеджирование (hedging) (рис. 1в), т.е. регулярная сильная обрезка части кроны или побегов ветвей является эффективным методом омоложения и/или задержки созревания ювенильного материала [63, 64]. Отмечено, что жизнеспособность даже для стареющих трав и ряда однолетников можно восстановить путем обрезки кончиков стеблей, чтобы снять верхушечное доминирование и, тем самым, способствовать перераспределению гормонов [20]. Для древесных растений распределение питательных веществ также может быть изменено путем обрезки, а новые особи, формирующиеся из ветвей, отрастающих от места хеджирования, часто превосходят исходные экземпляры с точки зрения их роста и репродуктивной силы [65].

Так, методом хеджирования, повторными обрезками ветвей, был омоложен растительный материал *Rhododendron sp.* [66]. Аналогичные результаты получены на *Citrus limon*, *Balanites*

aegyptiaca, *Syzygium cuminii* и ряде других индийских древесных пород, которые являются важными производителями биомассы и сырья для фармацевтической промышленности [28].

Этот подход применим и к хвойным. Некоторые хвойные деревья реагируют на сильную обрезку или повреждение огнем образованием молодых побегов из ветвей или корней, которые легче укореняются, чем зрелые побеги [49]. Обработанные хеджированием *Pinus radiata* сохраняют состояние молодости более 27 лет [12]. Сохранение ювенильных характеристик за счет повторной обрезки описано и для *Picea abies* [67]. Если новый прирост у сеянцев этих видов удалять ежегодно или раз в два года, образующиеся в последствии пазушные побеги остаются ювенильными в течение многих лет и служат источником для массового получения укоренившихся черенков, которые ведут себя как сеянцы [49].

4. Использование корневых отпрысков, коппинг

Другим способом искусственного и/или естественного омоложения взрослых растений, или стареющих особей в природной среде является коппинг (coppicing) (рис. 1г), заключающийся в обрезке или значительном повреждении надземной части деревьев и кустарников таким образом, чтобы побудить их дать новые побеги из прикорневой зоны (стула) или области основания ствола [20]. Именно эта зона вблизи корневого соединения и надземного побега, наряду с некоторыми другими, является более морфогенетически компетентной и содержит клетки в составе эпикормических (спящих) почек, способные регенерировать новый организм [14, 15].

Принято считать, что хронологический возраст корней растений не увеличивается с развитием особи; то есть корни являются самой молодой частью растения и их клетки характеризуются значительной способностью к делению [68]. Экспланты побегов прикорневой зоны обладают лучшим потенциалом удлинения стебля и большей укореняемостью, чем побеги, регенерированные из кроны [19]. Такие прикорневые побеги обычны для лиственных пород, и их можно использовать для вегетативного размножения и клонирования [12, 34]. Метод коппинга, например, был применен для оценки порослевого потенциала взрослых (от 2 до 10 лет) деревьев *Acacia mearnsii*. Через 3 нед. после рубки на пнях деревьев всех возрастных групп отмечали поросль, которая впоследствии была использована как материал для массового разведения черной акации [19]. На безлистных побегах 35-летнего дерева лоха узколистного (*Elaeagnus angustifolia*) показано, что базальные части эксплантов дают больше пазушных побегов, чем верхние части, а черенки, взятые из побегов, формирующихся

в прикорневой области, обладают большей укореняемостью, чем черенки, взятые из побегов, формирующихся в верхней части растения [69].

Коппинг, который эффективен для многих лиственных пород, в целом не подходит для хвойных [11]. За исключением нескольких видов, таких, например, как *Sequoia sempervirens*, *Pinus serotina*, *Taxodium distichum*, *Cunninghamia lanceolata*, большинство хвойных не дают молодых прикорневых побегов, потенциально пригодных для вегетативного размножения [6, 70]. В то же время использование коппинга позволило размножить зрелые *Sequoia sempervirens* из базальных ростков, культивируемых *in vitro* [71].

5. Инициация развития пазушных и эпикормических почек

Омолаживающий эффект на зрелые растения может оказывать процесс образования адвентивных побегов из пазушных и эпикормических почек, поскольку все адвентивные побеги являются ювенильными (рис. 1д) [1]. Эпикормические почки в обычных условиях находятся в спящем состоянии под корой, их рост подавляется гормонами, поступающими из вышерасположенных активно развивающихся побегов [72]. При определенных условиях эти почки развиваются в активные побеги, например, когда повреждаются вышерасположенные части растения или, когда уровень освещенности увеличивается после удаления близлежащих растений [28]. Так, в работе с использованием взрослых деревьев *Quercus robur* было показано, что изолированные срезы ствола, помещенные во влажные теплые условия, могут давать побеги из активированных эпикормических почек [73]. В этом же эксперименте установлено, что гирдлинг (girdling — снятие кольца коры по всей окружности ствола) интактных деревьев может стимулировать рост побегов из эпикормических почек в течение следующего вегетационного периода. Побеги эпикормического происхождения, пригодные для вегетативного размножения, были получены также для ряда видов родов *Betula*, *Acer*, *Quercus* и др. [74–76].

Эпикормические почки и побеги встречаются у многих древесных пород, но не у всех. Так, они отсутствуют у большинства хвойных [28]. При этом, укорененные растения были получены из пазушных почек взрослых деревьев некоторых видов сосны, таких как *Pinus pinea*, *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. massoniana* и *P. sylvestris*, а также ели *Picea sitchensis* в ходе лабораторных исследований [77–81]. Следует учитывать, что этот метод применительно к хвойным пока имеет много ограничений, включая отсутствие потенциала для масштабирования, так как таким образом удастся регенерировать только ограниченное количество растений [16].

Для увеличения эффективности вегетативного размножения через инициацию пазушных и эпикормических почек могут быть использованы следующие технологии: прививка, повторная прививка, укоренение черенков.

6. Прививка и микропрививка

Техника прививки (рис. 1е) может проводиться как одна из стадий размножения после инициации спящих и пазушных почек, так и самостоятельно — путем прививания непосредственно верхушек сформированных побегов.

Восстановить способность к вегетативному размножению, вернуть компетентность к размножению через омоложение можно путем прививания отростка взрослого растения к молодому подвою [54]. При многократной прививке кончиков взрослых побегов на юные подвой признаки взрослого состояния привоя постепенно исчезают, а вновь сформированные особи проявляют ювенильные характеристики, такие, например, как задержка цветения [82]. Прививание зрелых частей растения к молодым, часто сеянцам, использовалось для получения качественных черенков. Такие черенки, полученные после серийной прививки, обладают повышенной укореняемостью и проявляют стойкие ювенильные признаки [28]. В ряде случаев побеги, полученные методом прививания, демонстрируют усиленную пролиферацию и могут быть использованы для микроразмножения, основанного на микропрививке [23]. Микропрививка, прививка *in vitro* небольших верхушек побегов или боковых почек на обезглавленные саженцы подвоя, была разработана для деревьев с целью омоложения представителей элитных сортов и реликтовых видов для облегчения их вегетативного размножения. Такой метод имеет преимущества, заключающиеся в повышении способности к укоренению полученного материала, восстановлении жизнеспособности клонов и уменьшении генетических различий внутри клонов [20]. Так показано, что повторная прививка побегов калопанакса семилопастного (*Kalopanax septemlobus*) приводила к омоложению тканей и, в конечном счете, к высокоэффективному образованию соматических зародышей у этого неподдающегося вегетативному размножению реликтового ценного вида [26]. Использование повторной прививки зрелого материала с последующим укоренением черенков показано и дало положительные результаты также для ряда хвойных видов, таких как *Pinus massoniana*, *P. taeda*, *P. Radiata*, *Pseudotsuga menziesii*, *Thuja plicata*, *Larix decidua*, *Cupressus dupreziana* [17, 23, 83]. В экспериментах с растительным материалом *Sequoia sempervirens* установлено, что прогрессивное омоложение происходило после последовательной прививки взрослого материала

на ювенильные черенки и стабильность омоложенного состояния сохранялась *in vitro* даже после 30 лет культивирования [84]. К сожалению, прививка не используется для массового размножения хвойных, а, в основном, ограничивается созданием семенных садов [6].

7. Повторное субкультивирование

Одним из перспективных методов вегетативного клонального размножения растений является их черенкование (рис. 1ж) [11]. При этом зачастую очень остро стоит вопрос инициации корнеобразования у черенков и их укоренения. Для значительной части лиственных древесных видов это не является проблемой [85]. К сожалению, для большинства хвойных черенки, способные к корнеобразованию, доступны только от растений, которые слишком молоды, чтобы продемонстрировать свой потенциал роста [49]. Для решения данного вопроса нашли применение технологии, основанные на методах культуры растительных клеток органов и тканей [79].

Омоложение, также, как и поддержание ювенильного состояния, может быть достигнуто или ускорено путем последовательного повторного субкультивирования растительного материала в условиях *in vitro* (рис. 1з) [86]. В качестве такого материала часто используются верхушки побегов [10]. Именно апексы побегов считаются наиболее активным местом клеточного деления и обладают характеристиками эмбриональных стволовых клеток [20].

Микроразмножение *in vitro* в контролируемых условиях позволяет непрерывно “воспроизводить” растения. При этом экспланты, взятые от взрослых растений, теряют свое текущее состояние развития в условиях непрерывного культивирования тканей в течение нескольких генераций. Считается, что перепрограммирование дифференцированных клеток, которое позволяет соматическим клеткам приобретать статус эмбриональных стволовых клеток и, таким образом, индуцировать формирование плюрипотентных стволовых клеток, как бы обращает вспять таймер развития растения [87].

Исходя из этой идеи, была создана технология так называемого “серийного размножения”, которая базируется на методике, разработанной для ювенильных побегов лиственницы [88]. Она основана на повторном вырезании и пересеве верхней части побегов, полученных путем микроразмножения, каждый раз, когда эти побеги достигают определенной длины. В частности, данная технология использована при серийном культивировании верхушек побегов 140-летнего дерева *Larix decidua* [89]. В данной работе установлено, что наилучшая регенерация адвентивных корней, а также укоренение и выживание растений происходили после четырнадцати суб-

культивирований, когда формирующаяся хвоя проявляла полностью ювенильную морфологию. Частота укореняемости черенков 3-летних микроразмноженных растений этой лиственницы оказалась в 10 раз выше, чем у черенков, взятых непосредственно от материнского растения.

Таким же образом использование технологии серийного субкультивирования привело к улучшению укоренения микроразмноженных побегов ряда древесных видов, таких как *Sequoia sempervirens*, *Pinus sylvestris*, *P. pinaster*, *P. radiata*, *Picea abies*, *Picea sitchensis* и другие [18, 37, 63].

8. Соматический эмбриогенез

Истинным омоложением в полной мере можно считать образование зиготы, формирующейся при слиянии гамет, возникших в результате мейоза [49]. Таким образом, процесс эмбриогенеза, безусловно, представляет собой прямой способ омоложения [28]. Исходя из этого, довольно привлекательным и перспективным методом омоложения взрослых растений в лабораторных условиях является соматический эмбриогенез (рис. 1и). С точки зрения морфологии он очень напоминает зиготический эмбриогенез и дает возможность клонального тестирования и генетического улучшения, которое в этом случае более достижимо, чем при использовании других технологий [21].

Соматический эмбриогенез, кроме того, считается наиболее эффективной системой регенерации растений среди различных методов размножения в системе *in vitro*. Начиная с получения первого соматического зародыша от древесного вида в 1986 г. (индукция была зарегистрирована у липы амурской – *Tilia amurensis*), к настоящему моменту отработаны различные протоколы систем прямого или непрямого соматического эмбриогенеза для хвойных и лиственных пород [90]. Однако большинство этих технологий разработано с использованием ювенильных тканей, чаще всего, на основе незрелых или зрелых зиготических зародышей. Микроразмножение и соматический эмбриогенез труднодостижимы на материале старше стадии проростков [10]. Таким образом, возникает вопрос, насколько соматический эмбриогенез доступен в настоящее время для целей омоложения растительного материала?

Попытки ряда исследовательских групп индуцировать эмбриональные ткани из вегетативных эксплантов на сегодняшний день имеют ограниченный успех. Высказано предположение, что такая ситуация связана с эпигенетическим подавлением эмбриогенности (хотя и потенциально обратимым), которое лежит в основе индукции соматического эмбриогенеза [91]. Но в последнее время достигнуты значительные успехи и разработаны новые подходы

в соматическом эмбриогенезе на основе материала, получаемого от зрелых деревьев [90].

Вероятность индукции соматического эмбриогенеза некоторых видов повышается за счет использования материала, предварительно полученного в системе *in vitro*. Показано, что саженцы и молодые растения, сформированные из соматических зародышей, обладают в большей степени ювенильными характеристиками, чем их аналогичные по возрасту зиготические аналоги [92]. Кроме того, соматический эмбриогенез легче инициировать из материала взрослых растений, ранее уже полученных путем соматического эмбриогенеза, чем от растений, полученных из семян [10].

Первая индукция соматического эмбриогенеза на вегетативных эксплантах (почках) была проведена с использованием материала 3-летних деревьев *Picea abies* [93]. Но никаких результатов по дальнейшему росту и развитию соматических растений (растений-регенерантов) опубликовано не было [18]. В другом исследовании на *P. abies* использовали эксплантаты примордиальных побегов 4–6-летних соматических деревьев, при этом 2 генотипа из 39 дали реакцию на индукцию соматического эмбриогенеза [94]. Обнаружено также, что молодая хвоя одно-трехлетних деревьев европейской ели имеет положительную реакцию на индукцию соматических эмбрионов [93]. Однако, эта способность утрачивается по мере взросления деревьев-доноров [14].

Положительного результата в индукции соматического эмбриогенеза удалось достигнуть при использовании в качестве эксплантов продольных срезов примордиальных побегов 10-летнего дерева *Picea glauca*, которые были вырезаны из вегетативных почек ранней весной, или из развивающихся почек ранней осенью [95].

Известно, что соматический эмбриогенез может быть индуцирован на эксплантах апикальных побегов и из вторичной хвои взрослых деревьев (возрастом 10–20 лет) различных тропических и субтропических видов сосны из Южной Африки и северо-восточной Индии: *Pinus patula*, *P. kesiya*, *P. roxburghii*, *P. wallichiana* [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные в предыдущих разделах результаты наглядно демонстрируют имеющиеся на сегодняшний день возможности получения “омоложенного” растительного материала, в том числе, и для видов древесных растений, играющих важнейшую роль в функционировании как природных лесных, так и урбанизированных экосистем. Особенность настоящего момента, однако, состоит в том, что все известные процедуры по искусственному возвращению отдельных частей взрослых растений в юное

состояние путем переключения тем или иным способом генной стратегии развития с фазы зрелости к ювенильному состоянию реализованы, в основном, в лабораторных условиях и недостижимы пока в промышленных масштабах. Работу по созданию соответствующих промышленных биотехнологий еще предстоит выполнить.

С уверенностью можно ожидать, что с учетом ошеломляюще быстрого развития омиксных направлений, достижений молекулярной генетики, биоинформатики, системной компьютерной биологии уже в ближайшее время удастся выявить как генные кластеры и генные сети, активно функционирующие в ювенильный период развития древесных растений, так и молекулярно-генетические системы управления процессом реювенилизации. Реконструкция генных сетей, функционирующих в ювенильный период, как и компьютерное моделирование переключения с фазы зрелости к ювенильному периоду развития могут стать базой для создания принципиально новых технологий лесовосстановления, основанных на понимании молекулярно-генетической природы реювенилизации.

В заключение важно подчеркнуть, что с общих позиций рутинное клонирование взрослых растений путем соматического эмбриогенеза с получением физиологически нормального потомства может послужить также средством быстрого улучшения ценных генетических признаков основных лесобразующих пород [21].

Наиболее желательной можно считать ситуацию, когда достигнутое с использованием одного из вышеописанных подходов размножение сопровождается получением потомства, полностью идентичного исходному генотипу. В этом случае период полевых испытаний клонов, как это делается при получении соматических эмбрионов из зиготических зародышей, становится ненужным, что создает значительную экономию времени и средств. Отметим, что при размножении в этом случае появляется возможность вести отбор сразу по нескольким признакам.

Авторы выражают благодарность к.б.н Н.Е. Коротаевой за детальное ознакомление с рукописью и ценные предложения по ее улучшению.

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giri C.C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview // *Trees*. 2004. V. 18. P. 115. <https://doi.org/10.1007/s00468-003-0287-6>

2. Global Forest Resources Assessment 2020: Main report. Rome: FAO. 2020. 186 p. <https://doi.org/10.4060/ca9825en>
3. *El-Kassaby Y.A., Klápště J.* Genomic selection and clonal forestry revival // Proc. 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies” September 8-12, 2014. / Eds. Park Y.S., Bonga J.M. Vitoria-Gasteiz. Spain. 2014. P. 98.
4. *Ewald D.* Micropropagation of *Larix* species via organogenesis // Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits / Eds. Jain S.M., Häggman H. Springer. 2007. P. 125. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_12
5. *Williams C.G., Savolainen O.* Inbreeding depression in conifers: implications for using selfing as a breeding strategy // For. Sci. 1996. V. 42. P. 102. <https://doi.org/10.1093/FORRESTSCIENCE/42.1.102>
6. *Bonga J.M.* Conifer clonal propagation in tree improvement programs // Vegetative propagation of forest trees / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 3.
7. *Krasnoperova V., Bukharina I., Islamova N.* Features introduction to the culture *in vitro* of coniferous trees // AgroEcoInfo. Electronic science-productive magazine. 2016. V. 24. № 2. (In Russian) https://agroecoinfo.ru/STATYI/2016/2/st_211.doc
8. *Isah T.* Explant rejuvenation in the clonal propagation of woody plants // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2023. V. 154. P. 209. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02520-8>
9. *Park Y.S., Bonga J.M.* Conifer micropropagation: its function in tree improvement programs // Micropropagation of Woody Plants / Eds. Ahuja M.R. Kluwer Academic. Dordrecht. 1992. P. 457. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8116-5_27
10. *von Aderkas P., Bonga J.M.* Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment // Tree Physiol. 2000. V. 20. P. 921. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.14.921>
11. *Bonga J.M.* A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers // Can. J. For. Res. 2015. V. 45. P. 379. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2014-0360>
12. *Bonga J.M., von Aderkas P.* Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro* // Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology / Eds. Ahuja M.R., Libby W.J. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 1993. P. 182. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84175-0_12
13. *Park Y.S.* Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // Ann. For. Sci. 2002. V. 59. P. 651. <https://doi.org/10.1051/forest:2002051>
14. *Bonga J.M., MacDonald J.E., von Aderkas P.* Cloning of conifers, with emphasis on mature trees. // Advances in plant biotechnology / Eds. Rao G.P., Zhao Y., Radchuck V.V., Batnagar S.K. Studium Press LLC. Houston. 2008. P. 475.
15. *Bonga J.M., Klimaszevska K., von Aderkas P.* Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2010. V. 100. P. 241. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>
16. *Trontin J-F., Aronen T., Hargreaves C., Montalbán I.A., Moncaleán P., Reeves C., Quoniou S., Lelu-Walter M.-A., Klimaszevska K.* International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees // Vegetative propagation of forest trees / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 211.
17. *Wang Y., Yao R.* Optimization of rhizogenesis for *in vitro* shoot culture of *Pinus massoniana* Lamb // J. For. Res. 2019. V. 32. P. 203. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01076-8>
18. *Zarei M., Salehi H., Jowkar A.* Controlling the barriers of cloning mature *Picea abies* (L.) H. Karst. via tissue culture and co-cultivation with *Agrobacterium rhizogenes* // Trees. 2020. V. 34. P. 637. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01945-z>
19. *Beck S.L., Dunlop R., van Staden J.* Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material // Plant Growth Regul. 1998. V. 26. P. 149. <https://doi.org/10.1023/A:1006179620554>
20. *Zhang Z., Sun Y., Li Y.* Plant rejuvenation: from phenotypes to mechanisms // Plant Cell Reports. 2020. V. 39. P. 1249. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02577-1>
21. *Bonga J.M.* Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? // Trees. 2017. V. 31. P. 781. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1509-z>
22. *Mikhalevskaya O.B., Shabasheva A.A.* Cyclic rejuvenation in the development of shoots of canary island pine (*Pinus canariensis* C. Sm.) // Russ. J. Dev. Biol. 2013. V. 44. P. 19. <https://doi.org/10.1134/S1062360412050062>
23. *Vidoy-Mercado I., Narváez I., Palomo-Ríos E., Litz R.E., Barcelý-Mucoz A., Pliego-Alfaro F.* Reinvigoration/rejuvenation induced through micrografting of tree species: signaling through graft union // Plants. 2021. V. 10. P. 1197. <https://doi.org/10.3390/plants10061197>
24. *Birnbaum K.D., Roudier F.* Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants // Regeneration. 2017. V. 4. P. 15. <https://doi.org/10.1002/reg2.73>. eCollection 2017 Feb
25. *Ratcliffe O.J., Amaya I., Vincent C.A., Rothstein S., Carpenter R., Coen E.S., Bradley D.J.* A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants // Development. 1998. V. 125. P. 1609. <https://doi.org/10.1242/dev.125.9.1609>
26. *Moon H.K., Park S.Y., Kim Y.W., Kim S.H.* Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2008. V. 44. P. 119. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9122-5>

27. Greenwood M.S., Day M.E., Schatz J. Separating the effects of tree size and meristem maturation on shoot development of grafted scions of red spruce (*Picea rubens* Sarg.) // Tree Physiol. 2010. V. 30. P. 459. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq004>
28. Read P.E., Bavougian C.M. *In vitro* rejuvenation of woody species // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. Methods in molecular biology. V. 994 / Eds. Lambardi M. et al. Springer Science Business Media. New York. 2013. P. 383. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_30
29. Nascimento B., Sá A.C.S., Lemos L.B.D., Rosa D.P.D., Pereira M.D.O., Navroski M.C. Three epicormic shoot techniques in *I. paraguariensis* mother trees and its cutting according to the material rejuvenation degree // Cerne. 2018. V. 24. P. 240. <https://doi.org/10.1590/01047760201824032584>
30. Salomão L.C.C., Siqueira D.L.D., Silva D.F.P.D. Production of 'Ubá' mango tree submitted to rejuvenation pruning and fertilized with nitrogen // Revista Brasileira De Fruticultura. 2018. V. 40. P. e812. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018812>
31. Massoumi M., Krens F.A., Visser R.G.F., De Klerk G.M. Azacytidine and miR156 promote rooting in adult but not in juvenile *Arabidopsis* tissues // J. Plant Physiol. 2017. V. 208. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.010>
32. Irish E.E., McMurray D. Rejuvenation by shoot apex culture recapitulates the developmental increase of methylation at the maize gene *Pl-Blotched* // Plant Mol. Biol. 2006. V. 60. P. 747. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5620-6>
33. Stange L. Cellular interactions during early differentiation // Cellular Interactions. Encyclopedia of Plant Physiology. V. 17 // Eds. Linsens H.F., Heslop-Harrison J. Springer. Berlin. Heidelberg. 1984. P. 424. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69299-4_20
34. Burrows G.E. Leaf axil anatomy in the *Araucariaceae* // Aust. J. Bot. 1987. V. 35. P. 631. <https://doi.org/10.1071/bt9870631>
35. Soyars C.L., James S.R., Nimchuk Z.L. Ready, aim, shoot: stem cell regulation of the shoot apical meristem // Curr. Opin. Plant Biol. 2016. V. 29. P. 163. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.12.002>
36. Monteuiis O. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments // Physiol. Plant. 1991. V. 81. P. 111. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb01721.x>
37. Prehn D., Serrano C., Mercado A., Stange C., Barrales L., Arce-Johnson P. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2003. V. 73. P. 91. <https://doi.org/10.1023/A:1022615212607>
38. Ballester A., Corredoira E., Vieitez A.M. Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees // Vegetative propagation of forest trees / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 56.
39. Bonga J.M. Adventitious shoot formation in cultures of immature female strobili of *Larix decidua* // Physiol. Plant. 1984. V. 62. P. 416. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb04595.x>
40. Wang K.X., Karnosky D.F., Timmis R. Adventitious bud production from mature *Picea abies*: rejuvenation associated with female strobili formation // Woody plant biotechnology / Eds. Ahuja M.R. Plenum Press. New York. 1991. P. 83. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7932-4_11
41. Cardoso J.C., Martinelli A.P., Latado R.R. Somatic embryogenesis from ovaries of sweet orange cv. Tobias // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2012. V. 109. P. 171. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0073-x>
42. Michaux-Ferrière N., Grout H., Carron M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) // Am. J. Bot. 1992. V. 79. P. 174. <https://doi.org/10.2307/2445105>
43. Miyashima S., Sebastian J., Lee J.-Y., Helariutta Y. Stem cell function during plant vascular development // EMBO J. 2013. V. 32. P. 178. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.301>
44. Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway // Dev. Cell. 2010. V. 18. P. 463. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.004>
45. Wu H., Hu Z.-H. Comparative anatomy of resin ducts of the *Pinaceae* // Trees. 1997. V. 11. P. 135. <https://doi.org/10.1007/s004680050069>
46. Bonga J.M. Organogenesis *in vitro* of tissues from mature conifers // In Vitro. 1981. V. 17. P. 511. <https://doi.org/10.2307/4292533>
47. Pulianmackal A.J., Kareem A.V.K., Durgaprasad K., Trivedi Z.B., Prasad K. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00142>
48. Steward F.C., Mapes M.O., Mears K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cell // Am. J. Bot. 1958. V. 45. P. 705. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x>
49. Greenwood M.S. Rejuvenation of forest trees // Plant Growth Regul. 1987. V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.1007/BF00043947>
50. Benson E.E. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2000. V. 36. P. 141. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z>
51. Zimmerman R.H., Hackett W.P., Pharis R.P. Hormonal aspects of phase change and precocious flowering // Hormonal Regulation of Development III / Eds. Pharis R.P., Reid D.M. Springer-Verlag. Heidelberg. 1985. P. 79. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67734-2_4
52. Niu S.H., Li Z.X., Yuan H.W., Fang P., Chen X.Y., Li W. Proper gibberellin localization in vascular tissue

- is required to regulate adventitious root development in tobacco // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert186>
53. Ivanchenko M.G., Muday G.K., Dubrovsky J.G. Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2008. V. 55. P. 335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x>
 54. Poethig R.S. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants // Sci. 1990. V. 250. P. 923. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.923>
 55. Kiyosue T., Takano K., Kamada H., Harada H. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions // Can. J. Bot. 1990. V. 68. P. 2301. <https://doi.org/10.1139/b90-293>
 56. Rout G.R., Samantaray S., Das P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* - a multipurpose leguminous tree // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1995. V. 42. P. 283. <https://doi.org/10.1007/BF00030000>
 57. McCabe P.F., Valentine T.A., Forsberg L.S., Pennell R.I. Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 2225. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.12.2225>
 58. Schmidt E.D.L., de Jong A.J., de Vries S.C. Signal molecules involved in plant embryogenesis // Plant Mol. Biol. 1994. V. 26. P. 1305. <https://doi.org/10.1007/BF00016476>
 59. Shinshi H., Mohnen D., Meins F.Jr. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987. V. 84. P. 89. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.89>
 60. De Jong A.J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammeren A., De Vries S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 425. <https://doi.org/10.2307/3869444>
 61. Pittock C., Weinman J.J., Rolfe B.G. The activity of a tobacco basic chitinase promotor in transgenic white clover provides insights into plant development and symbiosis // Aust. J. Plant Physiol. 1997. V. 24. P. 555. <https://doi.org/10.1071/PP97019>
 62. Mo L.H., Egertsdotter U., von Arnold S. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology // Ann. Bot. 1996. V. 77. P. 143. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0016>
 63. Mason W.L., Menzies M.I., Biggin, P. A comparison of hedging and repeated cutting cycles for propagating clones of Sitka spruce // Forestry. 2002. V. 75. P. 149. <https://doi.org/10.1093/forestry/75.2.149>
 64. Mitchell R.G., Zwolinski J., Jones N.B. A review on the effects of donor maturation on rooting and field performance of conifer cuttings // Southern African Forestry J. 2004. V. 201. P. 53. <https://doi.org/10.1080/20702620.2004.10431774>
 65. Masaka K., Torita H., Kon H., Fukuchi M. Seasonality of sprouting in the exotic tree *Robinia pseudoacacia* L. in Hokkaido, northern Japan // J. For. Res. 2017. V. 20. P. 386. <https://doi.org/10.1007/s10310-015-0488-z>
 66. Clapa D., Fira A. Tissue culture and ex-vitro acclimation of *Rhododendron* sp // Bulletin University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine CLUJ-NAPOCA. 2007. V. 64. P. 39. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:1899>
 67. St. Clair J.B., Kleinschmit J., Svolba J. Juvenility and serial vegetative propagation of Norway spruce clones (*Picea abies* Karst.) // Silvae Genet. 1985. V. 34. P. 42.
 68. Crawford B.C.W., Sewell J., Golembeski G., Roshan C., Long J.A., Yanofsky M.F. Genetic control of distal stem cell fate within root and embryonic meristems // Sci. 2015. V. 347. P. 655. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0196>
 69. Economou A.S., Spanoudaki M.J. Regeneration *in vitro* of oleaster *Elaeagnus angustifolia* L.) from shoot tips of mature trees // Acta Hort. 1988. V. 227. P. 363. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.227.66>
 70. Minghe L., Faxin H. Performance of Chinese-fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) plantlets from upper-crown and basal origins as modified by grafting and development as buried ramets before explant harvest // Silvae Genet. 2001. V. 50. P. 37.
 71. Boulay M. Conifer micropropagation: applied research and commercial aspects // Cell and tissue culture in forestry, case histories: gymnosperms, angiosperms and palms. V. 3 / Eds. Bonga J.M., Durzan D.J. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. 1987 P. 185.
 72. Meier A.R., Saunders M.R., Michler C.H. Epicormic buds in trees: a review of bud establishment, development and dormancy release // Tree Physiol. 2012. V. 32. P. 565. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps040>
 73. Harmer R. Production and use of epicormic shoots for the vegetative propagation of mature oak // Forestry. 1988. V. 61. P. 305. <https://doi.org/10.1093/forestry/61.4.305-a>
 74. Brand M.H., Lineberger R.D. *In vitro* rejuvenation of *Betula* (*Betulaceae*): morphological evaluations // Am. J. Bot. 1992. V. 79. P. 618. <https://doi.org/10.2307/2444877>
 75. Henry P.H., Preece J.E. Production and rooting of shoots generated from dormant stem sections of *Acer* species // Hort. Sci. 1997. V. 32. P. 1274. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.32.7.1274>
 76. Vieitez A.M., Corredoira C., Ballester A., Muñoz F., Durán J., Ibarra M. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra* // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2009. V. 98. P. 135. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9546-6>
 77. Selby C., Watson S., Harvey B.M.R. Morphogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud cultures-tree maturation and explants from epicormic shoots // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2005. V. 83. P. 279. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-7016-3>

78. Cortizo M., De Diego N., Moncalean P., Ordas R.J. Micropropagation of adult Stone Pine (*Pinus pinea* L.) // *Trees*. 2009. V. 23. P. 835. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0325-0>
79. De Diego N., Montalban I.A., Fernandez de Larrinoa E., Moncalean P. *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees // *Can. J. For. Res.* 2008. V. 38. P. 2607. <https://doi.org/10.1139/x08-102>
80. De Diego N., Montalban I.A., Moncalean P. *In vitro* regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees // *South African J. Bot.* 2010. V. 76. P. 158. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.09.007>
81. Wan Y., Fan F. Direct organ regeneration from apical shoot buds of adult *Pinus massoniana* Lamb // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2024. <https://doi.org/10.1007/s11627-024-10415-2>
82. Boulay M. *In vitro* propagation of tree species // *Plant tissue and cell culture* / Eds. Green C.E., Somers D.A., Hackett W.P., Biesboer D.D. Liss. New York. 1987. P. 367.
83. Fraga M.F., Cañal M.J., Aragonés A., Rodríguez R. Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting // *Ann. For. Sci.* 2002. V. 59. P. 155. <https://doi.org/10.1051/forest:2002002>
84. Chang I.-F., Chen P.-J., Shen C.-H., Hsieh T.-J., Hsu Y.-W., Huang B.-L., Kuo C.-I., Chen Y.-T., Chu H. A., Yeh K.-W., Huang L.-C. Proteomic profiling of proteins associated with the rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl // *Proteome Sci.* 2010. V. 8. P. 64. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-64>
85. Ondro W.J., Couto L., Betters D.R. The status and practice of forestry in Brazil in the early 1990s // *For. Chronicle*. 1995. V. 7. P. 106. <https://doi.org/10.5558/tfc71106-1>
86. Su X.C. Study on the differences of the seedling of different generations from successive tissue culture of Chinese fir clone // *J. Fujian College Forestry*. 2000. V. 20. P. 353.
87. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. Aging epigenetics: accumulation of errors or realization of a specific program? // *Biochem.* 2015. V. 80. P. 1406. <https://doi.org/10.1134/S0006297915110024>
88. Hübl S., Zoglauer K. Entwicklung einer Vermehrungsmethode für züchterisch wertvolle Lärchen. Beitr // *Forstwirtschaft*. 1991. V. 25. P. 18.
89. Kretzschmar U., Ewald D. Vegetative propagation of 140-year-old *Larix decidua* trees by different *in vitro* techniques // *Plant Physiol.* 1994. V. 144. P. 627. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)82149-8](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)82149-8)
90. Castander-Olarieta A., Moncaleán P., Montalbán I.A. Somatic embryogenesis in Pines // *Somatic Embryogenesis. Methods in Molecular Biology*. V. 2527/ Eds. Ramírez-Mosqueda M.A. Humana. New York. 2022. P. 41. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_4
91. Klimaszewska K., Rutledge R.G. Is there potential for propagation of adult spruce trees through somatic embryogenesis? // *Vegetative propagation of forest trees* / Eds. Park Y.S., Bonga J.M., Moon H.K. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. Korea. 2016. P. 195.
92. Ruaud J.N., Bercetche J., Paques M. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants // *Plant Cell Rep.* 1992. V. 11. P. 563. <https://doi.org/10.1007/BF00233093>
93. Harvengt L., Trontin J.F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // *Planta*. 2001. V. 213. P. 828. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>
94. Varis S., Klimaszewska K., Aronen T. Somatic embryogenesis and plant regeneration from primordial shoot explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. somatic trees // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1551. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01551>
95. Klimaszewska K., Overton C., Stewart D., Rutledge R.G. Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during tissue culture process // *Planta*. 2011. V. 233. P. 635. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1325-4>

УДК 581.1:574.3

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ ВЫСШИХ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ АРКТИЧЕСКИХ ТУНДР ЗАПАДНОГО ШПИЦБЕРГЕНА

© 2024 г. Е. Ф. Марковская^{a,*}, Н. Ю. Шмакова^b, А. А. Зорина^a

^aФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Петрозаводский государственный университет”, Петрозаводск, Россия

^bПолярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
“Кольский научный центр” Российской академии наук, Апатиты, Россия

*e-mail: volev10@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принята к публикации 07.05.2024 г.

Исследовали фракционный состав жирных кислот (ЖК) липидов, выявлены основные направления их участия в структурно-функциональных адаптациях у доминирующих и редко встречающихся видов высших сосудистых растений арктических тундр Западного Шпицбергена. Выявлены различия по величине и изменчивости состава ЖК по фракциям: для гликолипидов — от 25 до 76%, для фосфолипидов — 10–28%, для нейтральных липидов — 7–57%. Установлена взаимосвязь между жирнокислотным составом разных фракций липидов и показателем “активность вида” у растений разного географического происхождения и экологии. Основные направления адаптации, связанные с липидной составляющей у арктических растений, включают участие насыщенных и ненасыщенных ЖК в разных соотношениях в зависимости от эколого-географических особенностей видов. Отмечено разнообразие ЖК с очень длинной цепью во фракционном жирнокислотном составе липидов у всех арктических растений. Показано, что в обеих адаптивных стратегиях: “избегание” и “адаптация” активно участвует липидная составляющая, которая обеспечивает соответствующую функциональную активность вида и его представленность в арктических тундрах Западного Шпицбергена.

Ключевые слова: адаптация, активность вида, высшие сосудистые растения, гликолипиды, Западный Шпицберген, нейтральные липиды, фосфолипиды

DOI: 10.31857/S0015330324060045, EDN: MATCJB

ВВЕДЕНИЕ

Современный интерес к Арктике связан с ее ресурсным богатством, адаптивным потенциалом природного комплекса, реакцией на изменение климата и увеличение техногенной нагрузки [1]. Отмечается большое разнообразие географических элементов (арктические, аркто-альпийские, гипоарктические и бореальные) флоры Шпицбергена, которые представлены на широком спектре экотопов. Разнообразие определяет основные стратегии поведения и соответственно выживания разных видов растений — “избегание” и “адаптация” [2]. Первая группа видов выбирает стратегию “избегания” перестроек при адаптации и занимает ограни-

ченные, более благоприятные экотопы, а вторая включает механизмы приспособления, что обеспечивает этим видам широкое распространение [1–5].

Система выживания тесно связана с состоянием мембранной системы растительного организма. Физические свойства биологических мембран, в частности их “текучесть” или подвижность зависят от состава липидов. Для сосудистых растений Западного Шпицбергена разных по географическому происхождению выявлена связь между особенностями жирнокислотного состава общих липидов и показателем “активность вида” [6]. Полученные результаты позволяют предположить, что рассмотрение фракционного состава липидов у этих видов может дать более детальную информацию об участии отдельных жирных кислот (ЖК) в путях адаптации растений к условиям Арктики. Способность растительного организма поддер-

Сокращения: ГЛ — гликолипиды, ЖК — жирные кислоты, ЖКОДЦ — жирные кислоты с очень длинной цепью, НЖК — насыщенные жирные кислоты, ННЖК — ненасыщенные жирные кислоты, НЛ — нейтральные липиды, ФЛ — фосфолипиды.

живать функциональную активность мембран адекватно действующим факторам в экстремальных условиях среды обеспечивает успешное их произрастание [7–10].

Цель работы — сравнительный анализ жирнокислотного состава липидов и выявление основных направлений их участия в адаптациях у доминирующих и редко встречающихся видов высших растений арктических тундр Западного Шпицбергена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Место исследования. Работа выполнена на территории Западного Шпицбергена, крупного острова архипелага Шпицберген, расположенного между северной частью Атлантического океана и Северным Ледовитым океаном. Рельеф острова горный, ледники занимают больше половины площади, берега изрезаны фьордами, породы многолетнемерзлые (мощность слоя до 200 м), естественное оттаивание грунтов в летний период колеблется от 0.5 до 2.6 м, климат океанический, на западе значительно смягчен теплым Шпицбергенским течением (часть Гольф-стрима). Вследствие высокой влажности воздуха даже зимние осадки могут выпадать в виде дождя или тумана. Среднегодовая температура воздуха составляет 5.8°C. Средняя температура самого теплого месяца (июля) 8.0°C, самого холодного (февраля) — 18°C [11]. В среднем за год выпадает 563 мм осадков. В течение всего года наблюдается высокая относительная влажность воздуха, в среднем — 78%. На широте Баренцбурга с 19 апреля по 24 августа (127 дней) длится полярный день. Климатические особенности обуславливают короткий вегетационный период (40–70 дней).

Работа выполнена на растениях из разных растительных сообществ арктических тундр: в окрестностях поселка Баренцбург (78°03'38.2" N, 14°12'59.6" E); на мысе Финнесет (78°02'39.2" N, 14°13'10.0" E); в окрестностях бухты Колсбей (78°08'41.4" N, 15°01'27.3" E).

Объекты исследования. В качестве объектов исследования были выбраны 11 видов высших сосудистых растений из 8 семейств арктических тундр на о. Западный Шпицберген. Из них 7 видов травянистых многолетников: сем. Caryophyllaceae — звездчатка приземистая (*Stellaria humifusa* Rottb.), ясколка альпийская (*Cerastium alpinum* L.), смолевка бесстебельная (*Silene acaulis* L.); сем. Polygonaceae — кисличник двупестичный (*Oxyria digyna* (L.) Hill); сем. Ranunculaceae — лютик серно-желтый (*Ranunculus sulphureus* Soland.); сем. Saxifragaceae — камнеломка дернистая (*Saxifraga cespitosa* L.), камнеломка поникающая (*S. cernua* L.); 4 вида кустарничков: сем. Salicaceae — ива полярная (*Salix polaris* Walenb.); сем. Rosaceae —

дриада восьмилепестная (*Dryas octopetala* L.); сем. Ericaceae — голубика обыкновенная, мелколистная (*Vaccinium uliginosum* subsp. *microphyllum* (Lange) Hulten.); сем. Betulaceae — березка карликовая (*Betula nana* L.) [12].

Растения отбирали в фазе цветения, за исключением редких (*Betula nana*, *Vaccinium uliginosum*), которые на данной территории находились только в фазе вегетации. Для каждого вида пробы листьев были взяты с 10–20 особей (10–20 г).

Фиксация материала и химический анализ.

Свежий растительный материал фиксировали методом лиофильной сушки в химико-аналитической лаборатории Российской научной арктической экспедиции на архипелаге Шпицберген (п. Баренцбург). Дальнейший анализ проб проводили на оборудовании Центра коллективного пользования “Аналитическая лаборатория” Института Леса Карельского научного центра РАН.

Суммарные липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 и фракционировали методом колоночной хроматографии на нейтральные липиды (НЛ), гликолипиды (ГЛ) и фосфолипиды (ФЛ). Определение жирнокислотного состава липидных фракций проводили хроматографическим методом на газожидкостном хроматографе “Хроматэк-Кристалл-5000.1” (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) при следующих условиях: капиллярная колонка HP INNOWAX (30 м, 0.32 мм); температура колонки, испарителя, пламенно-ионизационного детектора — 205, 240 и 260°C соответственно; газ-носитель — азот; скорость пропускания через колонку азота, водорода, воздуха — 50, 40, 400 мл/мин соответственно. Идентификацию ЖК проводили по стандартным образцам (Supelko, 37 компонентов, США). Определение количественного содержания ЖК проводили методом внутреннего стандарта (в качестве стандарта — маргаритовая кислота) и выражали в мг/г сухой массы, далее рассчитывали в весовых % от суммы [13].

Активность видов определяется широтой экологической амплитуды и поведением в сообществе [14]. При определении активности учитываются: экологическая амплитуда вида, которая соответствует доле освоенных местообитаний; постоянство, определяется как отношение описаний, где был встречен вид, к общему количеству описаний в данном местообитании; среднее обилие по шкале Браун-Бланке. На исследуемой территории арктических тундр Западного Шпицбергена выявлено пять категорий активности видов, которые мы использовали в настоящем исследовании: I — редкие виды, II — виды низкой активности, III — средней активности, IVa — активные обильные виды, IVb — активные необильные виды, Va — высоко активные обильные, Vb — высоко актив-

ные необильные виды [15]. Данные по активности видов исследованных сосудистых растений представлены в табл. 1.

Статистический анализ. Описательная статистика проведена по стандартной методике [16]. Для выявления сходства исследованных сосудистых растений использовали количественные данные по ЖК суммарных липидов (мг/г сухой массы) и кластерный анализ, при подтверждении результатов которого число итераций бутстрепинга составило 10000 [17].

Оценка соотношения насыщенных ЖК (НЖК) и ненасыщенных ЖК (ННЖК) для выделенных групп растений, сформированных на основе применения кластеризации, проводилась с использованием нормированного отклонения – универсального способа унификации данных в вариационной статистике [16]. Сначала проводилось нормирование каждого признака (количество конкретной ЖК – $j = 1, 2, \dots, m$) определенного вида ($i = 1, 2, \dots, n$): $t_{ij} = (x - M) / S$, где x – количество ЖК на единицу массы (мг/г сухой массы), M – среднее арифметическое и S – стандартное отклонение по всем ЖК отдельного вида растений. Далее безразмерные признаки усредняли по каждой группе ЖК (дигеновые, моноеновые, триеновые, тетраеновые, насыщенные) каждой фракции липидов (ГЛ, ФЛ, НЛ): $t_i = 1 / m \cdot \sum_{(1 \rightarrow m)} t_{ij}$. Данные по видам од-

ного кластера усредняли, а для более наглядного представления результатов соотношения НЖК и ННЖК использованы абсолютные значения индекса, рассчитанного на основе нормированного отклонения – $|t| = |1 / n \cdot \sum_{(1 \rightarrow n)} t_{ij}|$.

Статистическая обработка выполнялась в программах Microsoft Excel 2010, STATGRAPHICS Plus 5.0 и бесплатном пакете PAST v. 3.17.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жирнокислотный состав фракций липидов листьев арктических растений. Жирные кислоты, входящие в состав липидов у арктических видов, представляют основные строительные блоки сложных полярных и нейтральных липидов [18]. Липиды, как мембранные, так и запасные, распределены в клетке неравномерно и, в зависимости от структурно-функциональных особенностей вида, выделяется три фракции: ГЛ, ФЛ, НЛ. Все исследованные виды арктических растений различались по числу ЖК и их количественному содержанию по фракциям. Если во фракции ГЛ у исследованных видов растений выделили 19 ЖК, то в ФЛ – 18 ЖК, а в НЛ – 25 ЖК (табл. 2). В литературе показано, что каждая мембрана в клетке состоит из характерного набора типов липидов [19], поэтому каждый вид растений имеет собственный набор ЖК, который и определяет потенциал его адаптации к условиям местообитания. Уникальный состав ЖК позволяет предположить, что структура/состав липидов является важным фактором адаптации растений в условиях Арктики.

Исследование распределения ЖК между фракциями у растений в период активной вегетации выявило различия по величине и изменчивости: для ГЛ – от 25 до 76%, для ФЛ – 10–28%, для НЛ – 7–57% (табл. 1). Исследуемые виды включали весь диапазон активности (1–5), установленный на этой территории [15]. Сравнение фракционного состава двух видов с одинаково высокими значениями активности (*Cerastium alpinum*, акт. 5b, *Salix polaris*, акт. 5a) показало, что отличия по величине и изменчивости ЖК по фракциям достоверны: ГЛ – 25–50%, ФЛ – 13–22%, НЛ – 28–52% (табл. 1). Это может быть связано с разными путями адаптации у видов сходных по “активности”.

Фракция ГЛ. ЖК этой фракции преимущественно локализованы в хлоропластах, где они организуют мембраны тилакоидов, которые встроены в субъединицы фотосистем. Эта группа липидов функционально доминирует в период активной вегетации в летнее время, когда отмечается максимальная активность фотосинтетического аппарата (ФСА). Содержание ЖК во фракции ГЛ у 6 видов было высоким, более 50% (табл. 1).

Таблица 1. Распределение фракций жирных кислот липидов в листьях растений Арктики, %

Вид	ГЛ	ФЛ	НЛ	Категория активности вида
<i>Oxyria digyna</i>	45	21	34	IVa
<i>Cerastium alpinum</i>	25	13	52	Vb
<i>Stellaria humifusa</i>	52	14	34	IVa
<i>Ranunculus sulphureus</i>	76	15	9	IVb
<i>Saxifraga cernua</i>	65	10	25	IVa
<i>Saxifraga cespitosa</i>	37	14	49	IVb
<i>Salix polaris</i>	50	22	28	Va
<i>Betula nana</i>	65	28	7	I–II
<i>Dryas octopetala</i>	32	11	57	III
<i>Silene acaulis</i>	58	19	23	III
<i>Vaccinium uliginosum</i>	48	25	27	I–II
Среднее	50	17	31	

Примечание: ГЛ – гликолипиды, ФЛ – фосфолипиды, НЛ – нейтральные липиды.

Таблица 2. Состав и содержание жирных кислот (ЖК) в разных фракциях липидов (% от суммы) высших сосудистых растений Западного Шпицбергена

ЖК	Виды										
	<i>Oxyria digyna</i>	<i>Cerastium alpinum</i>	<i>Silene acaulis</i>	<i>Stellaria humifusa</i>	<i>Ranunculus sulphureus</i>	<i>Saxifraga cernua</i>	<i>Saxifraga cespitosa</i>	<i>Salix polaris</i>	<i>Betula nana</i>	<i>Dryas octopetala</i>	<i>Vaccinium uliginosum</i>
Гликолипиды											
16:0	6.20 ± 0.54	18.32 ± 0.87	30.41 ± 1.75	22.33 ± 1.87	13.05 ± 0.76	16.22 ± 0.98	17.41 ± 0.55	15.19 ± 0.67	29.18 ± 0.87	35.80 ± 2.47	32.11 ± 1.03
18:0	0.66 ± 0.01	1.23 ± 0.07	5.59 ± 0.34	3.23 ± 0.21	1.30 ± 0.08	2.23 ± 0.15	0.81 ± 0.04	1.13 ± 0.08	2.87 ± 0.16	7.30 ± 0.54	6.80 ± 0.18
20:0			4.92 ± 02.8	1.21 ± 0.09				0.59 ± 0.02	2.31 ± 0.14	2.38 ± 0.13	2.63 ± 0.04
22:0			3.18 ± 0.21	0.56 ± 0.02	0.55 ± 0.01				3.43 ± 0.17	1.15 ± 0.07	1.76 ± 0.04
16:1 (n-7)			1.08 ± 0.07	1.32 ± 0.08					0.93 ± 0.07	1.30 ± 0.05	1.13 ± 0.06
16:1 (n-5)	0.85 ± 0.05	1.16 ± 0.02	0.81 ± 0.05		1.85 ± 0.18	1.21 ± 0.09	1.41 ± 0.08	1.84 ± 0.07	1.20 ± 0.05	1.58 ± 0.06	0.80 ± 0.02
18:1 (n-9)	1.11 ± 0.08	1.88 ± 0.06	5.29 ± 0.41	5.36 ± 0.34	2.19 ± 0.16	2.59 ± 0.12	2.10 ± 0.13	1.35 ± 0.07	6.20 ± 0.34	6.75 ± 0.24	6.51 ± 0.34
20:1 (n-9)									0.98 ± 0.04		0.92 ± 0.03
16:2 (n-9)		0.73 ± 0.04		1.03 ± 0.05							
18:2 (n-4)									0.58 ± 0.02		
18:2 (n-6)	5.38 ± 0.31	17.41 ± 0.87	21.79 ± 1.85	24.41 ± 1.47	8.26 ± 0.43	7.85 ± 0.87	14.47 ± 0.99	6.36 ± 0.09	7.62 ± 0.46	8.76 ± 0.68	6.28 ± 0.23
20:2 (n-6)		0.76 ± 0.03	1.71 ± 0.08	0.80 ± 0.06	0.53 ± 0.03				0.66 ± 0.01	0.63 ± 0.03	0.62 ± 0.05
16:3 (n-6)					14.22 ± 0.96	0.95 ± 0.07			3.12 ± 0.12		1.36 ± 0.08
16:3 (n-4)				0.60 ± 0.03							
18:3 (n-3)	84.43 ± 4.78	46.84 ± 1.95	25.22 ± 1.86	25.49 ± 1.89	56.20 ± 3.12	67.80 ± 3.45	62.28 ± 4.23	73.02 ± 1.48	40.92 ± 2.76	33.61 ± 1.47	38.63 ± 1.76
18:3 (n-6)		2.43 ± 0.12		4.31 ± 0.31							
18:4 (n-4)		7.32 ± 0.43		7.42 ± 0.54							
20:4 (n-4)					0.73 ± 0.04						
20:4 (n-3)				0.86 ± 0.07							

Фосфолипиды												
16:0	18.50 ± 0.76	28.18 ± 1.08	30.81 ± 1.67	31.35 ± 1.47	21.97 ± 1.08	27.83 ± 0.95	29.08 ± 1.98	30.04 ± 1.87	36.56 ± 2.98	37.35 ± 1.65	37.62 ± 1.24	
18:0	0.80 ± 0.05	2.13 ± 0.13	5.10 ± 0.35	8.28 ± 0.65	1.42 ± 0.06	7.60 ± 0.45	0.75 ± 0.07	1.70 ± 0.05	1.89 ± 0.04	8.36 ± 0.35	3.64 ± 0.15	
20:0			1.80 ± 0.12	0.68 ± 0.03						0.82 ± 0.02	1.06 ± 0.08	
22:0			1.60 ± 0.07		0.70 ± 0.04							
16:1 (n-7)			0.80 ± 0.02	3.17 ± 0.17		0.69 ± 0.03			0.87 ± 0.04	0.83 ± 0.05	0.68 ± 0.02	
16:1 (n-5)	7.35 ± 0.56	4.60 ± 0.39	2.27 ± 0.11	1.69 ± 0.07	6.53 ± 0.47	2.88 ± 0.12	2.91 ± 0.18	5.76 ± 0.54	6.05 ± 0.43	5.57 ± 0.31	6.37 ± 0.34	
18:1 (n-9)	3.80 ± 0.16	3.70 ± 0.25	4.31 ± 0.38	7.19 ± 0.45	1.58 ± 0.05	5.14 ± 0.43	2.56 ± 0.16	2.10 ± 0.18	4.68 ± 0.36	4.11 ± 0.11	5.25 ± 0.45	
20:1 (n-9)	1.55 ± 0.06										0.70 ± 0.04	
16:2 (n-9)		1.17 ± 0.07		1.21 ± 0.07								
18:2 (n-4)									1.09 ± 0.06			
18:2 (n-6)	35.88 ± 2.87	27.78 ± 1.04	28.91 ± 1.87	25.36 ± 1.65	12.57 ± 0.97	11.72 ± 0.83	27.19 ± 1.09	16.15 ± 0.87	19.34 ± 0.93	14.84 ± 0.65	19.83 ± 0.98	
20:2 (n-6)	1.00 ± 0.04								1.28 ± 0.07			
16:3 (n-6)					4.95 ± 0.48							
18:3 (n-4)									0.68 ± 0.02			
18:3 (n-3)	29.86 ± 1.43	25.42 ± 1.97	23.31 ± 1.58	14.66 ± 0.68	49.46 ± 2.16	43.67 ± 2.94	36.84 ± 1.88	43.86 ± 2.97	25.82 ± 2.02	26.31 ± 2.04	24.85 ± 1.93	
18:3 (n-6)		2.24 ± 0.12	0.84 ± 0.06	2.79 ± 0.14						0.71 ± 0.06		
18:4 (n-4)		4.42 ± 0.34		3.17 ± 0.26								
20:4 (n-4)					0.73 ± 0.06							
Нейтральные липиды												
16:0	16.64 ± 0.65	24.27 ± 1.24	17.68 ± 0.84	20.88 ± 1.07	22.11 ± 1.78	24.99 ± 1.57	22.89 ± 1.43	33.84 ± 2.63	35.38 ± 2.34	8.17 ± 0.65	22.61 ± 1.78	
18:0	1.81 ± 0.06	2.24 ± 0.13	5.13 ± 0.08	4.86 ± 0.38	7.15 ± 0.49	4.48 ± 0.34	2.03 ± 0.11	4.08 ± 0.15	5.77 ± 0.28	1.61 ± 0.07	4.22 ± 0.38	
20:0		1.71 ± 0.08	22.5 ± 1.23	0.69 ± 0.03	11.11 ± 0.76	0.70 ± 0.04		0.98 ± 0.04	2.40 ± 0.21	12.73 ± 0.89	21.53 ± 1.58	
22:0	0.65 ± 0.02		7.95 ± 0.56		10.94 ± 0.89	0.66 ± 0.04		1.99 ± 0.13	1.62 ± 0.07	8.95 ± 0.46	2.03 ± 0.14	
24:0										4.07 ± 0.32		

Таблица 2. Окончание

ЖК	Виды										
	<i>Oxyria digyna</i>	<i>Cerastium alpinum</i>	<i>Silene acaulis</i>	<i>Stellaria humifusa</i>	<i>Ranunculus sulphureus</i>	<i>Saxifraga cernua</i>	<i>Saxifraga cespitosa</i>	<i>Salix polaris</i>	<i>Betula nana</i>	<i>Dryas octopetala</i>	<i>Vaccinium uliginosum</i>
16:1 (n-7)		0.70 ± 0.02	0.89 ± 0.06	2.43 ± 0.13	0.83 ± 0.03	0.76 ± 0.02	0.77 ± 0.03	0.91 ± 0.07			1.42 ± 0.07
16:1 (n-5)	0.88 ± 0.04	1.37 ± 0.08			0.51 ± 0.01	2.83 ± 0.14	0.69 ± 0.02	1.22 ± 0.06	2.62 ± 0.08		1.47 ± 0.04
18:1 (n-7)									1.19 ± 0.04		
18:1 (n-9)	4.46 ± 0.32	4.04 ± 0.31	4.03 ± 0.31	14.17 ± 0.54	4.57 ± 0.38	3.83 ± 0.08	8.20 ± 0.42	5.56 ± 0.32	7.99 ± 0.53	2.26 ± 0.09	6.94 ± 0.58
20:1 (n-9)	0.96 ± 0.05			0.51 ± 0.01		0.53 ± 0.01	0.82 ± 0.05				15.77 ± 0.98
16:2 (n-6)							1.64 ± 0.09				
16:2 (n-9)		0.90 ± 0.07		0.72 ± 0.02	0.56 ± 0.02				7.37 ± 0.64		
18:2 (n-6)	27.28 ± 2.02	34.26 ± 1.67	26.14 ± 1.87	33.72 ± 1.45	7.40 ± 0.37	15.89 ± 0.73	22.02 ± 1.76	13.62 ± 0.78	13.79 ± 0.87	3.78 ± 0.12	8.93 ± 0.45
20:2 (n-6)	0.90 ± 0.04	2.99 ± 0.18		3.83 ± 0.14	3.64 ± 0.16	3.01 ± 0.24	5.95 ± 0.45	2.20 ± 0.09	3.47 ± 0.14	11.04 ± 0.69	1.59 ± 0.08
20:2 (n-4)					5.17 ± 0.27					27.63 ± 1.37	
22:2 (n-6)											
16:3 (n-4)	1.10 ± 0.07			0.75 ± 0.04							
16:3 (n-6)		0.66 ± 0.02			1.74 ± 0.06	0.79 ± 0.06		1.66 ± 0.04			
18:3 (n-3)	43.94 ± 2.95	17.13 ± 0.86	5.50 ± 0.45	8.45 ± 0.56	8.84 ± 0.66	35.28 ± 0.13	28.79 ± 1.76	28.67 ± 1.56	11.99 ± 0.76	1.99 ± 0.12	9.14 ± 0.69
18:3 (n-6)		3.43 ± 0.15	0.95 ± 0.07	3.79 ± 0.28	3.40 ± 0.13	0.58 ± 0.04					
18:3 (n-4)									0.80 ± 0.03		0.90 ± 0.04
18:4 (n-4)		3.97 ± 0.14		2.04 ± 0.12							
20:4 (n-4)	0.53 ± 0.02	1.74 ± 0.09	8.84 ± 0.76	2.20 ± 0.14	1.60 ± 0.08	3.90 ± 0.19	5.35 ± 0.47	4.14 ± 0.37	5.60 ± 0.37	1.30 ± 0.07	3.45 ± 0.27
20:4 (n-3)					8.59 ± 0.37	1.38 ± 0.07				3.06 ± 0.17	
22:4 (n-4)										11.45 ± 0.75	

Примечание. В таблице приведены величины содержания ЖК более 0.5%. Приведены средние значения со стандартной ошибкой (n = 3).

Исследованные виды растений различались по числу выделенных ЖК. Так, у *Oxyria digyna*, *Saxifraga cernua*, *Saxifraga cespitosa*, *Salix polaris* состав ЖК включал 6–7 ЖК, *Cerastium alpinum*, *Silene acaulis*, *Ranunculus sulphureus* и *Dryas octopetala* – 10 ЖК, тогда как у редких видов – *Vaccinium uliginosum*, *Betula nana* и *Stellaria humifusa* их число увеличивалось до 12–14 ЖК (табл. 2).

Содержание НЖК изменялось в диапазоне от 7 до 47%. Соотношение ННЖК/НЖК определяет разные свойства мембранных систем и реакцию растения на факторы среды. Оказалось, что это соотношение сильно варьирует: от максимальных значений у *Oxyria digyna* – 13, к средним значениям: *Salix polaris*, *Cerastium alpinum*, *Ranunculus sulphureus*, *Saxifraga cernua*, *Saxifraga cespitosa* в диапазоне от 5.7 до 4.6, и низким – у *Silene acaulis*, *Vaccinium uliginosum*, *Betula nana* и *Dryas octopetala* в диапазоне 1.2–1.6. В составе НЖК есть ЖКОДЦ – C20:0 и C22:0, которые присутствуют у *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Ranunculus sulphureus*, *Salix polaris*, *Vaccinium uliginosum*, *Betula nana* и *Dryas octopetala* в количестве от 0.5 до 4% (табл. 2).

Содержание моноеновых ЖК изменялось от 2 до 10%, наиболее высокие значения получили у кустарничков *Vaccinium uliginosum*, *Betula nana* и *Dryas octopetala*. Доминировали среди моноеновых олеиновая ЖК C18:1 (n-9), ее содержание между видами варьировало от 1 до 7%. Высокие значения отмечены у *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Betula nana*, *Dryas octopetala*, *Vaccinium uliginosum*. Среди моноеновых имеются ЖК с разным положением двойных связей – C16:1 (n-5,7), C18:3 (n-3,6). У видов этой группы (кро-

ме *Stellaria humifusa*) присутствовала гексадеценовая кислота C16:1(5), а ЖКОДЦ C20:1 (n-9) есть только у *Betula nana* и *Vaccinium uliginosum*.

Содержание диеновых ЖК варьировало от 5 до 25% с максимальными значениями у *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*. У всех видов доминировала линолевая ЖК C18:2 (n-6) с наиболее высокими значениями у *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Cerastium alpinum* (17–24%), у остальных значения ниже почти в 2 раза. Группа ЖКОДЦ представлена эйкозодиеновой ЖК C20:2 (n-6) со значениями до 1% у ряда видов: *Cerastium alpinum*, *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Ranunculus sulphureus*, *Betula nana*, *Dryas octopetala* и *Vaccinium uliginosum*.

Содержание триеновых ЖК варьировало в широком диапазоне – 25–84%. Доминировала α-линоленовая ЖК C18:3 (n-3). Следует отметить разнообразие ЖК по положению двойных связей; C16:3 (n-4,6) и C18:3 (n-3,6). В группу видов с высоким содержанием (56–80%) α-линоленовой ЖК вошли: *Oxyria digyna*, *Saxifraga cernua*, *Saxifraga cespitosa*, *Ranunculus sulphureus*, *Salix polaris*, а в группу с низким (25–50%) – *Cerastium alpinum*, *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Betula nana*, *Dryas octopetala* и *Vaccinium uliginosum*.

Группа тетраеновых ЖК в этой фракции представлена ЖК C18:4 (n-4) с содержанием 7% у *Cerastium alpinum* и *Stellaria humifusa*, ЖКОДЦ 20:4 (n-3) отмечена только у *Stellaria humifusa*, а C20:4 (n-4) – у *Ranunculus sulphureus*.

Результаты кластерного анализа по фракции ГЛ. В результате применения кластерного анализа было выделено восемь кластеров ($P > 95\%$), которые объединили в две группы (рис. 1). В пер-

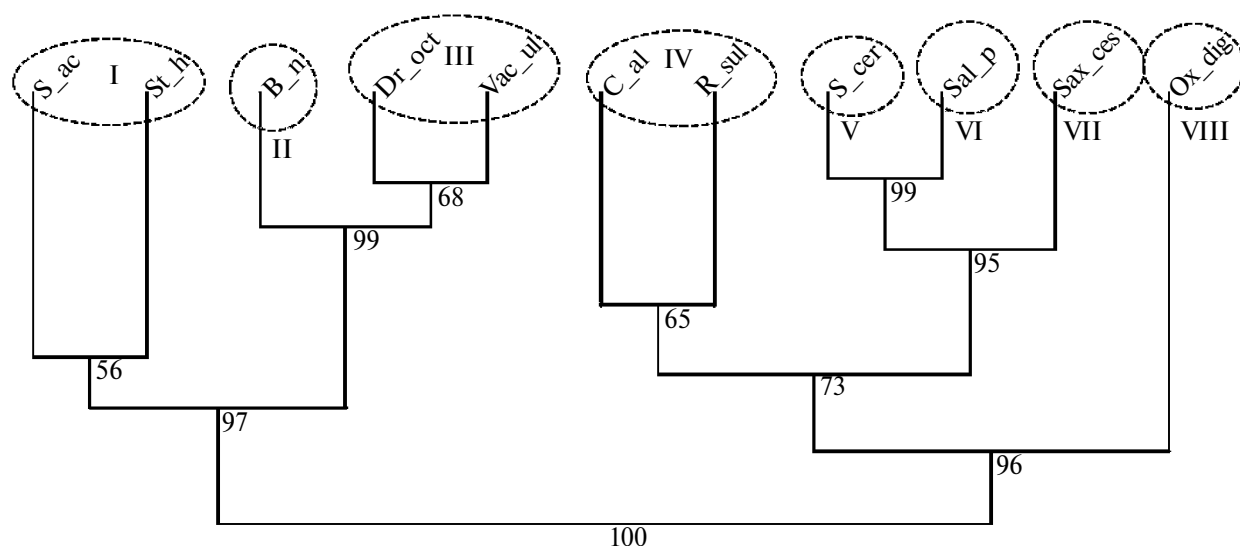


Рис. 1. Дендрограмма сходства высших сосудистых растений Западного Шпицбергена по составу и содержанию гликолипидов, полученная методом ближайшего соседа с нанесенными бутстреп-вероятностями ветвей (пунктиром разделены кластеры с доверительной вероятностью $> 95\%$): Ox_dig – *Oxyria digyna*; C_al – *Cerastium alpinum*; S_ac – *Silene acaulis*; St_h – *Stellaria humifusa*; R_sul – *Ranunculus sulphureus*; S_cer – *Saxifraga cernua*; Sax_ces – *Saxifraga cespitosa*; Sal_p – *Salix polaris*; B_n – *Betula nana*; Dr_oct – *Dryas octopetala*; Vac_ul – *Vaccinium uliginosum*.

вую группу вошли 5 видов из трех кластеров (I–III): *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Betula nana*, *Dryas octopetala* и *Vaccinium uliginosum*. Для данных видов характерно высокое содержание НЖК (27–46%) и диеновых ЖК (8–25%). Растения этой группы имели низкие и средние значения активности (I–III) за исключением *Stellaria humifusa* (IVa – табл. 1). Вторая группа объединила пять кластеров с IV по VIII с 6 видами (рис. 1), для которых отметили низкие значения содержания НЖК (7–20%) и высокие значения содержания триеновых ЖК (49–84%). По геоботанической характеристике виды этой группы были высоко активными или активными.

Таким образом, во фракции ГЛ выделили две группы видов с разным ЖК составом и соответственно разными путями адаптации на уровне липидной составляющей мембранных структур ФСА. Первый механизм связан с высокими значениями содержания триеновых ЖК на фоне низких значений НЖК, что поддерживает высокую функциональную активность ФСА и широкое распространение высоко активных и активных видов. Как правило, в сообществах арктических тундр – это доминирующие, широко распространенные виды Арктики, занимающие широкий спектр экотопов. Второй механизм поддерживает функциональную активность мембранных систем ФСА за счет высокого содержания НЖК и диеновых ЖК, что обеспечивает жизнедеятельность средне и низко-активных видов, имеющих ограниченное и локальное распространение.

Фракция ФЛ. ЖК этой фракции являются важными составляющими всех клеточных мембран и образуют матрикс мембран плазмалеммы и эндомембран, являются сигнальными молекулами [20]. Наряду с другими соединениями регулируют рост и развитие растений, клеточный ответ на изменения окружающей среды [21, 22].

Процентное содержание ЖК у изученных видов во фракции ФЛ имеет узкий диапазон (10–28%), что может свидетельствовать об ее функциональной унификации в растениях, по сравнению с другими фракциями (табл. 1). Во фракции ФЛ у всех видов выявили 18 ЖК: причем наименьшее количество оказалось у *Oxyria digyna* и *Saxifraga cespitosa* – 6–8, у *Cerastium alpinum*, *Ranunculus sulphureus*, *Dryas octopetala*, *Silene acaulis*, *Betula nana* – 9–10 и у *Stellaria humifusa* – 11 ЖК.

Количество НЖК изменялось в диапазоне 20–47%. Соотношение ННЖК/НЖК варьировало от 1.2 до 4.2. Наибольшие значения отметили у *Oxyria digyna* (4.2) и *Ranunculus sulphureus* (3.1); в следующую группу вошли *Cerastium alpinum*, *Saxifraga cespitosa* и *Salix polaris* (2.1, 2.3); остальные виды имели это соотношение в пределах 1.2–1.6, что свидетельствует о высоких значе-

ниях содержания НЖК. В состав НЖК входили ЖКОДЦ C20:0, которые отмечены у *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Dryas octopetala*, *Vaccinium uliginosum*, а C22:0 у *Silene acaulis* и *Ranunculus sulphureus* (табл. 2).

Содержание моноеновых ЖК изменялось от 6 до 13%. В составе моноеновых ЖК выявили четыре ЖК, из них гексадеценовая кислота C16:1 (n-5) доминировала у *Oxyria digyna*, *Dryas octopetala*, *Salix polaris*, *Betula nana*, *Vaccinium uliginosum*. Олеиновая ЖК C18:1 (n-9) преобладала у *Saxifraga cernua*, *Stellaria humifusa*, *Silene acaulis*, *Betula nana*, *Vaccinium uliginosum*. ЖКОДЦ C20:1 (n-9) была встречена у *Oxyria digyna* и *Vaccinium uliginosum*.

Содержание ЖК в группе диеновых изменялось от 12 до 37%. К доминирующим отнесли линолевую ЖК C18:2 (n-6), высокое ее содержание (до 36%) отметили у *Oxyria digyna*, *Silene acaulis*, *Cerastium alpinum*, *Stellaria humifusa*, *Saxifraga cespitosa*, у остальных видов значения были в два раза ниже. Присутствие эйкозодиеновой ЖКОДЦ C20:2 (n-6) отмечено у *Oxyria digyna* и *Betula nana* (около 1%).

Количество триеновых ЖК изменялось в диапазоне от 17 до 44%. Состав триеновых ЖК во фракции ФЛ менее разнообразен, чем у ГЛ. Содержание α-линоленовой кислоты C18:3 (n-3) составило (15–49 %), что значительно меньше (в 1.3–2.8 раза), чем во фракции ГЛ. Максимальные значения ее содержания получены у *Saxifraga cernua*, *Salix polaris*, *Saxifraga cespitosa*, *Ranunculus sulphureus* (37–49%). У видов *Cerastium alpinum*, *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Dryas octopetala* триеновые ЖК представлены с разным положением двойной связи – C18:3 (3,6).

Тетраеновые ЖК представлены в небольшом количестве в форме C18:4 (n-4) у *Cerastium alpinum* и *Stellaria humifusa*, а ЖКОДЦ C20:4 (n-4) была обнаружена только у *Ranunculus sulphureus*.

Результаты кластерного анализа по фракции ФЛ. Семь кластеров, полученных в результате проведения кластерного анализа данных фракции ФЛ, можно объединить в три группы видов (рис. 2). В первую группу вошли два кластера (I и II) с видами *Oxyria digyna*, *Cerastium alpinum*, *Stellaria humifusa* и *Silene acaulis*, для которых характерны высокие значения содержания диеновых ЖК (27–37%) и широкий диапазон НЖК (20–40%). Вторая группа включала два кластера (III и IV) со средними значениями НЖК (24–35%) и высокими значениями триеновых ЖК (37–54%). В третью группу вошли виды трех кластеров (V–VII): *Betula nana*, *Vaccinium uliginosum*, *Dryas octopetala*, для которых отмечены высокие значения содержания НЖК (39–47%). Сравнение видов разных групп по показателю “активность” показало, что в первую группу с высокими значениями активности (IV–V) вошел

вид со средней активностью *Silene acaulis* (III). Во второй группе оказались все виды с высокими значениями активности (IV–V), а в третьей группе наряду с видами с низкими значениями активности *Betula nana* и *Vaccinium uliginosum* (I и II) присутствовал вид со средней активностью (*Dryas octopetala*, III).

Следовательно, во фракции ФЛ выделили три основных направления адаптации на фоне широкого варьирования содержания НЖК: высокое содержание диеновых ЖК, высокие значения содержания триеновых ЖК и направление, связанное с высокими значениями содержания НЖК. В отличие от фракции ГЛ значимость участия НЖК увеличивается.

Фракция НЛ. ЖК фракции НЛ играют важную роль у растений в качестве энергетического и субстратного резерва клетки, что актуально для растений высоких широт. В нейтральных липидах ЖК в основном образуют триацилглицерины, которые концентрируются в липидных тельцах, а в форме восков — на поверхности листа и в других структурах растения [23]. Для этой фракции отмечено максимально высокое разнообразие индивидуальных ЖК (25), по сравнению с другими фракциями, что подтверждено и в литературе [24]. Процентное содержание фракции НЛ у видов различалось и изменялось в широком диапазоне — от 7 до 57% (табл. 1).

Содержание НЖК варьировало от 19 до 52%. Соотношение ННЖК/НЖК у разных видов существенно отличалось: высокие значения у *Oxyria digyna* (4.2), в группу со средними значениями (2.2–3.0) вошли *Cerastium alpinum*, *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa* *Saxifraga cernua*, *S. cespitosa*, для остальных видов характерны низкие значения в диапазоне 0.9–1.8 (*Ranunculus sulphureus*, *Salix polaris*, *Betula nana*, *Dryas octopetala*, *Vaccinium uliginosum*). В группу НЖК вошли три ЖКОДЦ: C20:0 представлена у 9 видов, C22:0

у 8 видов, а лигноцереновая ЖК C24:0 у *Dryas octopetala* с высоким содержанием — 4.1%. Высокое содержание ЖКОДЦ было отмечено у *Silene acaulis* C20:0 (22.5%), причем ее содержание выше, чем ЖК C16:0 — 17.7%. Сходная ситуация была и у *Dryas octopetala*, когда содержание ЖК C16:0 было 8.7%, а ЖКОДЦ C20:0 — 12.7%, а у *Vaccinium uliginosum* концентрации этих двух ЖК были сходными — 21–22%. Высокие значения ЖКОДЦ C22:0 имели *Oxyria digyna*, *Dryas octopetala* (8–11%).

Для НЛ характерны высокие значения содержания группы моноеновых ЖК по сравнению с другими фракциями (6–23%). Например, у *Stellaria humifusa* составило 17%, *Vaccinium uliginosum* — 23%. ЖКОДЦ C20:1 (n-9) была обнаружена у *Oxyria digyna*, *Stellaria humifusa*, *Saxifraga cernua*, *S. cespitosa*, *Vaccinium uliginosum*.

Содержание диеновых изменялось в диапазоне от 11 до 42%. Во фракцию вошли шесть диеновых ЖК, общее содержание которых у ряда видов (*Cerastium alpinum*, *Stellaria humifusa*, *Saxifraga cespitosa*, *Dryas octopetala*) составило 28–42%, что выше, чем в ГЛ и ФЛ. У всех видов доминировала ЖК C18:2 (n-6) с высоким содержанием (8–34%) за исключением *Dryas octopetala*. В этой группе широко представлены ЖКОДЦ. У всех видов присутствовала C20:2 (n-6) со значениями у *Dryas octopetala* (11.0%), *Saxifraga cespitosa* (5.9%), *Stellaria humifusa* (3.8%), *Ranunculus sulphureus* (3.5%), *Saxifraga cernua* и *Cerastium alpinum* (3.0%). ЖК C20:2 (n-4) обнаружена только у *Ranunculus sulphureus* (5.2%), ЖК C22:2 (n-6) у *Dryas octopetala* (27.60%).

Группа триеновых включала пять ЖК с общим высоким содержанием у *Oxyria digyna* (45%), *Saxifraga cernua* (37%), *Saxifraga cespitosa* (29%), *Salix polaris* (30%), *Cerastium alpinum* (21%), содержание у остальных видов находилось в пределах 2–12%. К редким ЖК в этой группе относится

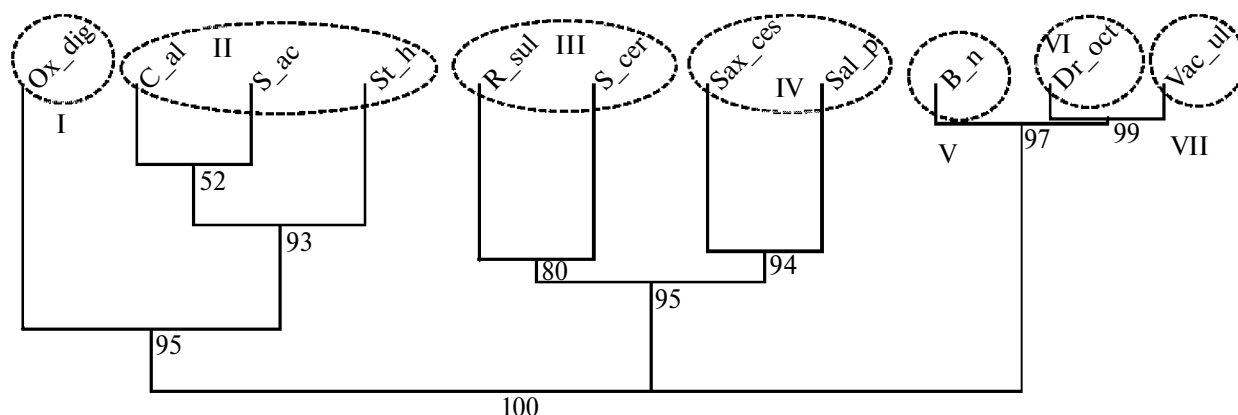


Рис. 2. Дендрограмма сходства высших сосудистых растений Западного Шпицбергена по составу и содержанию фосфолипидов: Ox_dig — *Oxyria digyna*; C_al — *Cerastium alpinum*; S_ac — *Silene acaulis*; St_h — *Stellaria humifusa*; R_sul — *Ranunculus sulphureus*; S_cer — *Saxifraga cernua*; Sax_ces — *Saxifraga cespitosa*; Sal_p — *Salix polaris*; B_n — *Betula nana*; Dr_oct — *Dryas octopetala*; Vac_ul — *Vaccinium uliginosum*.

C18:3 (n-4), которая была обнаружена только у *Betula nana* и *Vaccinium uliginosum* (0.8 и 0.9%, соответственно).

В группу тетраеновых вошли четыре ЖК, из которых ЖКОДЦ C20:4 (n-4) оказалась доминирующей и присутствовала у всех видов, но с более высоким содержанием у *Silene acaulis* (8.8%), *Saxifraga cespitosa* (5.3%), *Betula nana* (5.6%). У трех видов присутствует C20:4 (n-3) с высоким значением у *Ranunculus sulphureus* (8.6%), и только ЖК C22:4 (n-4) с содержанием 11.5% была обнаружена у *Dryas octopetala*.

Результаты кластерного анализа по фракции НЛ. По результатам кластерного анализа выделили 5 кластеров, которые объединили в 3 группы (рис. 3). Первая группа включала один кластер (I), в который вошли виды с широкими диапазонами варьирования всех ЖК: *Oxyria digyna*, *Cerastium alpinum*, *Silene acaulis*, *Stellaria humifusa*, *Ranunculus sulphureus*. Все виды этой группы имели высокую активность (IV–V), кроме *Silene acaulis* (III). Отмечен большой диапазон варьирования содержания НЖК (19–52%) и доминирование диеновых ЖК. Во вторую группу вошли 3 вида из II кластера также с высокой активностью: *Saxifraga cernua* (IVa), *Saxifraga cespitosa* (IVb), которые характеризовались высокими значениями триеновых ЖК (29–37%). В третьей группе оказались виды трех кластеров с активностями (III–V), для которых характерны высокие значения НЖК (до 50%) в сочетании с высокими значениями разных ННЖК (до 50%). Для трех видов *Dryas octopetala*, активность (III), для *Betula nana* и *Vaccinium uliginosum* – активность (I–II) характерно присутствие всего состава ЖК и высокие значения НЖК.

Полученные данные показали участие большого числа ЖК фракции НЛ у всех видов арктических растений, что затрудняло выделе-

ние основных направлений их участия в адаптации. Однако можно предположить, что фракция НЛ является резервом, который используется в условиях повышения экстремальности среды в период активной вегетации.

Проведенное исследование показало, что имеется связь между составом ЖК отдельных фракций липидов и показателем “активность вида” у растений разного географического происхождения и экологии в условиях Западного Шпицбергена. Наиболее четко эта зависимость просматривалась у видов по фракции ГЛ, что связано с ее высоким уровнем значимости в период активной вегетации, когда проводили исследование. В результате анализа данных по составу ЖК разных фракций липидов выделили два вида (*Silene acaulis* и *Stellaria humifusa*), у которых “показатель активности” не всегда соответствовал группам по составу ЖК, в которые они входили. Например, *Silene acaulis* с активностью (III), во фракции ФЛ вошла в группу видов с высокими значениями активности (IV–V). Причиной этого несоответствия могут быть более благоприятные локальные условия местообитания, которые и способствовали повышению жизнедеятельности вида. Особый интерес вызвал вид *Stellaria humifusa* с высоким значением “активности вида” (IVa), который вошел в группу низко активных видов во фракции ГЛ. Представители этого вида были отобраны со скального экотопа приморской территории, где он формирует редкую жизненную форму – “мат”, местообитание и жизненная форма резко отличаются от других условий произрастания [25]. Это могло быть причиной более низкой активности в данном локальном экотопе, но не исключает и других причин обсуждаемого несоответствия. Однако отмеченные закономерности удивляют больше, чем их нарушения и подчеркивают высокий уровень

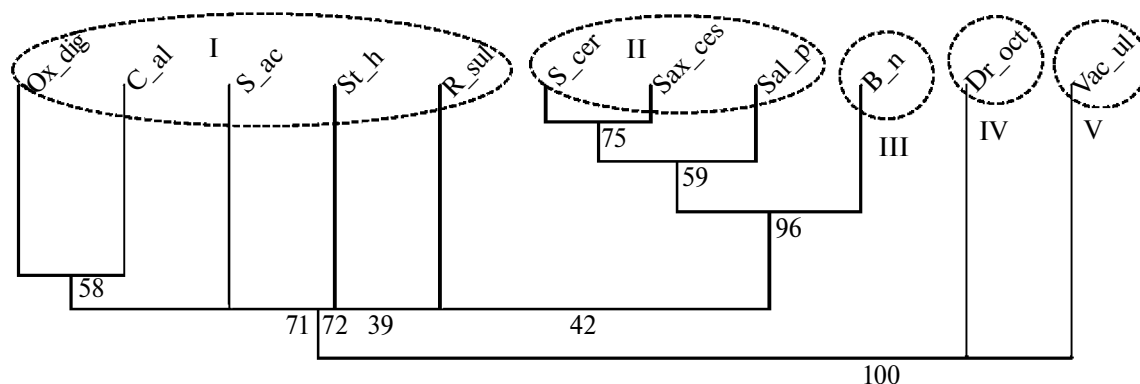


Рис. 3. Дендрограмма сходства высших сосудистых растений Западного Шпицбергена по составу и содержанию нейтральных липидов: Ox_dig – *Oxyria digyna*; C_al – *Cerastium alpinum*; S_ac – *Silene acaulis*; St_h – *Stellaria humifusa*; R_sul – *Ranunculus sulphureus*; S_cer – *Saxifraga cernua*; Sax_ces – *Saxifraga cespitosa*; Sal_p – *Salix polaris*; B_n – *Betula nana*; Dr_oct – *Dryas octopetala*; Vac_ul – *Vaccinium uliginosum*.

выявленных взаимосвязей между “поведением” вида в растительном сообществе, его экологической амплитудой [14, 15] и жирнокислотным составом разных фракций липидов.

Основные направления адаптации, связанные с липидной составляющей, включали участие НЖК, группы моноеновых, диеновых и триеновых ЖК в разных соотношениях в зависимости от эколого-географических особенностей видов.

В механизмах путей адаптации исследованных видов участвует сходный состав ЖК, но в зависимости от эколого-физиологических особенностей видов, он значимо перестраивается. Отличительной особенностью растений Арктики является увеличение значимости НЖК, содержание которых значимо варьировало по фракциям и видам. Считается, что биосинтез диеновых ЖК C18:2 (n-6) и триеновых ЖК C18:3 (n-3) обеспечивает биохимическую адаптацию растений к низкой температуре [26], что подтвердилось и в наших экспериментах. Высокая представленность триеновых во фракции ГЛ была отмечена в высокогорьях южных широт у растений Альп [27]. Следует отметить для арктических растений активное участие диеновых и даже моноеновых ЖК, что было отмечено для редкого вида *Vaccinium uliginosum*.

Участие в ЖК составе разных групп ЖКОДЦ у растений Арктики заслуживает специального внимания. Одна из гипотез их присутствия во фракции ГЛ предполагает, что они могут связывать молекулы белков на поверхности клеточных мембран. Эта группа ЖК может наряду с НЖК регулировать текучесть мембран в условиях стресса [20]. Вариант их активности может объяснить значимое увеличение их содержания во фракции ГЛ у *Betula nana* и *Vaccinium uliginosum*, которые являются редкими видами и могут испытывать стресс.

Участие ЖКОДЦ во фракции ГЛ и ФЛ может быть связано с формированием структурных компонентов различных мембран, в том числе и специфической мембранной структуры — хондриома, которая обеспечивает высокий уровень дыхания у растений в условиях Арктики [28]. Более высокие значения ЖКОДЦ у всех видов были во фракции НЛ. В условиях климата северных широт большое защитное значение имеют покровные структуры листа, фонды запасаения, формирование которых связано с большим разнообразием и высоким содержанием ЖКОДЦ во фракции НЛ.

Выявленные зависимости показали, что в условиях высоких широт в обеих стратегиях адаптации [2] липидная составляющая в составе фракций ГЛ, ФЛ и НЛ играет важную роль: обеспечивает и поддерживает функциональную активность видов и их устойчивость в зависи-

мости от эколого-географических особенностей, происхождения и адаптивного потенциала в условиях высокой Арктики.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов изучения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернов Ю.И. Экология и биогеография. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 580 с.
2. Матвеева Н.В. Зональность в растительном покрове Арктики // Труды БИН им. В.Л. Комарова РАН. СПб, 1998. Вып. № 21. 219 с.
3. Körner Ch. Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003. 360 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-18970-8>
4. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plant // New Phytol. 2008. V. 179. P. 615.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02478.x>
5. Марковская Е.Ф., Шмакова Н.Ю. Растения и лишайники Западного Шпицбергена: экология, физиология. Петрозаводск: ПетрГУ, 2017. 270 с.
6. Марковская Е.Ф., Розенцвиг О.А., Шмакова Н.Ю., Зорина А.А., Ильинова М.А. Участие липидов в адаптации высших сосудистых растений к условиям Западного Шпицбергена // Журнал общей биологии. 2021. Т. 82. № 6. С. 419.
<https://doi.org/10.31857/S0044459621060063>
7. Wallis J.G., Browse J. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids // Prog. Lipid Res. 2002. V. 41. P. 54.
[https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00027-3)
8. Upchurch R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plant to stress // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. P. 967.
<https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>
9. Алаудинова Е.В., Миронов П.В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 2. Особенности метаболизма жирных кислот фосфолипидов меристем *Larix sibirica* Lebeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 71.
10. Nokhsorov V.V., Dudareva L.V., Petrov K.A. Content and composition of lipids and their fatty acids in needles of *Pinus sylvestris* L. and *Picea obovate* Ledeb. upon cold hardening in the cryolithozone of Yakutia // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 548.
<https://doi.org/10.1134/S1021443719040101>
11. Семенов А.В., Анциферова А.Р., Давыдов А.А. Климат Баренцбурга. Изменения основных характеристик за последние 40 лет (по данным наблюдений зональной гидрометеобсерватории

- “Баренцбург”) // Материалы II Международной конференции “Комплексные исследования природы Шпицбергена”. Апатиты, 2002. Вып. 2. С. 139.
12. Rønning O.I. The Flora of Svalbard. Oslo: Norsk Polarinstitut, 1996. 184 p.
 13. Шуляковская Т.А., Ильинова М.К., Карелина Т.В. Липидный состав тканей ствола *Betula pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Betulaceae) // Растительные ресурсы. 2014. Т. 50. № 1. С. 94.
 14. Юрцев Б.А. Флора Сунтар-Хаята: Проблемы истории высокогорных ландшафтов Северо-Востока Сибири. 1968. Л.: Наука, 235 с.
 15. Королева Н.Е., Константинова Н.А., Белкина О.А., Давыдов Д.А., Лихачев А.Ю., Савченко А.Н., Урбанавичене И.Н. Флора и растительность побережья залива Грен-фьорд (архипелаг Шпицберген). Апатиты, 2008. 132 с.
 16. Коросов А.В. Специальные методы биометрии. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 364 с.
 17. Шитиков В.К., Розенберг Г.С. Рандомизация и бутстреп: статистический анализ в биологии и экологии с использованием R. Тольятти: Кассандра, 2013. 314 с.
 18. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 2014. 372 с.
 19. Filek M., Gzyl B., Laggner P., Kriechbaum M. Effect of indole-3-acetic acid on surface properties of the wheat plastid lipids // J. Plant Physiol. 2005. V. 162. P. 245. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.07.013>
 20. Zhukov A.V. Very long-chain fatty acids in composition of plant membrane lipids // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 784. <https://doi.org/10.1134/S1021443718050187>
 21. Джамеев В.Ю. Фосфолипидный сигналинг у растений // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. 2014. № 3 (33). С. 80.
 22. Nakamura Y. Plant phospholipid diversity: emerging functions in metabolism and protein–lipid interactions // Trends Plant Sci. 2017. V. 22. P. 1027. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.002>
 23. Chapman K.D., Dyer J.M., Mullen R.T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants // J. Lipid Res. 2012. V. 53. P. 215. <https://doi.org/10.1194/jlr.R021436>
 24. Юровицкий В.Г., Сидоров В.С. Эколого-биохимический мониторинг и эколого-биохимическое тестирование в районах экологического неблагополучия // Известия РАН. Сер. Биология. 1993. № 1. С. 74.
 25. Шмакова Н.Ю., Марковская Е.Ф., Морозова К.В., Ермолаева О.В., Литвинова Т.И. Пути адаптации *Stellaria humifusa* на приморских территориях Западного Шпицбергена // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2022. Т. 27. № 2. С. 294. <https://doi.org/10.31242/2618-9712-2022-27-2-294-304>
 26. Живетьев М.А., Дударева Л.В., Краснобаев В.А., Граскова И.А., Войников В.К. Содержание жирных кислот и активность десатураз у манжетки городковатой *Alchemilla subcrenata* Buser в зависимости от суточных колебаний температур // Известия Иркутского государственного университета. Серия “Биология. Экология”. 2011. Т. 4. № 3. С. 3.
 27. Murakami Y., Tsuyama M., Kobayashi Y., Kodama H., Iba K. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature // Science. 2000. V. 287. P. 476. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.476>
 28. Семихатова О.А. Эколого-физиологические исследования темнового дыхания растений: прошлое, настоящее, будущее // Ботанический журнал. 2000. Т. 85. № 4. С. 15.

УДК 581.1:577.115.32:582.632.1

ФРАКЦИОННЫЙ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ФРАГМЕНТОВ ПОЧЕК ПО ФАЗАМ РАСПУСКАНИЯ У РАСТЕНИЙ РОДА *Betula*¹

© 2024 г. И. В. Морозова^{а, *}, Н. П. Чернобровкина^б, В. П. Пчёлкин^с^аИнститут водных проблем Севера — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра

“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

^бИнститут леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра

“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

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

*e-mail: irinamorozova1502@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

У растений рода *Betula* L. с морфологическими признаками березы пушистой *B. pubescens*, березы повислой *B. pendula* и карельской березы *B. pendula* var. *carelica* во фрагментах почек по фазам их распускания исследованы показатели роста и влажности, а также содержание и состав жирных кислот (ЖКС) отдельных фракций суммарных липидов (СЛ). Фракции нейтральных липидов (НЛ), гликолипидов (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ) выделяли из СЛ хлороформом, ацетоном и метанолом, соответственно. Растущие зачаточные листья отличались повышенной массой и влажностью по сравнению с чешуями и прилистниками. В зачаточных листьях по сравнению с другими фрагментами почек по фазам распускания отмечено высокое абсолютное содержание СЛ в I фазе и падение уровня СЛ по другим фазам, значительное абсолютное накопление НЛ и ФЛ к III фазе и использование в IV фазе при накоплении ГЛ в эту фазу, высокий уровень ненасыщенных жирных кислот (ННЖК) СЛ и их отдельных фракций в исследуемый период, повышение в составе ФЛ и ГЛ уровня линоленовой кислоты ($C_{18:3}$) к IV фазе, а также рост относительного содержания пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) в составе ГЛ к III фазе и снижение ее уровня в IV фазе. ЖКС фракций СЛ фрагментов распускающихся почек берез был представлен преимущественно ННЖК (до 88% от суммы ЖК). Основную долю ННЖК составляли $C_{18:3}$ и линолевая ($C_{18:2}$) (до 55 и 47% от суммы ЖК соответственно), в насыщенных ЖК преобладала $C_{16:0}$ (до 42%). У трех берез при развитии почек по фазам распускания в их отдельных фрагментах как в СЛ, так и во всех фракциях СЛ относительное содержание $C_{18:2}$ снижалось при повышении в составе ГЛ и ФЛ — $C_{18:3}$. У этих берез, различающихся по морфологическим признакам, отличительные особенности липидного состава выявлены преимущественно в чешуях.

Ключевые слова: *Betula*, фрагменты почек, фазы распускания, суммарные липиды, нейтральные липиды, фосфолипиды, гликолипиды, жирные кислоты.

DOI: 10.31857/S0015330324060059, EDN: MARTZH

ВВЕДЕНИЕ

Береза (*Betula*) — род листопадных деревьев и кустарников семейства Березовые (*Betulaceae*), широко распространенных на территории Рос-

сии, в Северном полушарии и во многих других регионах планеты. Исследования этой древесной породы представляют большой научный и практический интерес, поскольку род *Betula* включает много ценных видов и форм [1–4]. В России преобладают два вида: береза повислая *B. pendula* Roth (1788) и береза пушистая *B. pubescens* Ehrh. (1789). Особенно ценной из-за узорчатого рисунка древесины является разновидность березы повислой — карельская береза (*B. pendula* var. *carelica* (Merckl.) Hamet-Ahti (1984)). Широ-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324060059

Сокращения: ГЛ — гликолипиды; ЖК — жирные кислоты; ЖКС — состав жирных кислот; листочки — зачаточные листья, НЖК — насыщенные жирные кислоты; НЛ — нейтральные липиды; ННЖК — ненасыщенные жирные кислоты; СЛ — суммарные липиды; ФЛ — фосфолипиды.

кое распространение березы в различных широтах, в том числе в условиях Севера, обусловлено высоким адаптационным потенциалом ее к условиям среды. Закладка почек берез происходит задолго до их распускания, в июле–августе. В защищенном, закрытом состоянии ткани почек проводят более 10 месяцев, успешно сохраняя жизнеспособность и потенциал для развития побега в весенний период. Определяющее значение в адаптационных механизмах почек березы имеет структурно-функциональная организация их фрагментов — почечных чешуй, прилистников и зачаточных листьев (далее — листочков). Чешуи, прилистники и особенно листочки различных видов берез густо покрыты выделяющимися липиды железками, располагающимися неодинаково на отдельных фрагментах почки.

Фракционный и жирнокислотный состав мембранных и запасных липидов клеточных структур растений определяет их функциональную, в том числе адаптационную активность. Среди лиственных древесных растений такие исследования проведены преимущественно на растениях рода *Betula*. При изучении сезонной динамики суммарных липидов (СЛ) в почках различных видов березы было показано, что максимум их накопления приходится на осенне-зимний период [5, стр. 105]. Весной количество липидов в почках снижается, что объясняется использованием их на ростовые процессы. Проведенные нами ранее исследования показали, что по фазам распускания почек березы отмечаются значительные изменения в содержании СЛ, их фракций и ЖКС фракций липидов [4]. Полученные данные позволяют заключить, что в период распускания почек при формировании ассимиляционного аппарата происходят значительные преобразования компонентов мембран, в частности входящих в их состав двух самых главных групп полярных липидов — гликолипидов (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ), а также неполярных нейтральных липидов (НЛ). Динамика СЛ, их фракций и жирнокислотный состав (ЖКС) фракций липидов по фазам распускания фрагментов почек березы остаются не исследованными. Для выявления закономерностей изменения липидного состава в почках лиственных древесных растений в период перехода их к активной вегетации и участия в этом процессе отдельных фрагментов почек, в первую очередь, необходимо исследование как относительного содержания отдельных фракций СЛ, так и ЖКС их липидов во фрагментах почек по фазам распускания, в частности, у растений рода *Betula*.

При изучении состава липидов по фазам распускания почек растений рода *Betula* выявлены заметные отличия в динамике содержания СЛ, их фракций и ЖКС фракций липидов у березы пушистой, березы повислой и карельской березы [4].

Для понимания общих закономерностей и видовых особенностей изменения липидного состава во фрагментах почек по фазам их распускания у растений рода *Betula* возникла необходимость изучить в этом отношении разные виды берез.

Цель работы — исследование у различных представителей растений рода *Betula* показателей роста, влажности, абсолютного содержания как СЛ, так и отдельных фракций этих липидов совместно с изучением ЖКС СЛ и их фракций фрагментов почек (чешуй, прилистников и листочков) по отдельным фазам распускания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика объекта. Исследовали вегетативные почки 30-летних растений рода *Betula* с характерными морфологическими признаками березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh., березы повислой *Betula pendula* Roth и карельской березы *Betula pendula* var. *carelica* (Merckl.) Hamet-Ahti, произрастающих на пробных площадях чистых березовых насаждений агробиологической станции Карельского научного центра РАН в черте г. Петрозаводска, Республика Карелия, Россия (61°47'46" с.ш., 34°20'57" в.д.). Для анализа отбирали по 70–100 почек с каждого из трех деревьев одного вида, всего исследовали 9 деревьев. Температура воздуха в период исследования соответствовала периоду вегетационной весны — начало периода приходилось на переход средней суточной температуры воздуха через 5°C, окончание — на переход через 15°C. Идентификацию исследуемых берез проводили по морфологическим признакам [4].

Подготовка образцов. Образцы были получены с 29 апреля по 20 мая 2008 г. Боковые ветви срезали с южной стороны средней части кроны берез одновременно в утренние часы (10–11 ч) в соответствии с фенофазами распускания почек: I фаза — набухание почек (почки заметно увеличились в размерах, конец апреля), II фаза — разverzание почек (в верхней части почек появился конус молодых листьев, начало мая); III фаза — раскрытие вегетативных почек, молодые листья сложены в трубочку, вторая декада мая); IV фаза — молодые листья размером до 10 мм (обособление молодых листьев, поверхность листьев складчатая, видны черешки, третья декада мая). Фазы распускания почек у исследуемых растений прослеживали визуально, в год проведения эксперимента по срокам они совпадали. Почки отделяли от свежесрезанных побегов и разбирали на фрагменты: чешуи, прилистники, листочки, определяли их влажность, сухую массу одной почки.

Экстракция липидов и разделение их на фракции. Образцы растительного материала растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. Липиды экстрагировали смесью

хлороформ-метанол (2 : 1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на 1 часть анализируемой пробы. Для очистки от водорастворимых примесей экстракт промывали водой. Хлороформ из липидного экстракта отгоняли. Разделение липидов на отдельные фракции выполняли методом колоночной хроматографии в стеклянных пипетках Пастера (объем 3 мл, длина 230 мм, диаметр 7 мм), заполненных силикагелем (Davisil, 100–200 мкм, Sigma Aldrich, США). Фракцию нейтральных липидов элюировали хлороформом, гликолипидов – ацетоном, а фосфолипидов – метанолом. Полноту экстракции отдельных фракций контролировали путем сбора их порций и последующим сжиганием в концентрированной серной кислоте при 200°C в течение 15 мин в термостате, а также дальнейшей УФ-спектрофотометрией полученных растворов при 375 нм. Массу каждого препарата СЛ и отдельных фракций СЛ определяли в процентах от абсолютно сухого веса растительного образца.

Анализ ЖК. Метилловые эфиры ЖК СЛ и их фракций, полученные реакцией переэтерификации с безводным метанолом (99.8%) и ацетилхлоридом (95.0%), растворяли в н-гексане. Анализ метиловых эфиров ЖК проводили методом газожидкостной хроматографии на газовом хроматографе Кристалл 5000.1 (Хроматэк, Россия). Для разделения использовали капиллярную колонку ZB-FFAP 50 м × 0.32 мм × 0.5 мкм (Zebron, Phenomenex, США). Ее стационарной фазой служил полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталатом. Объем вводимого образца метиловых эфиров ЖК составлял 1 мкл. Разделение этих эфиров проводили в изотермическом режиме при 190°C. Газ-носитель колонки – азот. Расход 50 мл/мин. Температура камеры испарителя – 240°C, пламенно-ионизационного детектора – 260°C. Расход водорода и воздуха – 40 и 400 мл/мин соответственно. Метилловые эфиры индивидуальных ЖК идентифицировали по времени удерживания в тех же условиях 37 отдельных компонентов смеси их метиловых эфиров с длинами цепей от C₄ до C₂₅ (Supelco, США), а также путем сравнения полученных данных со стандартной эквивалентной длиной цепи [6]. Концентрацию каждой ЖК рассчитывали по площадям пиков методом нормализации. Индивидуальные ЖК были выделены в группы, отличавшиеся по числу двойных связей в углеродной цепи: ненасыщенные (моноеновые, диеновые и триеновые, ННЖК) и насыщенные (при отсутствии двойных связей в их цепи, НЖК). Для сравнительного анализа состава ЖКС отдельных фракций липидов фрагментов почек берез между собой и по фазам распускания были использованы главные ЖК, которые составляли наибольшую долю от суммы ЖК: пальмитиновая (C_{16:0}), стеариновая (C_{18:0}),

олеиновая (C_{18:1}), линолевая (C_{18:2}), линоленовая (C_{18:3}). Эти ЖК присутствовали во всех фракциях липидов фрагментов почек всех берез и именно они определяли динамику ЖКС в период исследования. Относительное содержание всех ЖК определяли в массовых процентах от их общего содержания указанных главных ЖК в исследуемом образце.

Индекс двойной связи (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности ЖК рассчитывали по формуле:

$$\text{ИДС} = \sum P_j n / 100, \text{ где:}$$

P_j – содержание ЖК (% от суммы ЖК);

n – количество двойных связей.

Коэффициент ненасыщенности (К) ЖК определяли по формуле:

$$K = \sum \text{ННЖК} / \sum \text{НЖК}.$$

Статистическая обработка данных. Эксперимент проводили в трех биологических повторностях для каждого из трех представителей рода *Betula*. Результаты были статистически обработаны с помощью программ Statistica 10.0, Past 4.13. В многофакторном компонентном дисперсионном анализе рассматривали кластеризацию выборок по методу главных компонент, учитывая массу, влажность, содержание СЛ, НЛ, ФЛ и ГЛ на единицу сухого вещества фрагментов почек, при этом данные были предварительно нормализованы. Для определения характера распределения использован критерий Шапиро-Уилка. Оценку различий между вариантами выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим проведением апостериорного теста (поправки Тьюки). Результаты представляли в виде $M \pm Sd$ (где M – среднее значение ($n = 3$), Sd – стандартное отклонение). Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общие закономерности. На основании многофакторного компонентного анализа (РСА), объекты были сгруппированы по величинам показателей массы, влажности, содержания СЛ, НЛ и ГЛ фрагментов почек по фазам распускания с учетом видовой принадлежности растений (рис. 1). На разделение объектов по группам в большей степени оказали влияние фракции липидов – СЛ, НЛ и ГЛ. Масса и ФЛ вносили незначительную факторную нагрузку. Во всех фрагментах почек, особенно в листочках, отчетливо выделялись группы по фазам распускания, причем наиболее заметно выделялась I фаза (рис. 1а–в).

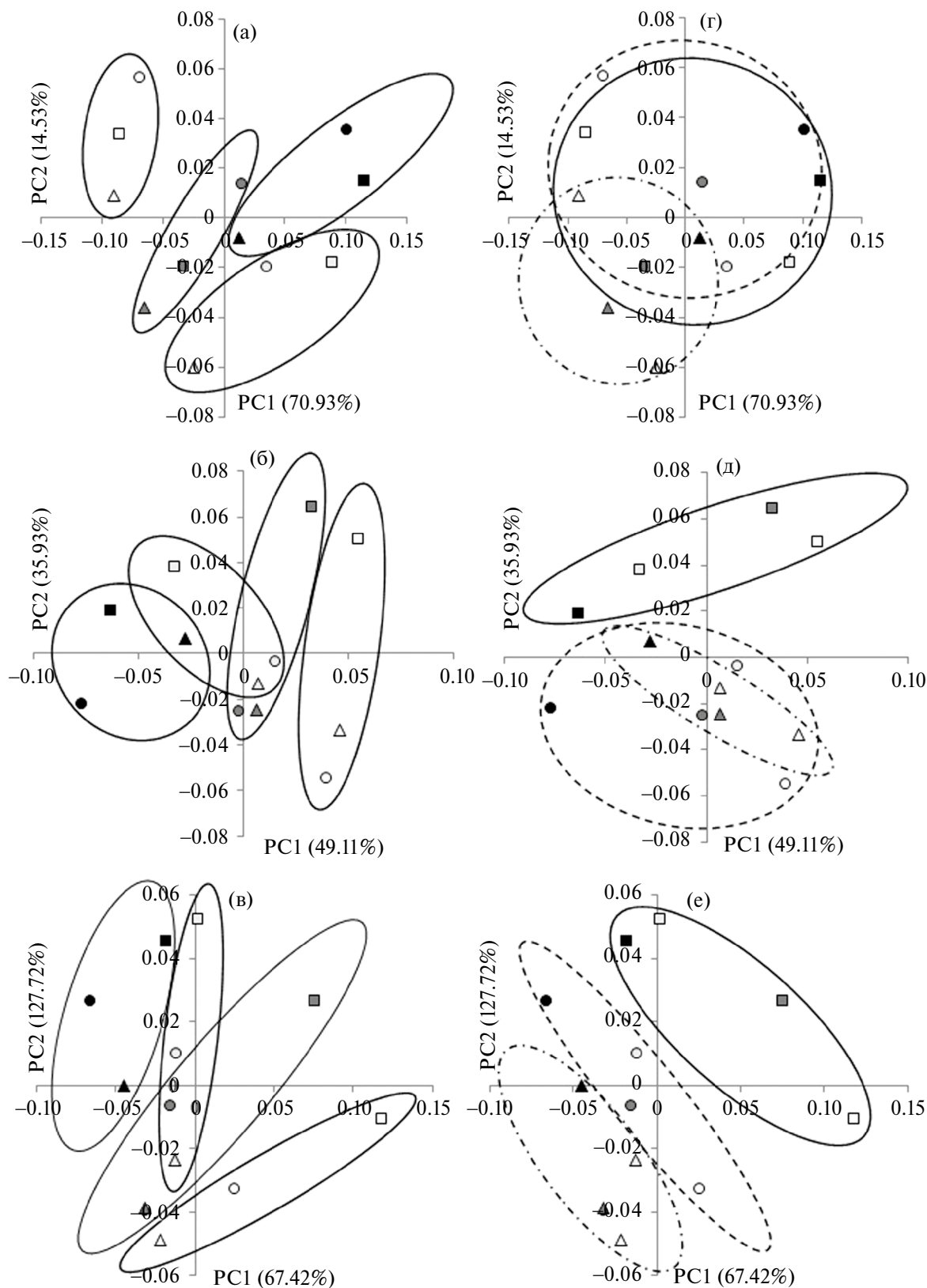


Рис. 1. Ординация 36 образцов фрагментов почек берез: $\square$ – *B. pubescens*, $\circ$ – *B. pendula*, $\triangle$ – *B. pendula* var. *carelica*. Эллипсы а–в группируют фазы распускания; г–е – виды берез. Фазы распускания: I – белый, II – серый, III – светло-серый, IV – черный, а, г – PC 1 (70.93% дисперсии) коррелировал с влажностью ($r = 0.87$), содержанием СЛ ($r = 0.36$); PC 2 (14.53% дисперсии) коррелировал с содержанием НЛ ($r = 0.55$) и ГЛ ($r = 0.75$); б, д – PC 1 (49.11% дисперсии) коррелировал с влажностью ($r = 0.72$), содержанием СЛ ($r = 0.35$) и ГЛ ($r = 0.57$); PC 2 (35.93% дисперсии) коррелировал с содержанием СЛ ($r = 0.69$) и НЛ ($r = 0.59$); в, ж – PC 1 (67.42% дисперсии) коррелировал с содержанием СЛ ($r = 0.72$), содержанием НЛ ($r = 0.50$) и ГЛ ($r = 0.43$); PC 2 (27.72% дисперсии) коррелировал с влажностью ($r = 0.71$), содержанием НЛ ($r = 0.47$) и ГЛ ($r = 0.50$).

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что масса листочков по сравнению с другими фрагментами почек была максимальной у всех берез, и, в отличие от других фрагментов почек, возрастала по фазам их распускания (рис. 2а). Влажность листочков также была максимальной по сравнению с другими фрагментами почек и возрастала у всех фрагментов по фазам распускания (рис. 2б).

Листочки в I фазу распускания отличались большим уровнем СЛ по сравнению с прилистниками и чешуями (рис. 3а). Снижение содержания СЛ в исследуемый период происходило у трех берез только в листочках. Накопление фракций НЛ и ФЛ отмечалось также только в листочках к III фазе, далее в IV фазу в них происходило снижение уровня НЛ (рис. 3б, в). Фракция ГЛ в листочках трех берез имела противоположно направленную динамику по сравнению с фракциями НЛ и ФЛ (рис. 3г). Отмечалось снижение уровня ГЛ в чешуях и прилистниках по фазам распускания почек берез. Наблюдали снижение уровня ФЛ в чешуях и прилистниках в процессе распускания почек от I к IV фазе (рис. 3в).

Отмечалось преобладание в I фазу в СЛ всех фрагментов почек трех берез НЖК (Дополнительные материалы, табл. 1–3). Происходило

снижение уровня НЖК СЛ к III фазе в прилистниках у всех берез и в листочках у березы повислой и карельской. Наблюдали стабильный уровень этого показателя в листочках у березы пушистой в процессе распускания почек. В чешуях почек трех берез по сравнению с другими фрагментами в I фазу отмечался пониженный уровень НЖК СЛ, который в большей мере был обусловлен их низким содержанием в запасных НЛ (на фоне низкого уровня $C_{18:3}$ в НЛ), а отнюдь не в мембранных ФЛ и ГЛ. Отмечалось отсутствие однозначно выраженной динамики НЖК СЛ и ФЛ во фрагментах почек по фазам распускания. Показано преимущественное содержание $C_{18:3}$, $C_{18:2}$ и $C_{16:0}$ в ЖКС СЛ и их фракций фрагментов почек берез, а также значительные изменения их уровня по фазам распускания почек. Уровни $C_{18:0}$ и $C_{18:1}$ заметно не менялись на протяжении всего периода исследования.

Видовые отличия. При рассмотрении видовых отличий показателей фрагментов почек у трех представителей рода *Betula* с использованием многофакторного компонентного анализа именно в чешуях выделены группы по видам. Особенно отчетливо выделяется береза пушистая, группы березы повислой и карельской располагались близко (рис. 1е). В прилистниках

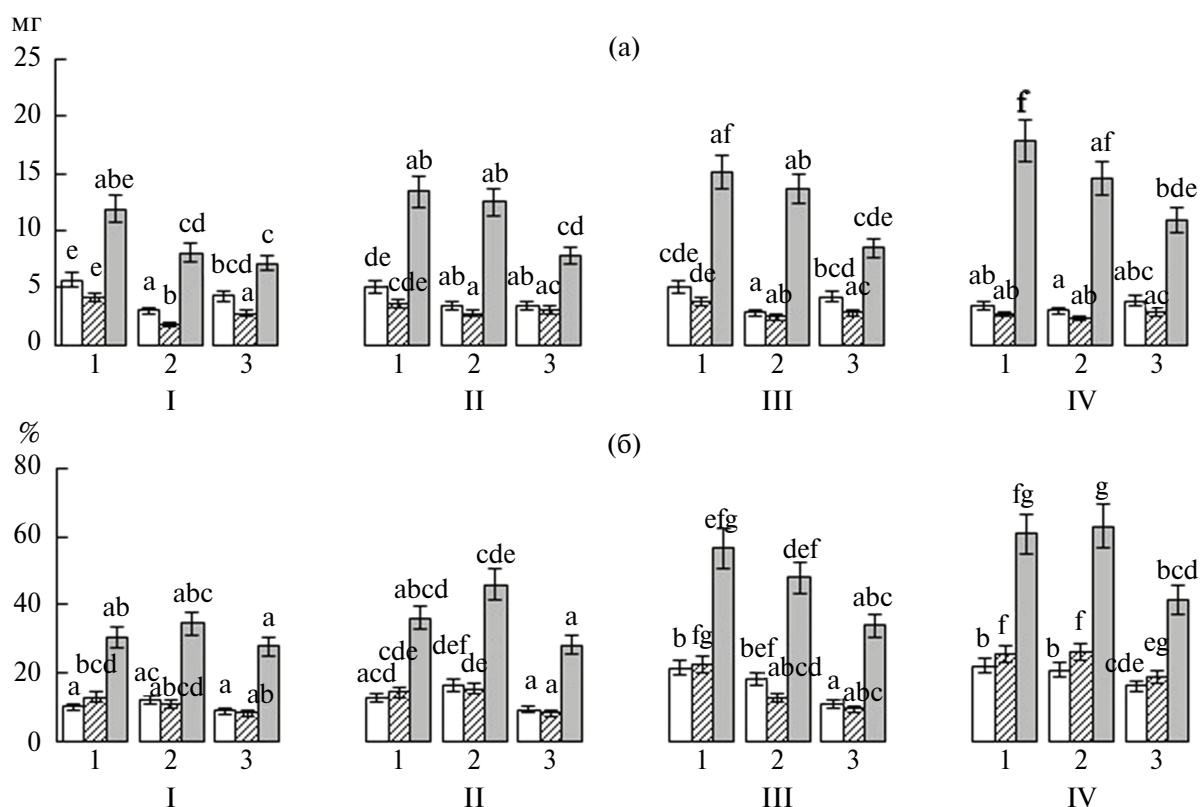


Рис. 2. Сухая масса (а) и влажность (б) фрагментов одной почки разных видов и формы *Betula*: (1) *B. pubescens*, (2) *B. pendula*, (3) *B. pendula* var. *carelica*. Белый, штриховка, серый — чешуи, прилистники, листочки соответственно. I–IV — фазы распускания. Сравнения проводили для каждого фрагмента по фазам распускания и по видам березы. Каждое значение представляет среднее из трех биологических повторностей и их стандартное отклонение. Разными латинскими буквами обозначены статистические различия (HSD-тест Тьюки, $P < 0.05$).

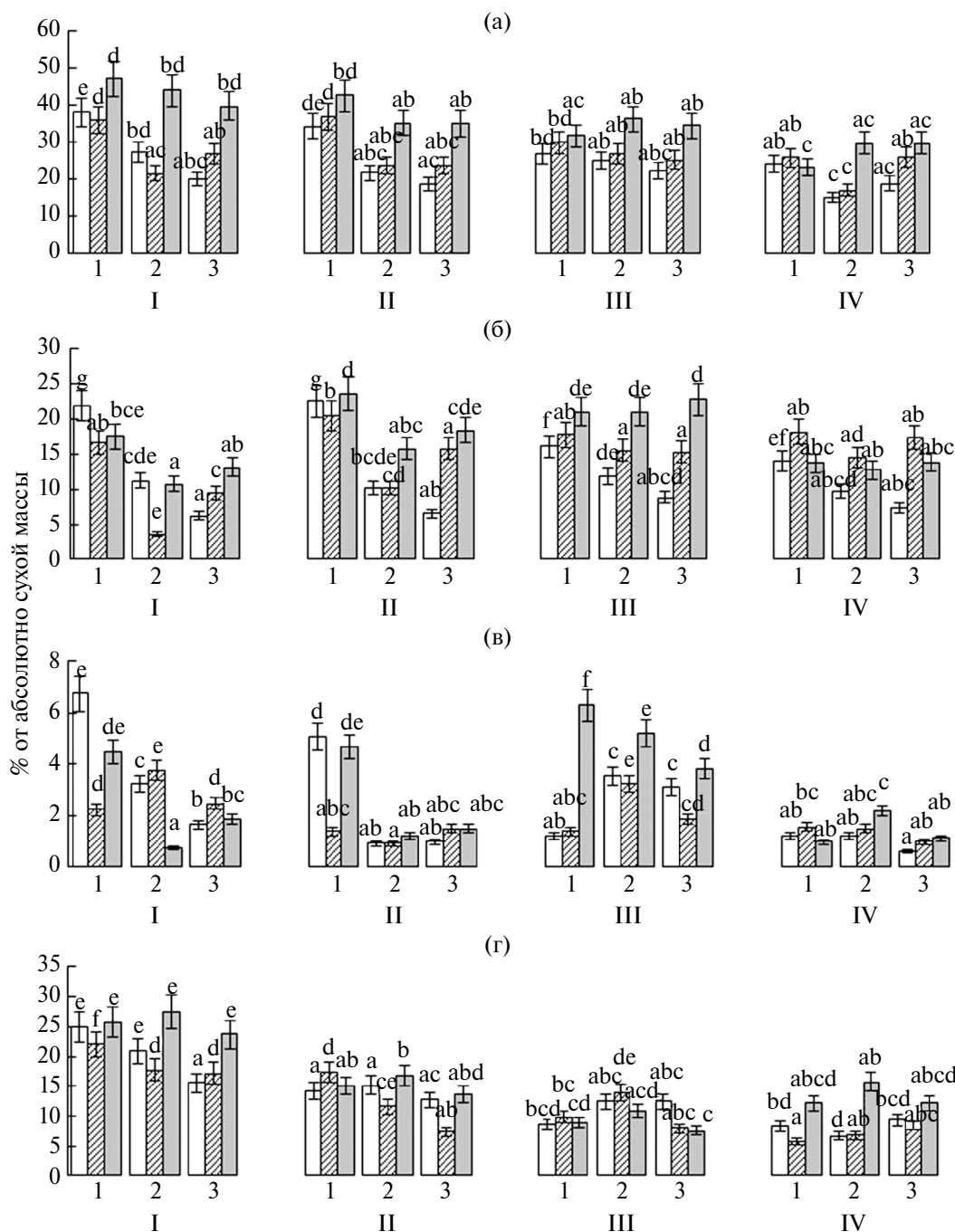


Рис. 3. Содержание суммарных липидов (а), нейтральных липидов (б), фосфолипидов (в) и гликолипидов (г) фрагментов почек разных видов и формы *Betula*: (1) *B. pubescens*, (2) *B. pendula*, (3) *B. pendula* var. *carelica*. Белый, штриховка, серый – чешуи, прилистники, листочки соответственно. I–IV – фазы распускания. Сравнения проводили для каждого фрагмента по фазам распускания и по видам березы. Каждое значение представляет среднее из трех биологических повторностей и их стандартное отклонение. Разными латинскими буквами обозначены статистические различия (HSD-тест Тьюки, $P < 0.05$).

компонентный анализ по комплексу признаков позволил выделить березу пушистую, группы близкородственных видов берез повислой и карельской перекрывались (рис. 1д). По данным компонентного анализа листочков, виды берез не разделились на разные группы (рис. 1г).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали, что фрагменты почек

березы пушистой по сравнению с другими березами характеризовались высоким содержанием НЖК во фракциях НЛ и ГЛ за счет преимущественно высокого уровня $C_{16:0}$. Березу пушистую отличало также в первые две фазы пониженное содержание $C_{18:2}$ в ГЛ листочков при повышенном уровне $C_{16:0}$ (Дополнительные материалы, табл. 1).

У березы повислой, в отличие от других берез, происходило значительное снижение уровня $C_{18:2}$ при росте содержания $C_{16:0}$ в составе фракции ГЛ в процессе развития почек от I к III фазе и пониженный уровень $C_{18:2}$ во фракции ФЛ в течение всего периода исследования (Дополнительные материалы, табл. 2). У карельской березы, в отличие от других берез, отмечали пониженный уровень массы листочков и влажности всех фрагментов почек в соответствующие фазы, низкое содержание НЛ в чешуях во все фазы, повышенное содержание ННЖК во фракции НЛ фрагментов распускающихся почек, обусловленное высоким содержанием $C_{18:2}$ при низком уровне $C_{16:0}$ (Дополнительные материалы, табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Общие закономерности. Масса листочков как наиболее функционально значимых фрагментов почек была максимальной у представителей исследованных берез и, в отличие от других фрагментов почек, возрастала по фазам их распускания. Учитывая отпад чешуй и прилистников после распускания почек, отсутствие их роста можно рассматривать как адаптационный механизм сохранения ресурсного потенциала почек для формирования молодого листа. Влажность листочков также была максимальной по сравнению с другими фрагментами почек. Повышение влажности всех фрагментов почек берез по фазам распускания в мае, в период активного сокодвижения, способствовало росту листочков, выходу растений из состояния вынужденного покоя и переходу к активной вегетации. Показано, что у березы повислой, произрастающей в условиях холодного климата и многолетней мерзлоты Центральной Якутии и отличающейся высокой морозоустойчивостью, содержание воды в почках в зимне-весенний период в феврале – апреле варьировало в пределах 32–34%, а к началу вегетации деревьев, в мае, ее количество в тканях возрастало почти вдвое и превышало 60% [3]. Такая высокая влажность во фрагментах почек исследованных нами берез отмечалась только у березы повислой в листочках, в IV фазу развития почек.

Ранее нами была показана динамика содержания СЛ, их фракций и ЖКС фракций липидов в целых почках по фазам распускания [4]. Содержание СЛ варьировало от 27 до 45% от абсолютно сухого веса растительного образца (масс.%). В составе СЛ преобладали НЛ (до 42 масс.%), уровень ГЛ и ФЛ был значительно ниже (максимум соответственно, 13 и 8 масс.%). Результаты данного исследования показали, что листочки как наиболее функционально значимые фрагменты ассимиляционного аппарата почек в I

фазу распускания отличались большим уровнем СЛ по сравнению с прилистниками и чешуями. Снижение содержания СЛ в расчете на единицу сухого вещества в исследуемый период происходило у трех берез только в листочках, что могло быть обусловлено использованием их в метаболических процессах, а также так называемым “эффектом разбавления” в результате увеличения их массы при интенсивном росте перед началом активной вегетации. В этот период еще не происходило в достаточном количестве пополнения энергетического материала в клетках растений за счет фотосинтеза и поступления элементов питания из почвы.

Повышение уровней фракций НЛ и ФЛ в листочках к III фазе свидетельствовало о повышении энергетического и ресурсного потенциала листочков к этой фазе. Очевидно, в этот период, в III фазу, когда почки раскрываются и появляются молодые листья, ФЛ в них активно синтезируются и принимают участие в формировании клеточных структур. Ранее на основании сравнительного исследования липидного состава распускающихся почек березы пушистой, повислой и карельской нами было показано, что при распускании почек существенно повышается содержание ФЛ в связи с активным образованием клеточных структур, в мембраны которых они входят, и этот процесс происходит в III фазу распускания почек [4]. По результатам данной работы, накопление ФЛ, а также НЛ осуществляется в эту фазу только в листочках. Формирование молодого листа (IV фаза), напротив, было сопряжено со значительным расходом энергетических ресурсов листочка, о чем свидетельствовало снижение в эту фазу уровня НЛ в расчете на единицу сухого вещества.

Снижение содержания ГЛ в листочках на единицу сухого вещества к III фазе можно объяснить “эффектом разбавления” в результате интенсивного роста листочков в период повышения влажности их тканей на фоне сокодвижения при повышении температуры воздуха [1, 2]. Активно накопление ГЛ проходило в IV фазу, непосредственно перед появлением молодого листа, когда их уровень повышался на единицу сухого вещества несмотря на наличие “эффекта разбавления” в результате продолжающегося повышения массы листочков. Накопление ГЛ в листочках в эту фазу могло быть обусловлено значительной стимуляцией их синтеза. В исследованиях, проведенных без учета фаз распускания почек хвойных растений, установлено, что в их меристемах перед появлением хвои содержание ФЛ и ГЛ в мембранах значительно возрастало, что объяснялось увеличением размеров клеток и формированием их фотосинтетического аппарата [7, 8]. Снижение уровня ГЛ в чешуях и прилистниках в расчете на единицу сухой мас-

сы по фазам распускания почек берез, вероятно, обусловлено включением их в метаболические процессы, и не было связано с массой этих органов, которая по фазам распускания почек не изменялась значительно и однозначно у трех берез. Поскольку к моменту появления молодых листьев они опадают, то снижение уровня ГЛ и, как отмечено выше, ФЛ в этих фрагментах, возможно, является показателем деструкции у них мембранных липидов клеток в процессе распускания почек.

Фракции НЛ и ФЛ в листочках трех берез имели противоположно направленную динамику по сравнению с фракцией ГЛ. Повышение уровня НЛ в прилистниках почек трех берез ко II–III фазам указывало на аналогичное с листочками запасание энергетического материала у них. Однако снижения их уровня к IV фазе, как это происходило в листочках, не было, что можно объяснить отсутствием энергетических затрат на ростовые процессы, поскольку, как отмечено выше, их масса не увеличивалась. Снижение уровня ФЛ в чешуях и прилистниках в процессе распускания почек от I к IV фазе свидетельствовало о структурных преобразованиях с тенденцией деструкции компонентов клеточных мембран.

Таким образом, листочки имели отличную от других фрагментов почек динамику фракционного состава липидов – при снижении уровня СЛ в исследуемый период отмечалось повышение к III фазе уровней НЛ и ФЛ с падением в IV фазе, и со снижением уровня ГЛ к III фазе с увеличением в IV фазе. По фракционному составу СЛ фрагментов почек в период исследования обозначилась идентичность направленности их изменения в составе чешуй и прилистников – при относительно неизменном уровне СЛ уровни НЛ повышались, а ГЛ и ФЛ снижались.

Выявленный нами ранее [4] высокий уровень ННЖК во всех фракциях липидов по фазам распускания почек исследованных берез свидетельствует о высокой степени жидкостных характеристик мембран клеток развивающихся почек, что, очевидно, является необходимым условием для активно протекающих в этот период метаболических процессов и обеспечивает защитные функции растений от возможных неблагоприятных климатических условий в весенний период. Высокая степень ненасыщенности ЖК мембранных липидов определяет физическое состояние биологических мембран, что необходимо для поддержания текучести липидного окружения мембранных белков и особенно ферментов, обеспечения высокой пропускной способности мембран для ионов и молекул. Это, в свою очередь, определяет характер и интенсивность метаболизма в клетках [9–12]. Напротив, увеличение насыщенности ЖК СЛ связано с перестройкой

структуры мембран в направлении снижения их эластичности и проницаемости [13, 14].

Преобладание в I фазу в СЛ всех фрагментов почек трех берез ННЖК обеспечивало устойчивость их к возможным колебаниям температуры в условиях Карелии в этот период. Снижение уровня ННЖК СЛ к III фазе в прилистниках у всех берез и в листочках березы повислой и карельской происходило на фоне повышения температуры воздуха, когда возможность наличия заморозков снижалась. Стабильный уровень этого показателя в листочках у березы пушистой в процессе распускания почек был обусловлен относительно низким по сравнению с другими березами уровнем ненасыщенности ЖК СЛ уже в I фазе. В чешуях почек трех берез по сравнению с другими фрагментами в I фазу отмечался пониженный уровень ННЖК СЛ, обусловленный их уровнем в запасных НЛ (на фоне низкого уровня $C_{18:3}$ в НЛ), а не в мембранных ФЛ и ГЛ, преимущественно обеспечивающих консистенцию и функциональную активность, в том числе защитную, мембранных компонентов растительных клеток. Пониженный уровень ННЖК СЛ в чешуях по сравнению с другими фрагментами почек трех берез в I фазу и отсутствие однозначно выраженной динамики его по фазам распускания могут свидетельствовать о более низкой функциональной активности этих фрагментов по сравнению с прилистниками и листочками.

Преимущественное содержание в ЖКС СЛ фрагментов почек берез $C_{18:3}$, $C_{18:2}$ и $C_{16:0}$, а также значительные изменения их уровня по фазам распускания почек указывают на большую значимость этих ЖК в период исследования. $C_{18:3}$ и $C_{18:2}$ в основном определяют функциональное состояние мембран растительных клеток [15, 16]. Повышение в СЛ листочков уровня $C_{18:3}$ от II (у березы пушистой) или III фазы (у двух других берез) к IV фазе происходило преимущественно за счет повышения уровня этой кислоты во фракциях ФЛ и особенно ГЛ. Известно, что $C_{18:3}$ участвует непосредственно в формировании фотосинтетического аппарата [17–19] и ее накопление в мембранных липидах формирующихся листочков способствовало этому процессу. При этом в листочках к III фазе $C_{18:2}$ СЛ, по-видимому, утрачивала свое значение, поскольку ее уровень заметно снижался, причем особенно значительно в ГЛ листочков березы карельской и повислой. На значимость $C_{18:3}$ и $C_{16:0}$ в процессах распускания почек указывает также однозначное у трех берез в чешуях и прилистниках повышение к III фазе содержания в ГЛ $C_{18:3}$, а в ФЛ прилистников – $C_{16:0}$.

Повышение к III фазе уровня $C_{16:0}$ в СЛ листочков за счет фракции ГЛ свидетельствовало о большой значимости ее в эту фазу для

функциональной активности структур этих фрагментов. Значение $C_{16:0}$ в структурно-функциональной организации растительной клетки сейчас активно исследуется, при этом роль ее в составе мембранных липидов в условиях холодного стресса у растений все еще недостаточно изучена [20, 21]. Отмечались не единичные случаи возрастания относительного содержания $C_{16:0}$ в мембранных липидах растений в условиях стресса [14, 23], что, по мнению автора [22], указывает на возможное существование альтернативного пути противостояния стрессовой ситуации, отличного от общепринятой гипотезы “гомеовязкостной адаптации текучести клеточных мембран”.

Характерной особенностью ЖКС НЛ листочков в I фазу было значительное варьирование уровня ННЖК у трех берез — от 35% у березы пушистой до 94% — у карельской, что говорит о разном уровне жидкостных характеристик запасных липидов в структурах этих фрагментов у разных берез перед началом распускания почек. В НЛ листочков в I фазу отмечалось также значительное варьирование у трех берез уровня $C_{16:0}$ — от 5% у карельской березы до 50% — у березы пушистой. Однако к IV фазе уровни ННЖК и $C_{16:0}$ в НЛ листочков у трех берез сближались.

В ФЛ фрагментов почек трех берез преимущественно высокий и близкий у разных берез уровень ННЖК во всех фрагментах почек и во все фазы обеспечивал активные процессы в мембранах клеточных структур в переходный к вегетации период. Преобладание в составе ГЛ прилистников и особенно листочков у трех берез ННЖК (до 88% от суммы ЖК) обеспечивало активные метаболические процессы в мембранах хлоропластов этих фрагментов почек в течение всего периода исследования. Их уровень не изменялся однозначно у трех берез по фазам, за исключением того, что при переходе от III к IV фазе в листочках уровень ННЖК повышался за счет $C_{18:3}$, что обусловлено, как было отмечено выше, участием этой ЖК в формировании фотосинтетического аппарата в растительных клетках. Пониженный уровень ННЖК ГЛ в чешуях по фазам распускания у соответствующих берез демонстрировал, возможно, пониженный уровень обменных процессов в структурных компонентах их хлоропластов.

Таким образом, характеризуя ЖКС отдельных фракций СЛ фрагментов почек берез, следует отметить очень большие различия по содержанию ННЖК во фракции НЛ в I фазу и по видам и по фрагментам, что может свидетельствовать об отсутствии принципиальной значимости их количества для функциональной активности компонентов фрагментов почек в этот период. Сближение уровней ННЖК НЛ

за счет $C_{18:3}$ и $C_{18:2}$ в листочках у трех берез к IV фазе, возможно, указывает на необходимость определенного, близкого у всех берез, уровня ННЖК НЛ в период активного формирования молодых листьев. В отличие от НЛ, присутствие во фракции ФЛ фрагментов почек трех берез близкого по видам, фрагментам, фазам и высокому уровню ННЖК (до 78% от суммы ЖК) в период распускания почек указывает на весомый вклад этой фракции липидов в мембранную активность компонентов всех фрагментов. О разнонаправленном характере изменений в составе ФЛ листочков по сравнению с прилистниками может говорить повышение у трех берез в период распускания почек уровня особенно значимых ЖК — $C_{18:3}$ в листочках, а $C_{16:0}$ — в прилистниках. О преобладающем вкладе ГЛ в функциональную активность мембран хлоропластов в компонентах листочков трех берез свидетельствовал особенно высокий уровень ННЖК ГЛ в них по сравнению с прилистниками и чешуями. На значительные преобразования в составе ГЛ листочков к III фазе говорит накопление $C_{16:0}$ в них. Повышение уровня $C_{18:3}$ в ГЛ листочков в последней фазе их развития обеспечивало интенсивное формирование фотосинтетического аппарата в этот период.

Видовые особенности. Рассмотрение видовых отличий показателей фрагментов почек у трех представителей рода *Betula* с использованием многофакторного компонентного анализа показало, что чешуи значительно отличались по видам берез, в то время как прилистники и особенно листочки имели менее выраженные видовые отличия. У березы пушистой, в отличие от других берез, отмечалась повышенная масса всех фрагментов, за исключением массы чешуй и прилистников в IV фазу, когда их масса снижалась до уровня других берез. Вероятно, у березы пушистой с целью экономии энергетических ресурсов происходило снижение массы чешуй и прилистников перед их отпадом при раскрытии листочков в результате оттока ассимилятов в растущий листочек. Последнее можно отнести к одному из адаптационных механизмов вида, для которого характерно выживание в экстремальных условиях. Также энергетические ресурсы в чешуях в ряду берез: пушистая, повислая и карельская снижались, о чем свидетельствовало уменьшение в этом ряду в I фазу уровней СЛ и их фракций, особенно НЛ и ФЛ, а также уровней НЛ в этом ряду и во все фазы. Чешуи березы пушистой обладали самым большим энергетическим и ресурсным потенциалом в I фазу, но далее в процессе распускания почек значительно снижали его и приближали в IV фазу к уровню других берез, о чем можно было судить по содержанию там НЛ и особенно ФЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований у трех представителей растений рода *Betula* выявлены только наиболее общие закономерности изменения интенсивности роста, влажности и липидного состава фрагментов почек по фазам распускания. Физиологически является целесообразным, что у всех исследованных берез отмечалась самая большая масса у функционально наиболее значимых фрагментов почек (листочков) по сравнению с прилистниками и чешуями. Росту листочков в процессе распускания почек способствовала повышенная их влажность по сравнению с другими фрагментами, масса которых не увеличивалась в исследуемый период. Повышение влажности всех фрагментов почек берез по фазам их распускания (максимально в 2 раза) было обусловлено активным сокодвижением у берез в этот период и стимулировало метаболические процессы в них к началу активной вегетации.

О максимальной у трех берез метаболической активности в тканях листочков по сравнению с другими фрагментами в период распускания почек можно судить не только по повышенным показателям интенсивности роста и влажности у них, но и по содержанию СЛ в I фазе и падению уровня СЛ по фазам, по значительному накоплению НЛ и ФЛ к III фазе и использованию в IV фазе при накоплении ГЛ в эту фазу, по высокому уровню ННЖК СЛ и их фракций в исследуемый период, по повышению $C_{18:3}$ в составе ФЛ и ГЛ к IV фазе, а также $C_{16:0}$ в составе ГЛ к III фазе и по снижению ее уровня в IV фазе. Исходя из значений исследованных показателей, прилистники и особенно чешуи характеризовались пониженной функциональной активностью по сравнению с листочками. Тенденцию снижения содержания мембранных липидов (ГЛ и ФЛ) в утрачивающих свое значение в процессе распускания почек чешуях и прилистниках можно рассматривать как адаптивную стратегию берез по экономии сырьевых и энергетических ресурсов.

Выявленное преобладание ННЖК в СЛ и их фракциях фрагментов почек берез позволяет сохранять текучесть мембран их тканей на физиологически активном уровне, обеспечивающем интенсивные метаболические процессы, направленные на формирование фотоассимиляционного аппарата в распускающихся почках и устойчивость их к возможным неблагоприятным климатическим условиям в весенний период. Основной вклад в группу ННЖК фракций СЛ фрагментов почек берез вносили $C_{18:3}$ и $C_{18:2}$, в группу НЖК — $C_{16:0}$. Установленное снижение содержания $C_{18:2}$ СЛ во фрагментах почек трех берез в процессе их распускания, вероятно, связано с использованием этой кислоты в метаболических процессах, направленных на формиро-

вание структур молодого листа, при дальнейшем росте которого продолжается ее снижение, при этом накапливается $C_{18:3}$, задействованная в процессе фотосинтеза.

Характеризуя видовые особенности трех представителей рода *Betula*, следует отметить, что масса всех фрагментов почек у березы пушистой была выше по сравнению с березой повислой и карельской, при этом различия по массам чешуй и прилистников между видами исчезали в IV фазу за счет снижения их массы у березы пушистой, когда чешуи и прилистники начинали отмирать. Возможно, у березы пушистой происходил отток метаболитов из утрачивающих свое значение чешуй и прилистников в интенсивно растущие листочки. Характерной особенностью карельской березы по сравнению с другими березами были пониженные показатели массы и влажности фрагментов почек за исключением I фазы.

По уровню СЛ, НЛ и ГЛ значимые видовые отличия наблюдались по чешуям. Энергетический и ресурсный потенциал в чешуях в ряду берез: пушистая, повислая и карельская, вероятно, снижался, судя по снижению в этом ряду в I фазу уровней СЛ и их фракций, а также уровней НЛ в этом ряду и во все фазы. Чешуи березы пушистой, обладая самым большим энергетическим и ресурсным потенциалом в I фазу, далее в процессе распускания почек значительно снижали его и приближали в IV фазу к уровню других берез, судя по содержанию НЛ и особенно ФЛ в них.

Фрагменты почек березы пушистой по сравнению с другими березами характеризовались высоким содержанием НЖК во фракциях НЛ и ГЛ за счет преимущественно высокого уровня $C_{16:0}$. Карельскую березу характеризовало повышенное содержание ННЖК во фракции НЛ фрагментов почек, обусловленное высоким содержанием $C_{18:2}$ при низком уровне $C_{16:0}$. Выявленные отличия в липидном составе фрагментов почек по фазам распускания у трех берез указывают на наличие особенностей в физиолого-биохимических механизмах, обуславливающих процессы аккумуляции и использования липидных соединений во фрагментах почек разных видов и форм растений рода *Betula* по фазам распускания.

Авторы выражают благодарность руководителю аналитической лаборатории Института леса Карельского научного центра Российской академии наук к.б.н., с.н.с. К. М. Никеровой за помощь при статистической обработке экспериментальных данных. Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук".

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Карельского научного центра Российской академии наук (Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук). Исследование также было частично выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, тема № ААА-АА-А20-121033000137-1).

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. Westhoff M., Schneider H., Zimmermann D., Mimietz S., Stinzling A., Wegner L.H., Kaiser W., Krohne G., Shirley S., Jakob P., Bamberg E. The mechanisms of refilling of xylem conduits and bleeding of tall birch during spring // *Plant Biol.* 2008. V. 10. P. 604. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00062.x>
2. Holttä T., Dominguez Carrasco M.D.R., Salmon Y., Aalto J., Vanhatalo A., Back J., Lintunen A. Water relations in silver birch during springtime: How is sap pressurised? // *Plant Biol.* 2018. V. 20. P. 834.
3. Vetchinnikova L.V., Tatarinova T.D., Serebryakova O.S., Perk A.A., Ponomarev A.G., Il'ina M.K., Petrova N.E., Vasilieva I.V. The fatty acid composition of membrane lipids in buds of silver Birch during the winter–spring period under the conditions of the cryolithozone // *Cell Tissue Boil.* 2019. V. 13. P. 397. <https://doi.org/10.1134/S1990519X19050092>
4. Morozova I.V., Chernobrovkina N.P., Il'ina M.K., Robonen E.V., Tsydendambaev V.D., Pchelkin V.P. Fatty acid composition in fractions of total lipids from the buds of plants of the *Betula* L. genus by the opening phases // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 94. <https://doi.org/10.1134/S1021443721010131>
5. Ветчинникова Л.В. Береза: Вопросы изменчивости (морфо-физиологические и биохимические аспекты). М.: Наука, 2004. 183 с.
6. Jamieson G.R., GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // *J. Chromat. Sci.* 1975. V. 13. P. 491.
7. Alaudinova E.V., Mironov P.V. Lipids of the meristems of the main coniferous edificators from Central Siberia under low-temperature adaptation: 1. The characteristics of the fatty acid composition of phospholipids from winter meristems of *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L., and *Pinus sylvestris* L. // *Russ. J. Bioorganic. Chem.* 2010a. V. 36. P. 867.
8. Alaudinova E.V., Mironov P.V. Lipids of the meristems of the main coniferous edificators from Central Siberia under low-temperature adaptation: 2. Features of the fatty acid metabolism of phospholipids from winter meristems of *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L., and *Pinus sylvestris* L. // *Russ. J. Bioorganic. Chem.* 2010b. V. 36. P. 872.
9. Sudachkova N.E., Milyutina I.L., Romanova L.I., Semenova G.P. The annual dynamics of reserve compounds and hydrolitic enzymes activity in the tissues of *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb. // *Eurasian J. For. Res.* 2004. V. 7. P. 1.
10. Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1666(1-2). P. 142. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.002>
11. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions // *Photosynth. Res.* 2013. V. 116. P. 489. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9823-4>
12. Arisawa K., Mitsudome H., Yoshida K., Sugimoto S., Ishikawa T., Fujiwara Y., Ichi I. Saturated fatty acid in the phospholipid monolayer contributes to the formation of large lipid droplets // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 480. P. 641. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.109>
13. Makarenko S.P., Konenkina T.A., Suvorova G.G., Oskorbina M.V. Seasonal changes in the fatty acid composition of *Pinus sylvestris* needle lipids // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 119. <https://doi.org/10.1134/S1021443713050105>
14. Kalugina O.V., Mikhailova T.A., Afanasyeva L.V., Gurina V.V., Ivanova M.V. Changes in the fatty acid composition of pine needle lipids under the aluminum smelter emissions // *Ecotoxicology.* 2021. V. 30. P. 2083. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02479-2>
15. Hugly S., Somerville C.R. A role of membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature // *Plant Physiol.* 1992. V. 99. P. 197. <https://doi.org/10.1104/pp.99.1.197>
16. Popov V.N., Antipina O.V., Pchelkin V.P., Tsydendambaev V.D. Changes in fatty acid composition of lipids in chloroplast membranes of tobacco plants during cold hardening // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 156. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010137>
17. Murphy D.J., The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 864. P. 33.
18. Laskay G., Lehoczeki E. Correlation between linolenic acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 849. P. 77.
19. Ivanova M.V., Makarenko S.P., Suvorova G.G. Fatty acid composition of lipids in *Picea obovata* needles in the spring vegetation period // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. V. 11. P. 207. <https://doi.org/10.1134/S199542551802004X>

20. Awai K., Xu C., Tamot B., Benning C. A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 10817.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602754103>
21. Yoshida H., Yoshida N., Kuriyama I., Tomiyama-Sakamoto Y., Mizushima Y. Profiles of lipid components, fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in Jack beans (*Canavalia gladiata* DC.) // Food Chem. 2013. V. 136. P. 807.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.087>
22. Zhukov A.V. Palmitic acid and its role in the structure and functions of plant cell membranes // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 706.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715050192>
23. Zhigacheva I.V., Burlakova E.B., Misharina T.A., Terenina M.B., Krikunova N.I., Generosova I.P., Shugaev A.G., Fattakhov S.G. Fatty acid composition of membrane lipids and energy metabolism in mitochondria of pea seedlings under water deficit // Russ. J. Plant Physiol. 2013. V. 60. P. 212.
<https://doi.org/10.1134/S1021443713010111>

УДК 581.1

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *Hedysarum alpinum* L. В ИНТРОДУКЦИИ И В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ

© 2024 г. М. В. Филонова^{а, с, *}, С. В. Кривошеков^б, Н. С. Зиннер^а,
Д. А. Исаков^б, Я. Е. Решетов^б, А. А. Чуринов^{а, с}, М. В. Белоусов^б

^аНациональный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Сибирский государственный медицинский университет”

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

^с“Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга”

Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук”, Томск, Россия

*e-mail: Maria-Caurus7@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Проведено сравнительное изучение состава фенольных соединений в растительном сырье копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.), интродуцированного на экосистемной дендрологической территории Сибирского ботанического сада ТГУ, и его каллусной культуры с использованием методов ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС. Установлено, что в полученной на питательной МС-среде с добавлением 1.0 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л 6-БАП и последующим культивированием на среде с α -НУК (2.0 мг/л) + 6-БАП (0.5 мг/л) каллусной культуре копеечника происходит активация фенилпропаноидного пути с образованием флавоноидов, изофлавонов, ксантонов и др. В результате сравнительного анализа установлено, что в извлечениях каллусной культуры содержание суммы флавоноидов (в пересчете на кверцетин) и формононетина ниже на 35 и 11% соответственно, а содержание мангиферина превышает более чем на 50% в сравнении с извлечением из интродуцированного растения.

Ключевые слова: *Hedysarum alpinum*, ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-УФ, интродукция, каллус, ксантоны, фенольные соединения, флавоноиды

DOI: 10.31857/S0015330324060066, EDN: MAPLIV

ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике доля препаратов, полученных из растительного сырья, составляет существенную часть (более 30%). Из препаратов растительного происхождения, входящих в государственный реестр лекарственных средств, более 70% получают из дикорастущего лекарственного сырья. Несмотря на возросшие объемы заготовки, количество получаемого сырья не удовлетворяет запросы фармацевтической промышленности, а в ряде случаев приводит к сокращению или полной потере популяций ценных видов лекарственных растений [1, 2]. Одной из важных задач современного ресурсоведения является поиск новых источников и путей получения сырья содержащего биологически активные вещества (БАВ). Интродукционное изучение лекарственных растений и последующая

разработка агротехник выращивания остается одним из немногих путей сохранения природных популяций, а анализ содержания основного действующего вещества в интродуцированном лекарственном растительном сырье делает эту работу целесообразной [3].

Род *Hedysarum* представлен более чем 280 видами, при этом во флоре Сибири встречается 23 вида [4]. Данные, полученные при изучении фитохимического состава и биологической активности видов *Hedysarum*, привлекают все большее внимание исследователей, занимающихся поиском и разработкой новых лекарств [5]. Только за последнее десятилетие из растений рода *Hedysarum* с помощью различных методов хроматографии выделено 155 химических компонентов, среди которых флавоноиды, ксантоны, кумарины, тритерпены и тритерпе-

ноидные сапонины, лигнаны, стеролы и др. Среди вышеперечисленных соединений некоторые фенольные соединения, в частности флавоноиды, можно рассматривать не только в качестве основных групп метаболитов, но и как хемотаксономические маркеры рода *Hedysarum* [5, 6]. В России на данный момент из растительного сырья копеечника получают ряд фитопрепаратов. Например, на основе индивидуального вещества копеечника альпийского — ксантона мангиферина, разработан противовирусный препарат “Алпизарин” [6].

Копеечник альпийский (*Hedysarum alpinum* L.) — официальное растение, распространённое на территории России. Интенсивная заготовка растения в качестве лекарственного сырья привела к истощению природных запасов и отнесению копеечника к редким и нуждающимся в охране видам [4, 7, 8]. Для создания альтернативного дополнительного источника сырья перспективно введение копеечника альпийского в культуру с последующим исследованием качественного и количественного состава продуцируемых биологически активных веществ. Это в дальнейшем позволит оценить возможность использования полученной культуры в качестве источника соединений с целевой фармакологической активностью.

Цель работы — выделить и провести сравнительный анализ фенольных соединений интродуцированного растения и каллусной культуры *Hedysarum alpinum* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Интродукция растения

Интенсивное интродукционное изучение *H. alpinum* начато в 2003 г. В результате многолетних исследований получены собственные репродукции, имеющие высокий адаптационный потенциал в условиях Томской области [9]. Надземную часть собирали, не разделяя на органы, со средневозрастных особей в фазу вегетации-бутонизации. Сбор проведен в вегетационный сезон 2021 г. на экосистемной дендрологической территории Сибирского ботанического сада Томского государственного университета (ТГУ).

Получение каллусной культуры H. alpinum

Для получения каллусной культуры *H. alpinum* использовали проростки, выращенные из семян растений, интродуцированных в условиях юга Томской области. Семена копеечника промывали с добавлением детергента Tween-20 (Sigma, Германия) и заливали теплой водопроводной водой на 10 мин. По истечении времени в условиях ламинарного бокса семена последовательно стерилизовали в растворе 70% спирта (40 с) и 0.01% растворе сулемы (5 мин)

и трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Стерильные семена переносили в пробирки с агаризованной питательной МС-средой без добавления стимуляторов роста [10]. Пробирки оставляли на три недели на осветительных установках под люминесцентными лампами (Philips, Нидерланды), интенсивность освещения составляла 150 мкМ квантов/м²с при температуре 25 ± 1°C, влажности 70% и 16-часовом световом дне.

Трехнедельные проростки рассекали на экспланты, представляющие собой основание побегов, семядольные листья и корни, которые затем переносили в баночки объемом 100 мл на питательную среду (30 мл). Каллусообразование индуцировали на агаризованной МС-среде с добавлением регуляторов роста α-НУК (2.0 и 3.5 мг/л), 6-БАП (0.1 и 0.5 мг/л) и 2,4-Д (Merck, Германия) (1.0 и 2 мг/л). Баночки с эксплантами оставляли в условиях темноты при температуре 25 ± 1°C и влажности 70%.

Приготовление постоянных препаратов каллусной ткани H. alpinum

Для фиксации клеток культуры был использован фиксатор Кларка (уксусный алкоголь). Кусочек каллуса возрастом 30 сут. помещали во флакон, заливали фиксатором Кларка до полного погружения каллуса. Далее флакон помещали на сутки в холодильник при температуре 4–6°C. Через сутки фиксатор удаляли, каллус заливали 96% спиртом и снова помещали на сутки в холодильник при температуре 4–6°C. Далее фиксатор повторно удаляли, каллус заливали 96% спиртом и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. По истечении времени осуществляли заливку материала в парафин путем проведения через растворы спирт — ксилол, ксилол — парафин. Гистологические срезы толщиной 0.5 мкм изготавливали на микротоме Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific Inc., США), которые затем с помощью автомата для окрашивания тканей Robot-Stainer HMS 740 (MICROM International GmbH, Германия) депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные постоянные препараты микроскопировали с использованием Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия) и системы визуализации клеток Cytation 5 (BioTek Instruments, Германия).

Выделение фракции обогащенной флавоноидами и ксантонами

Точную навеску высушенного сырья заливали дистиллированной водой (гидромодуль 1 : 6) и настаивали при комнатной температуре при перемешивании на шейкере со скоростью 100 об/мин в защищенном от света месте в течение

24 ч. Таким образом сырье освобождали от высокомолекулярных соединений (полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот), при этом целевые вещества (флавоноиды — производные кверцетина), характерные для рода *Hedysarum*, малорастворимые в воде, сохранялись.

Водную вытяжку сливали, затем сырье заливали 96% этиловым спиртом (1:6) и оставляли на сутки в тех же условиях, экстракцию 96% этанолом осуществляли два раза. Полученные спиртовые вытяжки отфильтровывали, объединяли и упаривали с использованием роторного испарителя при температуре 35°C до полного удаления этанола. Густой остаток суспендировали в дистиллированной воде, переносили в делительную воронку и проводили жидкофазную экстракцию смесью хлороформ-н-бутанол (1:1). Хлороформно-бутанольный экстракт концентрировали на роторном испарителе, густой остаток высушивали конвективным способом. Готовые фракции использовали для химического исследования.

Качественный анализ

Хроматографическое разделение проводили на хроматографе Agilent Technologies 1290 Infinity II (Agilent Technologies, США) с использованием хроматографической колонки Zorbax Eclipse Plus C18 (50 мм x 2.1 мм, 1.8 μm) (Agilent Technologies, США) при температуре 40°C со скоростью потока подвижной фазы равной 0.3 мл/мин. Разделение проводили в градиентном режиме с использованием следующих элюентов: 0.1% раствор трифторуксусной кислоты в воде (А) и метанол (Б). Режим элюирования: 10% Б, выдержка 5 мин, затем за 35 мин до 95% Б, выдержка 15 мин. Объем ввода пробы составлял 3 мкл.

Масс-спектрометрию проводили на тандемном триквадрупольном масс-спектрометре Agilent 6470 (Agilent Technologies, США), способ ионизации — электрораспыление. При определении общего фитохимического состава использовали диапазон сканирования от 100 до 2000 *m/z*. Для получения масс-спектров соединений использовали режим мониторинга множественных реакций (MRM, multiple reaction monitoring) с использованием в качестве родительского иона соответствующую массу соединений из хроматограмм по полному ионному току (TIC). Во всех случаях использован газ осушитель — азот, температура 350°C и объемный расход 8 л/мин; газ небилайзера (азот) 40 psi; энергия коллизии 35 эВ; температура капилляра 350°C и напряжение на игле распыления 3500 В. Идентификацию компонентов экстрактов проводили, основываясь на сравнении полученных масс-спектров, полученных в режиме MRM.

Количественный анализ

Определение содержания флавоноидов. Для определения содержания флавоноидов во фракциях в пересчете на кверцетин точную навеску фракции массой 0.005 г растворяли в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор А). Аликвоту 5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0.3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили 95% этанолом до метки. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм через 60 мин. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца кверцетина. Для этого 1 мл 0.02% раствора-стандарта кверцетина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0.3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили до метки 95% этанолом [11].

Приготовление раствора ГСО кверцетина: 0.0050 г (точная навеска) ГСО кверцетина, высушенного до постоянной массы при температуре 100–105°C, растворяли в мерной колбе вместимостью 25 мл в небольшом количестве подогретого 95% этанола и доводили объем до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы флавоноидов в хлороформно-бутанольной фракции в пересчете на кверцетин (%) осуществляли по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot M_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot M \cdot 5 \cdot (100 - W)} \quad (1), \text{ где:}$$

A — оптическая плотность испытуемого раствора;
*A*₀ — оптическая плотность ГСО кверцетина (среднее из трех измерений);

*M*₀ — масса ГСО кверцетина, г;

M — масса навески фракции, г;

W — потеря в массе при высушивании для фракции, %.

Определение содержания ксантонов. Для определения содержания ксантонов в пересчете на мангиферин использовали адаптированную нами для фракций методику Имачуевой с соавт. [12]. Для этого точную навеску фракции (0.025 г) помещали в делительную воронку, суспендировали в 15 мл горячей воды (80°C) и охлаждали до комнатной температуры. Далее проводили 3-кратную жидкофазную экстракцию хлороформом порциями по 10 мл, хлороформные извлечения отбрасывали. Водную фазу 4-кратно обрабатывали этилацетатом, порциями по 5 мл. Полученные извлечения фильтровали через безводный натрия сульфат и концентрировали на роторном испарителе до полного удаления этилацетата. Сухой остаток растворяли в 15 мл 70% этанола и переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл (раствор А). Раствор Б

готовили следующим образом — аликвоту 10 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 0.5 мл 30% уксусной кислоты, объем раствора доводили до метки 70% этиловым спиртом и перемешивали. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 365 нм, раствор сравнения — 70% этиловый спирт.

Расчет содержания суммы ксантонов в хлороформно-бутанольной фракции в пересчете на мангиферин в (%) осуществляли по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot 25 \cdot 25 \cdot 100}{E_{\text{уд.}} \cdot M_{\text{нав.}} \cdot 10 \cdot (100 - W)} \quad (2), \text{ где:}$$

A — оптическая плотность испытуемого раствора;
 $E_{\text{уд.}}$ — удельный показатель мангиферина, равный 325.1;

$M_{\text{нав.}}$ — масса навески фракции, г;

W — потеря в массе при высушивании для фракции, %.

Определение содержания формонетина.

Для определения содержания формонетина использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с ультрафиолетовым детектированием по методике [13] с модификацией: около 0.025 г (точная навеска) фракций из каллусной культуры или растения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяли в стартовой подвижной фазе, состоящей из 0.1% трифторуксусной кислоты в воде (элюент А) и ацетонитрила (элюент Б) в соотношении 95 : 5, фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0.45 мкм и помещали в автодозатор. Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова, Россия) с ультрафиолетовым детектором при длине волны 210 нм в градиентном режиме: 5% элюента Б на старте анализа с последующим увеличением до 100% Б к 40-й минуте, 100% Б до 43-й минуты. Скорость потока составила 100 мкл/мин, температура термостата колонки 40°C, объем вводимой пробы 4 мкл. Расчет количественного содержания формонетина в образцах проводили методом внешнего стандарта по формуле:

$$X\% = \frac{S_x \cdot C_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot V}{S_0 \cdot m \cdot (100 - W)} \quad (3), \text{ где:}$$

S_x — площадь формонетина на хроматограмме испытуемого образца, е.о.п. × мкл;

S_0 — площадь формонетина на хроматограмме стандартного образца, е.о.п. × мкл;

C_0 — концентрация формонетина в стандартном растворе, мг/мл;

m — масса навески испытуемого образца, мг;

V — объем раствора испытуемого образца, мл;

W — потеря в массе при высушивании для фракции, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для индукции каллусогенеза использовали МС-среды с различными комбинациями регуляторов роста: 1.0 мг/л 2,4-Д — 0.1 мг/л 6-БАП, 2.0 мг/л 2,4-Д — 0.5 мг/л 6-БАП, 2 мг/л α-НУК — 0.5 мг/л 6-БАП, 3.5 мг/л α-НУК. Образование каллуса наблюдали к 14 сутками. Оптимальной для формирования каллуса являлась МС-среда с добавлением 1.0 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л 6-БАП. На других комбинациях регуляторов роста отмечен слабый прирост каллусной ткани с последующим ее некрозом.

Каллусная культура была получена только на эксплантах, представляющих собой основание побега: при использовании листовых эксплантов наблюдали потемнение ткани, тогда как на корнях образование каллуса сменялось разрастанием корней. Полученная каллусная культура клеток имела светло-желтый цвет и рыхлую структуру.

При дальнейшем культивировании каллусов на средах с добавлением 1.0 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л 6-БАП наблюдали постепенное замедление прироста, в связи с этим культура была перенесена на питательную со следующим составом фитогормонов — α-НУК (2.0 мг/л) + 6-БАП (0.5 мг/л), при этом отмечено разрастание каллуса с образованием плотной светлой ткани с темными участками рыже-коричневого цвета на местах соприкосновения с питательной средой (рис. 1). В дальнейшем культивирование осуществляли на питательной среде с добавлением фитогормонов α-НУК (2.0 мг/л) + 6-БАП (0.5 мг/л), период субкультивирования составлял 30 сут.

Исследования проводили на 20 цикл выращивания каллусной культуры. В результате анализа постоянных гистологических препаратов в каллусной культуре копеечника альпийского можно было выделить два цитотипа: небольшие



Рис. 1. Каллусная культура копеечника альпийского.

уплощенные клетки с крупным ядром, относящиеся, вероятно, к меристематическому типу (М), и более зрелые паренхимные (П) крупные клетки округлой формы (рис. 2а). При этом также встречались три типа специфических клеток — отдельные клетки большого размера, клетки с веретеновидным ядром и клетки вытянутой, червеобразной формы.

На гистологическом срезе основную часть каллуса составляли паренхимоподобные клетки, тогда как меристемоподобные клетки были локализованы небольшими скоплениями по краям с образованием редких морфологических очагов внутри каллуса. При этом внутри каллуса отмечено наличие больших каверн — пустот. При рассмотрении среза каллусной ткани можно наблюдать различные уплотнения и возникновение морфологических структур, представленных двумя зонами клеток: центральной — состоящей из относительно мелких, слабо вакуолизированных клеток, сохраняющих пролиферативную активность, и периферической — зоной крупных, рыхло расположенных сильно вакуолизированных паренхимоподобных клеток (рис. 2б). Таким образом, в соответствии с классификацией Кругловой с соавт. [14] у полученной культуры наблюдается становление гистологической зональности строения каллуса и гетерогенности его клеток по форме, размерам и строению.

В результате проведенного ВЭЖХ-МС исследования (рис. 3) в каллусной культуре копеечника альпийского идентифицировано 11 соединений фенольной природы (табл. 1), относящихся к группе изофлавонов (ононин, формонетин, генистеин и веститол), куместанов (хедизариумкуместан А и В), флавоноидов (эпигалокатехин) и флавонов (диосметин, изорамнетин), оксibenзойных кислот (галловая и эллаговая). Состав иденти-

фицированных веществ согласуется с литературными данными по химическому составу интактных растений копеечника [4–6].

Наибольшее количество обнаруженных соединений относится к группе фенольных соединений, в частности, изофлавоноидам — отдельному классу флавоноидов, характерному для растений семейства бобовые [23]. Среди обнаруженных соединений группы изофлавоноидов наиболее выраженный пик на хроматограмме идентифицирован у формонетина (рис. 3). Это соединение в последние годы привлекает большое внимание исследователей благодаря наличию не только эстрогенных, но и противоопухолевых свойств [23]. Проведен количественный анализ содержания формонетина в каллусной культуре и интродуцированном копеечнике альпийском с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (рис. 4а–в). В результате количественной оценки методом ВЭЖХ в хлороформно-бутанольной фракции, выделенной из каллусной культуры копеечника альпийского, определено $7.02 \pm 0.21\%$ формонетина в пересчете на абсолютно сухую массу, что на 11% ниже, чем в интродуцированных растениях ($7.87 \pm 0.24\%$).

Известно, что в растениях рода Копеечник присутствует значительное количество флавоноидов [24]. В результате количественного анализа содержание флавоноидов, не имеющих свободных гидроксильных групп в 3-положении кольца С и 5-положении кольца А в пересчете на кверцетин в каллусной культуре составило $2.40 \pm 0.12\%$, что на 35% ниже, чем в интродуцированных растениях копеечника ($3.71 \pm 0.17\%$). Количественный анализ основных компонентов извлечения из растений и каллусной культуры приведен в табл. 2.

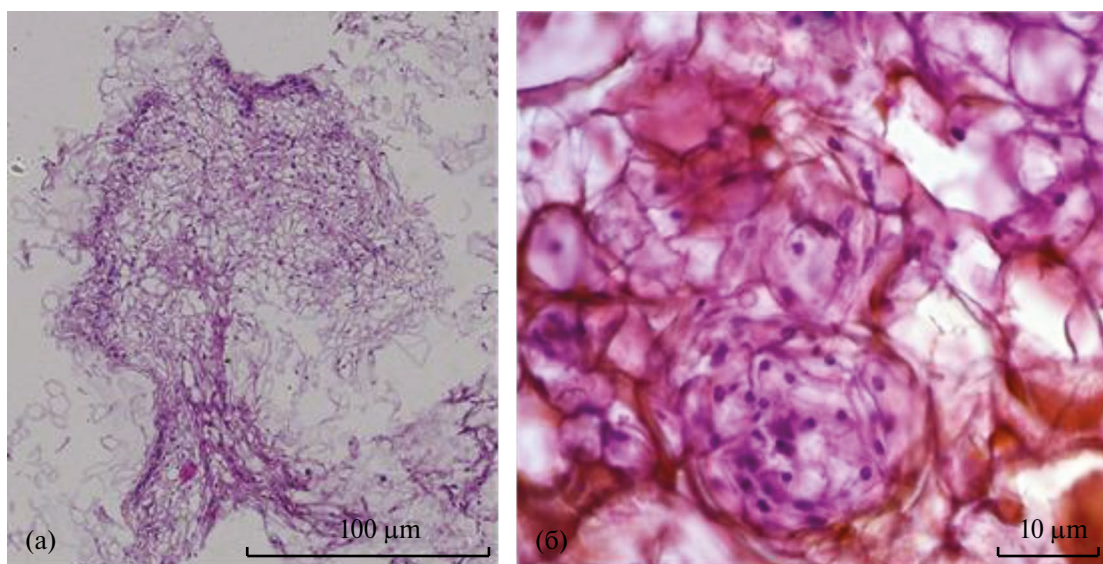


Рис. 2. Гистологический срез каллуса копеечника альпийского: а — общий вид; б — морфологические структуры.

Таблица 1. Компонентный состав фенольных соединений хлороформно-бутанольной фракции, выделенной из каллусной культуры копеечника альпийского, определенный с помощью ВЭЖХ-МС

Номер пика на хроматограмме	Соединение	Молекулярный вес, г/моль	MRM режим детектирования*
1	Галловая кислота	170	169 → 125; 169 → 79 (–) [15]
2	Ононин	430	431 → 269 (+) [16]
3	Формононетин	268	269 → 253 (+) [16]
4	Хедизариумкуместан В	298	299 → 179 (+)
5	Диосметин	300	299 → 284 (–) [17]
6	Эпигалокатехин	307	307 → 139 (+) [18]
7	Изорамнетин	316	317 → 153 (+) [19]
8	Хедизариумкуместан А	312	313 → 192 (+)
9	Эллаговая кислота	302	301 → 257 (–) [20]
10	Генистеин	270	271 → 243; 271 → 152 (+) [21]
11	Веститол	272	271 → 152 (–) [22]

Примечание: * “–” – негативный режим ионизации, “+” – позитивный режим ионизации.

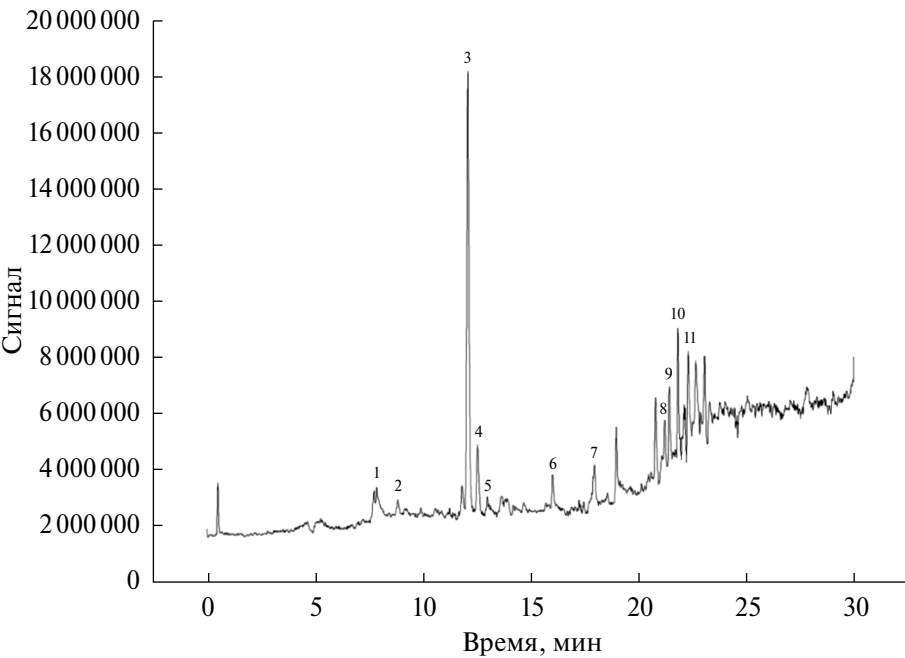


Рис. 3. ВЭЖХ-МС хроматограмма по полному ионному току хлороформно-бутанольной фракции из каллусной ткани копеечника альпийского. 1 – галловая кислота; 2 – ононин; 3 – формононетин; 4 – хедизариумкуместан В; 5 – диосметин; 6 – эпигалокатехин; 7 – изорамнетин; 8 – хедизариумкуместан А; 9 – эллаговая кислота; 10 – генистеин; 11 – веститол.

Помимо флавоноидов и изофлавонов осуществлена количественная оценка содержания мангиферина в культуре клеток и в интродуцированных растениях копеечника. Мангиферин принадлежит к группе органических соединений класса ксантонов. В полученной каллусной

культуре клеток с использованием адаптированной методики Имачуевой с соавт. [12] было определено содержание мангиферина, которое составило $7.45 \pm 0.16\%$, что в 1.5 раза превышает количество в надземной части интродуцированного копеечника (табл. 2).

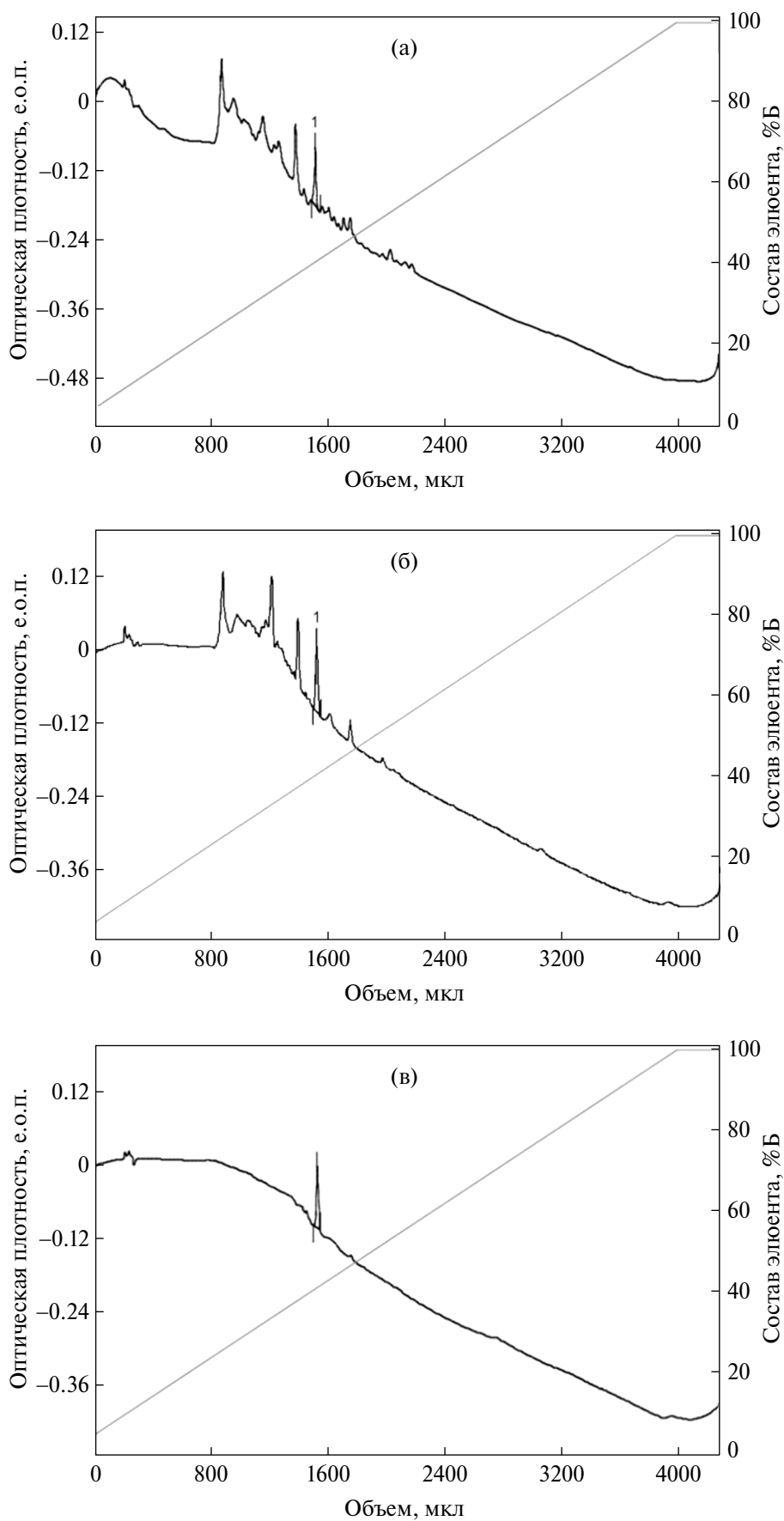


Рис. 4. Хроматограмма: а – формонетина из хлороформно-бутанольной фракции, выделенной из каллусной ткани копеечника альпийского; б – формонетина из хлороформно-бутанольной фракции, выделенной из копеечника альпийского; в – стандартного раствора формонетина ($c = 50$ мкг/мл).

Таблица 2. Содержание некоторых фенольных соединений в хлороформно-бутанольной фракции, выделенной из растений и каллусной культуры копеечника альпийского (% в пересчете на абсолютно сухую фракцию)

Объект	Содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин*, %	Содержание ксантонов в пересчете на мангиферин, %
Растение	3.71 ± 0.17	4.92 ± 0.18
Культура	2.40 ± 0.12	7.45 ± 0.16

Примечание: *содержание флавоноидов, не имеющих свободных гидроксильных групп в 3-положении кольца С и 5-положении кольца А.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования в полученной каллусной культуре копеечника обнаружен ряд биологически активных фенольных соединений, находящихся на различных стадиях фенилпропаноидного пути биосинтеза (рис. 5). Среди выявленных соединений изофла-

воноиды и, в частности, формонетин, проявляют различную биологическую активность. Например, воздействуя на различные сигнальные пути, опосредованные NF-κB (nuclear factor κB), AP-1 (activating protein-1), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), Nrf2 (nuclear factor erythroid 2) и MAPK (mitogen-activated protein

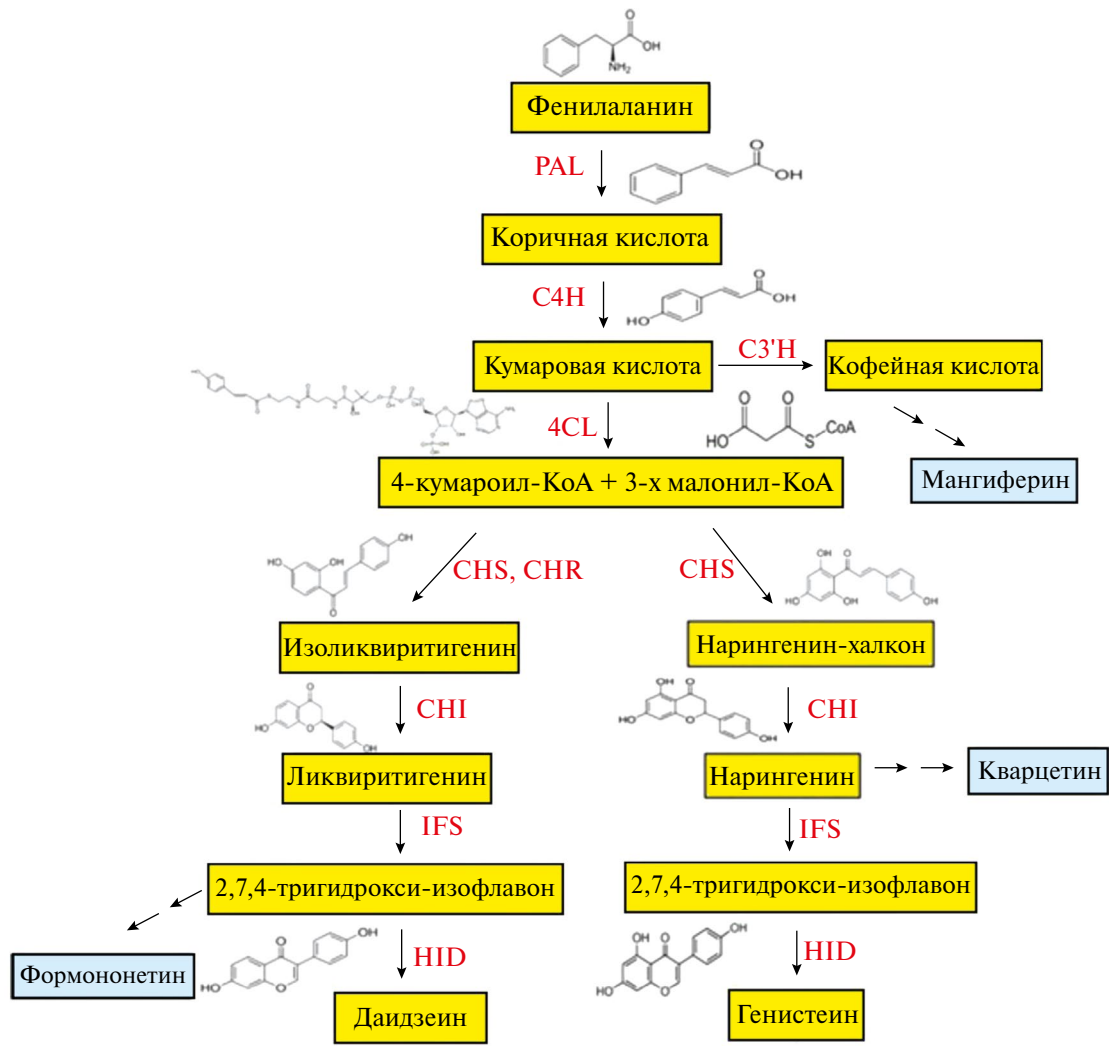


Рис. 5. Фенилпропаноидный путь биосинтеза некоторых фенольных соединений. PAL — фенилаланин-аммиаклиаза; C4H — циннамат-4-гидроксилаза; C3'H — п-кумароил шикимат 3-гидроксилаза; 4CL — 4-кумарат КоА-лигаза; CHS — халконсинтаза4; CHR — халконредуктаза; CHI — халконизомераза; IFS — изофлавоносинтаза; HID — изофлавонодегидратаза.

kinase), они способны уменьшать воспаление, обладают антиоксидантными свойствами и эстрогенной активностью [23, 25]. Также обнаружены флавоноиды, которые представляют одну из основных групп низкомолекулярных фенольных соединений. Ценность флавоноидов обусловлена их широким спектром биоактивных свойств, таких как противовоспалительные, мембранопротекторные, противоопухолевые, нейропротекторные, иммуномодулирующие, антибактериальные, противовирусные и т.д. [26, 27]. Еще одним классом фенольных соединений, характерным для рода Копеечник, являются ксантоны, в частности, мангифрин, который также обладает противоопухолевой, антиоксидантной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, нейропротекторной и противовирусной активностью [28, 29].

При использовании культур клеток и тканей растений в качестве продуцентов биологически активных веществ зачастую можно отметить снижение содержания и изменение качественного состава вторичных метаболитов, что связано со спецификой культуры клеток как биологической системы. Для увеличения содержания целевых метаболитов в дальнейшем перспективно использование различных подходов, например, изменение условий культивирования, применение элиситоров, генно-инженерных методов и др. [30].

Наличие в полученной каллусной культуре клеток копеечника биологически активных веществ в концентрациях выше и/или сопоставимых с интродуцированными растениями, возможно, связано с морфологическим строением каллуса, поскольку известно, что существует связь между дифференцировкой клеток в культуре и синтезом вторичных метаболитов [31, 32]. В полученной каллусной культуре клеток копеечника альпийского содержание мангиферина выше, а формононетина — ниже всего на 11%, чем в интродуцированных растениях, что позволяет рассматривать ее в качестве источника данных биологически активных соединений. Выявленный уровень вторичных метаболитов в культуре клеток копеечника открывает большой потенциал применения различных методов для увеличения накопления данных соединений и создания штамма-продуцента.

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Томского политехнического университета “Физико-химические методы анализа”.

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. Сафонова Н.В., Трофимова Е.О. Обзор российского рынка растительных препаратов // Ремедиум. 2021. Т. 3. С. 11.
2. Третьякова С. В., Половинкина С. В. К вопросу изученности запасов лекарственных растений в прибайкалье // Научные междисциплинарные исследования. 2020. Т. 4. С. 6.
3. Цицилин А.Н., Ковалев Н.И. Лекарственное растениеводство России в XXI веке (вызовы и перспективы развития) // Известия ТСХА. 2021. Т. 1. С. 42.
4. Высочина Г.И., Кукушкина Т.А. Биологически активные вещества некоторых видов рода *Hedysarum* L. // Химия растительного сырья. 2011. Т. 4. С. 251.
5. Dong Y., Tang D., Zhang N., Li Y., Zhang C., Li L., Li M. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* // Chem. Cent. J. 2013. V. 7. P. 124.
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-124>
6. Федорова Ю.С., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Ключевые биологически активные вещества фитопрепаратов на основе растений рода Копеечник // Сорбционные и хроматографические процессы. 2019. Т. 11. С. 708.
7. Свиридова Т.П., Зиннер Н.С. Перспективы выращивания *Hedysarum alpinum* L. и *Hedysarum theinum* Krasnob. в условиях Томской области // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2008. Т. 2. С. 5.
8. Ромашкина С.И., Хазиева Ф. М. Перспективы выращивания *Hedysarum alpinum* L. в нечерноземной зоне Российской Федерации // Вестн. КрасГАУ. 2020. Т. 12. С. 165.
9. Зиннер Н.С., Высочина Г.И., Кукушкина Т.А., Свиридова Т.П. Биологически активные вещества *Hedysarum alpinum* L. и *H. theinum* Krasnob. (fabaceae), интродуцируемых в Томскую область // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2010. Т. 4. С. 116.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
11. Авдеева Е.Ю., Краснов Е.А., Семенов А.А. Содержание флавоноидов в надземной части *Saussurea controversa* DC (Asteraceae) // Хим.-фарм. журнал. 2017. Т. 51. С. 28.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-2-28-29>
12. Имачуева Д.Р., Серебряная Ф.К., Зилфикаров И.Н. Количественное определение суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в надземных органах видов рода копеечник (*Hedysarum* L.) методом УФ-спектрофотометрии // Химия растит. сырья. 2020. Т. 3. С. 179.
13. Lee J.S., Paje L.A., Kim M.J., Jang S. H., Kim J.T., Lee S. Validation of an optimized HPLC—UV method for the quantification of formononetin and biochanin A in *Trifolium pratense* extract // Appl. Biol. Chem. 2021. V. 64. P. 57.
<https://doi.org/10.1186/s13765-021-00630-5>

14. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.Н. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49. С. 273.
<https://doi.org/10.1134/S0475145018050038>
15. Newsome A.G., Li Y., van Breemen R.B. Improved quantification of free and ester-bound gallic acid in foods and beverages by UHPLC-MS/MS // JAFC. 2016. V. 6. P. 1326.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04966>
16. Shaw L.H., Lin L.C., Tsai T.H. HPLC-MS/MS Analysis of a Traditional Chinese medical formulation of Bu-Yang-Huan-Wu-Tang and its pharmacokinetics after oral administration to rats // PLOS ONE. 2012. V. 8. P. e43848.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043848>
17. Shi F., Pan H., Lu Y., Ding L. An HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of luteolin and its major metabolites in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study // JSS. 2018. V. 20. P. 3830.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201800585>
18. Ciptati E.S., Ratnawati R., Rudijanto A.A. Qualitative analysis of catechins from green tea GMB-4 clone using HPLC and LC-MS/MS // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2015. V. 5 P. 1046.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.013>
19. Lan K., Jiang X., He J. Quantitative determination of isorhamnetin, quercetin and kaempferol in rat plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to the pharmacokinetic study of isorhamnetin // Rapid Commun. Mass. Spectrom. 2007. V. 2. P. 112.
<https://doi.org/10.1002/rcm.2814>
20. Lee J.H., Johnson J.V., Talcott S.T. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 15. P. 6003.
<https://doi.org/10.1021/jf050468r>
21. Tian Z., Wan M., Wang Z., Wang B. The preparation of genistein and LC-MS/MS on-line analysis // Drug Dev. Res. 2003. V. 1. P. 6.
<https://doi.org/10.1002/ddr.10332>
22. Dudoit A., Mertz C., Chillet M., Cardinault N., Brat P. Antifungal activity of Brazilian red propolis extract and isolation of bioactive fractions by thin-layer chromatography-bioautography // Food Chem. 2020. V. 327. P. 127060.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127060>
23. Rani D., Vimolmangkang, S. Trends in the biotechnological production of isoflavonoids in plant cell suspension cultures // Phytochem. Rev. 2022. V. 21. P. 1843.
<https://doi.org/10.1007/s11101-022-09811-6>
24. Jalsrai A., Urtnasan M., Hsieh-Li H.M. Ethanolic extract of *Hedysarum alpinum* L is rich in flavonoids and shows free radical scavenging and psychological modulation activities // J. Food Eng. Technol. 2023. V. 12. P. 14.
<https://doi.org/10.32732/jfet.2023.12.1.14>
25. Sohn S.I., Pandian S., Oh Y.J., Kang H.J., Cho W.S., Cho Y.S. Metabolic engineering of isoflavones: an updated overview // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 670103.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670103>
26. Dias M.C., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity // Molecules. 2021. V. 26. P. 5377.
<https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
27. Roy A., Khan A., Ahmad I., Alghamdi S., Rajab B.S., Babalghith A.O., Alshahrani M.Y., Islam S., Islam M.R. Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications // Biomed. Res. Int. 2022. V. 2022. P. 5445291.
<https://doi.org/10.1155/2022/5445291>
28. Imran M., Arshad M.S., Butt M.S., Kwon J.H., Arshad M.U., Sultan M.T. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders // Lipids Health Dis. 2017. V. 16. P. 84.
<https://doi.org/10.1186/s12944-017-0449-y>
29. Morozkina S.N., Nhung Vu. T.H., Generalova Y.E., Snetkov P.P., Uspenskaya M.V. Mangiferin as new potential anti-cancer agent and mangiferin-integrated polymer systems – A Novel Research Direction // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 79.
<https://doi.org/10.3390/biom11010079>
30. Popova E.V., Nosov A.V., Titova M.V., Kochkin D.V., Fomenkov A.A., Kulichenko I.E., Nosov A.M. Advanced biotechnologies: collections of plant cell cultures as a basis for development and production of medicinal preparations // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68. P. 385.
<https://doi.org/10.31857/S0015330321030167>
31. Tomilova S.V., Kitashov A.V., Nosov A.M. cardiac glycosides: distribution, properties and specificity of formation in plant cell and organ cultures *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69. P. 227.
<https://doi.org/10.31857/S0015330322030162>
32. Morphogenesis, Genetic Stability, and Secondary Metabolite Production in Untransformed and Transformed Cultures // Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry / Eds. Ramawat, K., Ekiert, H., Goyal, S. Springer. 2020 P. Cham. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-11253-0_15-2

УДК 581.1:577.352:577.115

H⁺-ПИРОФОСФАТАЗА ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ СВИНЦА

© 2024 г. Е. В. Спиридонова^а, В. В. Гурина^а, Н. В. Озолина^а, И. С. Капустина^{а, *}^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: nirinka24@mail.ru

Поступила в редакцию 07.06.2024 г.

После доработки 12.07.2024 г.

Принята к публикации 12.07.2024 г.

Изучали действие различных концентраций Pb²⁺ (0.1 мкМ – 2 мМ) на работу вакуолярной H⁺-пирофосфатазы корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Установлено, что на уровне тканей в ответ на действие 1 мМ и 2 мМ ионов свинца происходило накопление продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) и увеличение проницаемости клеточных мембран, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Оценку функционирования H⁺-пирофосфатазы тонопласта проводили по уровню гидролитической и транспортной активности фермента. Наблюдалось стимулирование гидролиза субстрата, катализируемого H⁺-пирофосфатазой, в присутствии низких концентраций Pb²⁺. Концентрации металла выше 500 мкМ ингибировали гидролитическую активность пирофосфат-зависимого фермента. Однако уровень транспортной активности значимо стимулировался в присутствии 1 мМ Pb²⁺. Одновременно проводимый анализ качественного и количественного состава жирных кислот (ЖК) общих липидов тонопласта показал достоверное снижение содержания олеиновой (C18:1(n-6)) и линолевой (C18:2(n-6)) ЖК при действии 1 мМ Pb²⁺. Ионы свинца в концентрации 1 мМ увеличивали сумму насыщенных ЖК. Установлено, что Pb²⁺ могут оказывать влияние на активность H⁺-пирофосфатазы тонопласта и структуру клеточных мембран в зависимости от концентрации. Возможно, выявленные изменения являются одним из механизмов адаптации к условиям стресса, вызванного Pb²⁺.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, вакуоль, ионы свинца (Pb²⁺), H⁺-пирофосфатаза, стресс, тонопласт

DOI: 10.31857/S0015330324060072, EDN: MAONEW

ВВЕДЕНИЕ

Свинец (Pb) как один из наиболее опасных представителей ТМ оказывает влияние на протекание многих физиологических процессов в растениях (рост, фотосинтез, дыхание, водный обмен, минеральное питание и др.) [1]. Одна из важных причин этого действия связана с тем, что свинец вызывает в клетках растений окислительный стресс [2]. Отрицательное воздействие высоких концентраций свинца на растения проявляется на разных уровнях организации: организменном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном. На субклеточном уровне происходят нарушения в структуре и функциях клеточных мембран, при этом наблюдаются изменения в составе мембранных липидов и белков [1].

Для предотвращения токсического действия ТМ на протекание метаболических процессов в клетке, существует ряд защитных механизмов, один из которых связан с изолированием ионов ТМ и их комплексов, в том числе и Pb²⁺ в вакуоль [3]. Перенос ионов ТМ и их комплексов через вакуолярную мембрану (тонопласт) осуществляется с помощью белков-переносчиков, работающих за счет электрохимического градиента генерируемого протонными помпами H⁺-АТФазой и H⁺-пирофосфатазой [4].

Пирофосфатаза вакуолярного типа (V-H⁺-пирофосфатаза) транспортирует протоны из цитозоля через вакуолярную мембрану совместно с гидролизом неорганического пирофосфата (PPi). Она была обнаружена в растениях, водорослях, фотосинтезирующих бактериях, простейших и археобактериях [5]. H⁺-пирофосфатаза тонопласта представляет собой одиночный белок с 14–16 трансмембранными доменами и молекулярной массой 70–80 кДа. На долю

Сокращения: ДК – диеновые конъюгаты; ЖК – жирные кислоты; ТМ – тяжелые металлы; СНЖК – сумма насыщенных жирных кислот; СННЖК – сумма ненасыщенных жирных кислот.

H⁺-пирофосфатазы приходится 1–10% белков тонопласта для максимальной активности, которой требуется K⁺ [4]. В растениях преобладающее значение на тонопласте H⁺-пирофосфатаза занимает в клетках молодых, растущих тканей и в зрелых тканях с повышенным уровнем кислотности вакуолярного сока [6]. Кроме того, известно, что в различных условиях абиотического стресса происходит увеличение уровня активности этого фермента [7], в том числе и в условиях токсического действия ТМ. Так, например, согласно литературным данным, было отмечено увеличение активности H⁺-пирофосфатазы в ответ на действие различных концентраций Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ и Cd²⁺ [8, 9]. Экспрессия гена H⁺-пирофосфатазы (*TaVPI*) приводит к повышению устойчивости трансгенных растений табака к высоким концентрациям меди [10] и накоплению Cd²⁺ в растениях риса [11] и т. д. Однако влияние Pb²⁺ на функционирование и регуляцию H⁺-пирофосфатазы практически не изучено. В связи с этим, цель настоящего исследования — изучение особенностей функционирования H⁺-пирофосфатазы тонопласта *Beta vulgaris* L. в присутствии Pb²⁺.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом исследования служили корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Влияние Pb²⁺ оценивали в модельных экспериментах как на уровне растительных тканей, так и на уровне изолированных вакуолей и вакуолярных мембран.

Определение проницаемости клеточных мембран. Степень проницаемости клеточных мембран в условиях стресса, вызванного Pb²⁺, оценивали по выходу электролитов кондуктометрическим методом [12] с незначительными модификациями. Растительную ткань (очищенные корнеплоды столовой свеклы, стадия покоя) нарезают на диски толщиной 1 мм и промывают в дистиллированной воде, после этого обсушивают на фильтровальной бумаге и отбирают навески по 0.5 г. Затем приливали раствор Pb(NO₃)₂ в качестве источника Pb²⁺ и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Чтобы подобрать концентрацию ТМ, при которой происходит развитие окислительного стресса, использовали варианты, содержащие 1 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ, 500 мкМ, 1 мМ и 2 мМ Pb²⁺. В контрольном варианте использовали дистиллированную воду. После инкубации диски промывали водой. Далее к дискам приливали по 80 мл дистиллированной воды. В течение 24 ч происходил выход электролитов, после этого проводили определение электропроводности с помощью кондуктометра ОК-104 (Radcliff, Венгрия) с платиновым электродом. Для полно-

го выхода электролитов раствор с растительным материалом доводили до кипения и выдерживали в течение 2 мин. Уровень выхода электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода.

Количественное определение продуктов перекисного окисления липидов. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию диеновых конъюгатов (ДК) [13]. Измерение оптической плотности проводили на СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) при 203 нм. Количество ДК в растительном материале выражали в М/г сухого веса.

Получение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран. Выделение вакуолей и вакуолярных мембран (тонопласта) проводили модифицированным макрообъемным методом, разработанным в лаборатории физиологии растительной клетки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук [14].

Анализ протон-транспортирующей активности H⁺-пирофосфатазы тонопласта. Транспортную функцию H⁺-пирофосфатазы оценивали по изменению pH везикул тонопласта методом флуоресцентных зондов при длине волны возбуждаемого и испускаемого света 493 и 540 нм, соответственно. В качестве флуоресцентного зонда использовали акридиновый оранжевый (АО). Инкубационная смесь общим объемом 2.5 мл включала в себя 0.28 М маннита, 50 мМ KCl, 20 мМ Трис/Mes (pH 7.4), 3 мМ MgCl₂·6H₂O, 5 мкМ АО, суспензию везикул тонопласта (50–70 мкг мембранного белка). К инкубационной смеси приливали раствор, содержащий различные концентрации Pb²⁺ от 0.1 мкМ до 2 мМ. Реакцию переноса H⁺ внутрь везикул тонопласта запускали добавлением 3 мМ K₄P₂O₇. Регистрацию изменений разности поглощений АО проводили на спектрофлуориметре RF-5301 PC (Shimadzu, Япония). Концентрацию белка в суспензии везикул тонопласта определяли методом Bradford [15].

Изучение гидролитической активности H⁺-пирофосфатазы тонопласта. Для определения гидролитической активности H⁺-пирофосфатазы в пробирки объемом 2 мл последовательно вносили инкубационную среду, содержащую 30 мМ Трис/Mes, 3 мМ MgSO₄·7H₂O, 70 мМ KCl, 0.5 мМ молибдата аммония, суспензию изолированных вакуолей и раствор, содержащий различные концентрации Pb²⁺. В качестве субстрата использовали 3 мМ K₄P₂O₇. После этого пробы инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Реакцию гидролиза субстрата останавливали 7% ТХУ с последующим встряхиванием в течение 15 мин до полного разрушения вакуолей. Содержимое пробирок центрифугировали на микроцентрифуге 5417 R (Eppendorf, США) при 1200 g в течение 2 мин. В надосадочной жидкости определяли

количество образовавшегося неорганического фосфата по методике Скулачева [16]. По содержанию неорганического фосфата оценивали активность фермента. Чтобы исключить примесь “нереакционного” фосфата использовали соответствующие контроли. При определении активности H⁺-пирофосфатазы все значения опыта делили на два, поскольку при гидролизе пирофосфата образуются две молекулы ортофосфата [17]. В экспериментах по определению гидролитической и транспортной активности H⁺-пирофосфатазы в качестве ингибитора использовали KF·2H₂O (50 мМ).

Идентификация и анализ содержания жирных кислот (ЖК) тонопласта. Для анализа состава ЖК кусочки ткани корнеплодов размером 1 см³ замачивали в растворе, содержащем различные концентрации Pb²⁺, на 16 ч при комнатной температуре. Из ткани корнеплодов, подвергнутых стрессовому воздействию, выделяли фракцию везикул тонопласта. Экстракцию общих липидов тонопласта проводили модифицированным методом Фолча [18]. Для оценки полноты экстракции липидов (%) использовали нонадекановую кислоту (C19:0) в определенной концентрации. Получение метиловых эфиров ЖК проводили по методу Christie [19]. Анализирование состава метиловых эфиров ЖК тонопласта осуществляли при помощи хромато-масс-спектрометра Agilent technology 5973N/6890N MSD/DS (Agilent, США). Пики метиловых эфиров ЖК идентифицировали в сравнении со стандартами метиловых эфиров (Sigma, США) и данными библиотеки масс-спектров NIST 05. Относительное содержание ЖК оценивали методом внутренней нормализации в весовых процентах (вес. %) от их общего количества в изучаемом образце с учетом коэффициента отклика ЖК. Для определения степени ненасыщенности липидов применяли индекс двойной связи (ИДС) [26]:

$$\text{ИДС} = \sum P_j n_j / 100, \quad (1)$$

где P_j – содержание ЖК (вес. %); n_j – количество двойных связей в каждой ненасыщенной ЖК.

Активность ацил-липидных мембранных ω9-, ω6- и ω3-десатураз, отвечающих за введение двойных связей в углеводородные цепи олеиновой (C18:1(n-9)), линолевой (C18:2(n-6)) и α-линоленовой (C18:3(n-3)) ЖК, рассчитывали как стеароил- (SDR), олеоил- (ODR) и линолеил- (LDR) десатуразные отношения по формулам [20]:

$$\text{SDR} = (\% \text{C18:1}) / (\% \text{C18:0} + \% \text{C18:1}), \quad (2)$$

$$\text{ODR} = (\% \text{C18:2} + \% \text{C18:3}) / (\% \text{C18:1} + \% \text{C18:2} + \% \text{C18:3}), \quad (3)$$

$$\text{LDR} = (\% \text{C18:3}) / (\% \text{C18:2} + \% \text{C18:3}). \quad (4)$$

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в 5–7 независимых биологических и 3 аналитических повторностях с последующим расчетом средних значений и их стандартной ошибки количественных значений и медианы с процентилями для процентных значений. Статистическую обработку данных осуществляли методами Манна-Уитни и LSD Фишера. Расчеты выполняли, используя программы SigmaPlot 12.5. и Microsoft Excel. Отличия между данными считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе исследования проводилось изучение условий стресса, вызванного действием Pb²⁺, по уровню проницаемости клеточных мембран и содержанию первичных продуктов ПОЛ. Как известно, ТМ вызывают развитие окислительного стресса, оказывающего влияние на внутриклеточные структуры, в том числе и на клеточные мембраны [2]. Анализ полученных данных показал, что применение Pb²⁺ в концентрации до 500 мкМ включительно, не приводило к значимому изменению проницаемости мембран и уровень электролитов оставался в пределах контроля (рис. 1). При повышении концентрации ТМ до 1 мМ наблюдалось незначительное увеличение выхода электролитов из ткани корнеплодов столовой свеклы, в то время как значимые результаты были отмечены при 2 мМ Pb²⁺, где выход электролитов увеличивался на 45% по сравнению с контролем.

Повреждение клеточных мембран при окислительном стрессе напрямую связано с ПОЛ. Чтобы оценить уровень повреждения липидов проводили определение первичных продуктов ПОЛ – ДК (рис. 2). Содержание ДК оценивали при использовании двух концентраций Pb²⁺ (1 и 2 мМ), которые, согласно выходу электролитов, приводили к наиболее выраженному повреждению клеточных мембран. В результате было отмечено значимое увеличение количества ДК при использовании 1 и 2 мМ Pb²⁺ на 19 и 28% соответственно, по сравнению с контрольным вариантом.

Изучение гидролитической активности H⁺-пирофосфатазы проводили с применением очищенной фракции вакуолей, выделенной из ткани корнеплодов столовой свеклы. Анализ уровня гидролитической активности этого протонного насоса показал, что применение Pb²⁺ в концентрациях 0.1, 1, 10 и 100 мкМ приводило к увеличению активности фермента (рис. 3). Интересно отметить, что более ярко выраженное повышение происходило при использовании 1 мкМ Pb²⁺ – на

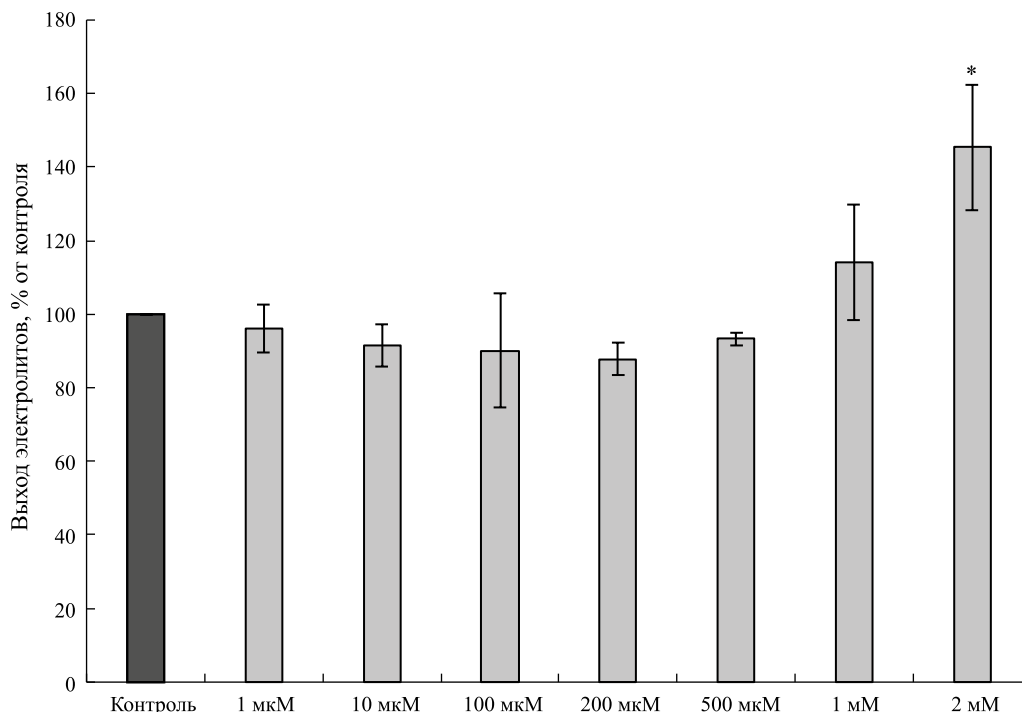


Рис. 1. Влияние различных концентраций Pb^{2+} на выход электролитов из тканей корнеплодов столовой свеклы в инкубационный раствор. Полный выход электролитов в контроле принят за 100%. Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера. * — различия с контролем достоверны при $P < 0.05$.

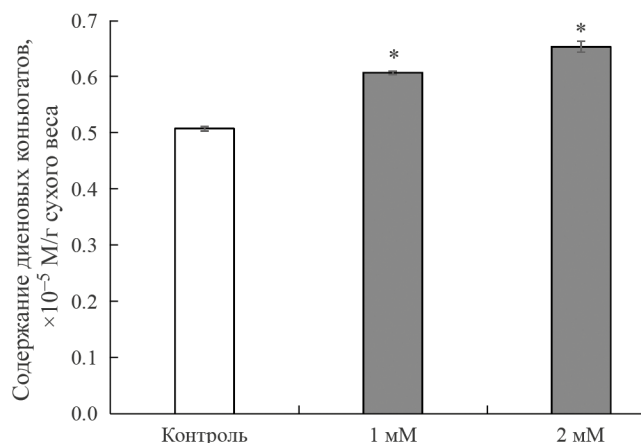


Рис. 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях корнеплодов столовой свеклы в норме (контроль) и в присутствии различных концентраций Pb^{2+} . Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера. * — различия с контролем достоверны при $P < 0.05$.

23% по сравнению с контролем. Увеличение концентрации Pb^{2+} оказывало негативное действие на работу фермента приводя к снижению гидролиза субстрата и содержания неорганического пирофосфата. Уровень гидролитической активности H^+ -пирофосфатазы при 500 мкМ, 1 и 2 мМ Pb^{2+} снижался на 11, 13 и 25% соответственно.

Определение H^+ -транспортирующей активности H^+ -пирофосфатазы проводили во фракции везикул тонопласта тканей корнеплодов столовой свеклы. Анализ полученных данных показал, что применение концентраций Pb^{2+} до 1 мМ не оказывало заметного влияния на пи-

рофосфат-зависимый транспорт H^+ , за исключением небольшого увеличения при 0.1 мкМ (рис. 4). Применение Pb^{2+} в концентрации 1 мМ значимо повышало активность H^+ -пирофосфатазы на 23.8% по сравнению с контролем.

Известно, что активность мембраносвязанных ферментов зависит от липидов, которые их окружают [4, 21]. Липидная регуляция мембранных ферментов осуществляется посредством изменения физических свойств бислоя или пограничного слоя фосфолипидов, непосредственно окружающих молекулу интегральных белков, что приводит к перестройке их конформации

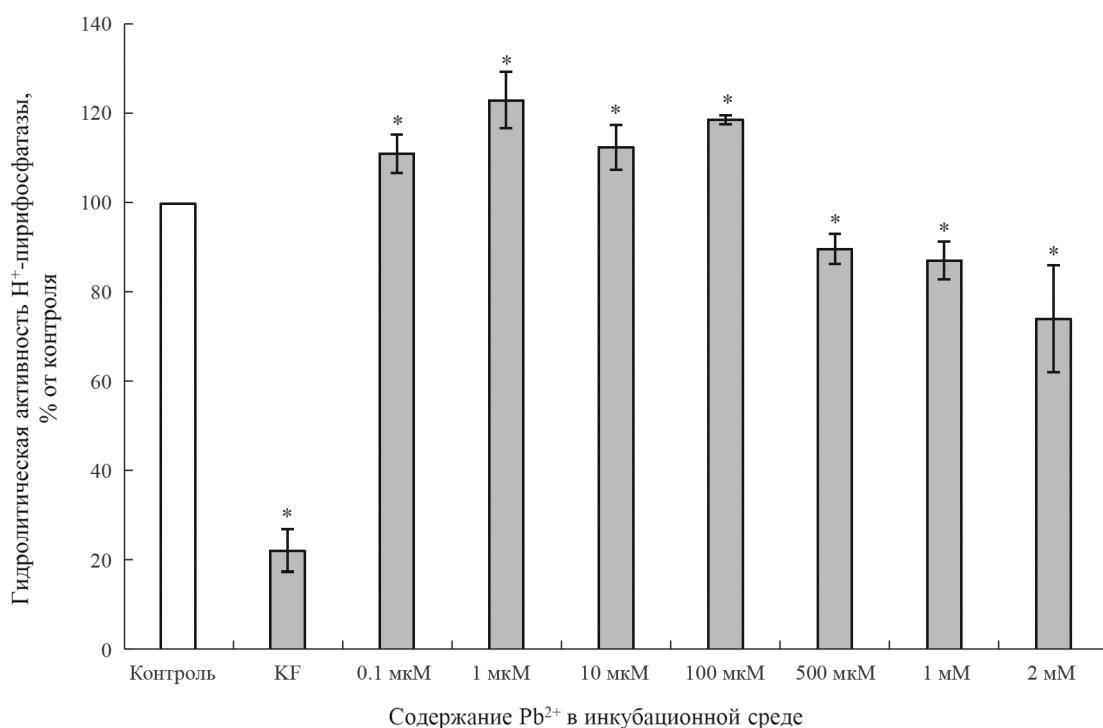


Рис. 3. Действие различных концентраций Pb²⁺ на гидролитическую активность вакуолярной H⁺-пиروفосфатазы тканей корнеплодов столовой свеклы. В качестве ингибитора использовали KF·2H₂O (50 мМ). Активность в контрольном варианте принята за 100%. * — значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна-Уитни (различия с контролем достоверны при P < 0.05).

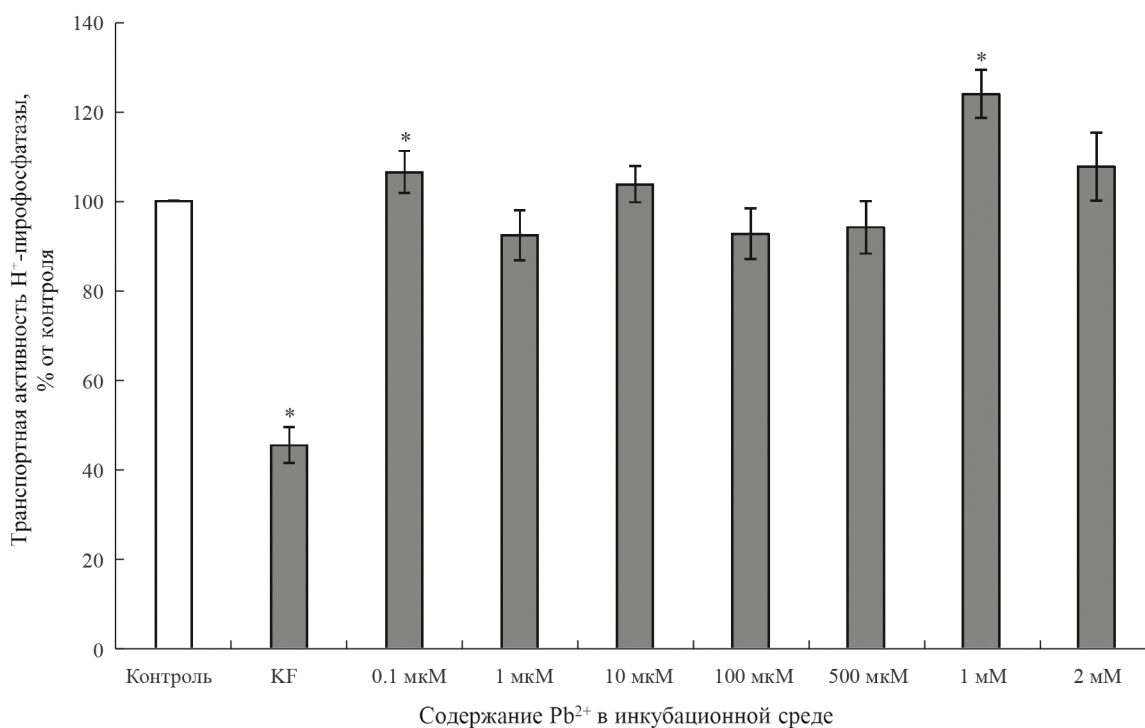


Рис. 4. Действие различных концентраций Pb²⁺ на транспортную активность H⁺-пиروفосфатазы в везикулах тонопласта изолированных из тканей корнеплодов столовой свеклы. В качестве ингибитора использовали KF·2H₂O (50 мМ). Активность в контрольном варианте принята за 100%. * — значимость различий рассчитана с помощью U-критерия Манна-Уитни (различия с контролем достоверны при P < 0.05).

и сказывается на активности. Состав мембранных липидов может изменяться в ответ на действие ТМ [22]. В связи с этим анализировали качественный и количественный состав ЖК липидов тонопласта в условиях стресса, вызванного действием Pb^{2+} (табл. 1.). В эксперименте применяли две концентрации ТМ – 1 мМ и 2 мМ. Согласно полученным данным, наблюдалось изменение состава и количества ЖК. В присутствии 1 мМ Pb^{2+} сумма ЖК значительно не изменялась, однако наблюдалось снижение в содержании пентадекановой (C15:0), маргариновой (C17:0) и линолевой (C18:2(n-6)) ЖК. Отмечалось значимое повышение в содержании олеиновой (C18:1(n-9)) ЖК с 19.3% в контроле до 27.5% в присутствии 1 мМ Pb^{2+} . Кроме того, среди ненасыщенных ЖК содержание олеиновой (C18:1(n-9)) кислоты преобладало в отличие от контрольного варианта, где преимущественное место занимала линолевая (C18:2(n-6)) кислота. В ряду насыщенных ЖК преобладала пальмитиновая (C16:0) кислота, ее содержание также увеличивалось по сравнению с контролем с 31.7 до 35.8%. Оценка ИДС ЖК липидов тонопласта показала снижение этого значения с 1.11 в контроле до 0.89 в присутствии Pb^{2+} . В целом наблюдалось увеличение суммы насыщенных ЖК (Σ НЖК) с 36.2% в контроле до 41.2% в ответ на действие Pb^{2+} , в то время как сумма ненасыщенных ЖК (Σ ННЖК) наоборот снижалась с 63.8% до 58.8%. Помимо этого, в ответ на действие 1 мМ Pb^{2+} отмечалось значимое снижение показателя ODR с 0.69 в контроле до 0.49. Существенных изменений в показателях SDR и LDR не отмечалось.

В условиях стресса, вызванного действием 2 мМ Pb^{2+} , преобладающее значение занимали ненасыщенные ЖК. Наблюдалось значимое снижение в содержании насыщенных ЖК таких как, миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), маргариновая (C17:0) и стеариновая (C18:0) ЖК. Среди ненасыщенных ЖК значимое снижение отмечалось в содержании пальмитолеиновой кислоты (C16:1(n-7)). Как и в контроле больший вклад в сумму насыщенных ЖК вносила пальмитиновая кислота (C16:0), а в сумму ненасыщенных – линолевая кислота (C18:2(n-6)). Значимых изменений в показателях ODR, SDR и LDR не отмечалось.

По сравнению с контрольным вариантом в ответ на стрессовое воздействие Pb^{2+} , в обеих применяемых концентрациях, наблюдалось отсутствие C18:(n-5) кислоты. В то время как, другая кислота (C16:1(n-9)) была отмечена только в условиях стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы оценить условия стресса вызванного ионами свинца, на начальном эта-

пе работы, проводилось изучение токсического действия исследуемого металла на ткани корнеплодов столовой свеклы (рис. 1). Согласно полученным результатам по выходу электролитов в инкубационный раствор достоверно значимые изменения отмечались при использовании высоких концентраций Pb^{2+} 1 мМ и 2 мМ, в то время как микромолярные концентрации не оказывали существенного влияния на проницаемость клеточных мембран. По-видимому, это может быть связано с высоким сродством Pb^{2+} с компонентами клеточной стенки, что приводит к его меньшей подвижности по сравнению с другими ТМ [23]. Этот факт, возможно, объясняет почему Pb^{2+} в концентрации до 1 мМ менее токсичны для растительных клеток, чем, например, кадмий [24]. Тем не менее, Pb относится к ТМ, которые даже в низких концентрациях оказывает сильное воздействие на протекание клеточных процессов [25]. В связи с этим, наблюдаемое увеличение проницаемости клеточных мембран может быть вызвано токсическим действием Pb^{2+} , приводящим к образованию пор. Как уже было показано, в стрессовых условиях поры могут значительно повысить проницаемость мембраны для ионов [26]. Увеличение выхода электролитов в присутствии свинца было показано и другими исследователями [27, 28].

Как известно, в аэробных организмах повышенная генерация АФК и, как следствие, развитие окислительного стресса являются одними из наиболее известных и ранних аспектов токсичности свинца [2]. За счет опосредованной генерации АФК свинец индуцирует ПОЛ, тем самым влияя на клеточные мембраны. Поскольку повышение проницаемости клеточных мембран отмечалось при использовании Pb^{2+} в концентрации 1 мМ и 2 мМ, то и оценку ПОЛ проводили в этих концентрациях. В результате нашего исследования, в ответ на действие Pb^{2+} в обеих концентрациях отмечалось увеличение содержания ДК – первичных продуктов ПОЛ (рис. 2). Анализ полученных данных указывает на негативное действие используемых концентраций Pb^{2+} на липидную составляющую тканей корнеплодов столовой свеклы, что в свою очередь может приводить к изменению функциональных свойств клеточных мембран, в том числе и тонопласта.

Выявленное увеличение проницаемости клеточных мембран и продуктов ПОЛ в тканях корнеплодов столовой свеклы в ответ на действие Pb^{2+} говорит о развитии окислительного стресса, который в свою очередь может оказывать влияние на протекание внутриклеточных процессов. На субклеточном уровне, изоляция ионов ТМ, в том числе и Pb^{2+} , внутри вакуоли, помогает защитить растительную клетку от их токсического воздействия [3]. В этом процессе принимают

Таблица 1. Содержание жирных кислот липидов вакуолярной мембраны тканей корнеплодов столовой свеклы после воздействия различных концентраций ионов свинца

Жирные кислоты	Контроль			1 мМ Рb ²⁺			2 мМ Рb ²⁺		
	мкг/мг общих липидов	% от ΣЖК	мкг/мг общих липидов	мкг/мг общих липидов	% от ΣЖК	мкг/мг общих липидов	мкг/мг общих липидов	% от ΣЖК	% от ΣЖК
Миристиновая, C14:0	1.30 ± 0.23	0.48 [0.46; 0.6]	1.03 ± 0.04	1.03 ± 0.04	0.44 [0.43; 0.47]	0.49 ± 0.06*	0.17 [0.15; 0.17]*		
Пентадекановая, C15:0	3.28 ± 0.12	1.38 [1.33; 1.46]	2.86 ± 0.09*	2.86 ± 0.09*	1.18 [1.17; 1.3]	2.8 ± 0.2*	1.06 [1.04; 1.06]*		
Пальмитиновая, C16:0	78.16 ± 6.85	31.74 [30.67; 34.8]	86.54 ± 3.12	86.54 ± 3.12	35.82 [35.12; 39.92]	81.65 ± 4.48	29.78 [29.67; 29.78]		
Пальмитолеиновая, C16:1(n-9)	—	—	1.51 ± 0.26	1.51 ± 0.26	0.62 [0.57; 0.71]	2.46 ± 0.29	1.03 [0.84; 1.03]		
Пальмитолеиновая, C16:1(n-7)	1.72 ± 0.03	0.73 [0.72; 0.74]	—	—	—	1.21 ± 0.11*	0.5 [0.44; 0.51]*		
Маргариновая, C17:0	0.66 ± 0.10	0.24 [0.24; 0.3]	0.53 ± 0.02*	0.53 ± 0.02*	0.23 [0.23; 0.23]	0.48 ± 0.02*	0.18 [0.17; 0.18]		
Стеариновая, C18:0	5.40 ± 0.73	2.25 [2.03; 2.52]	4.01 ± 0.35	4.01 ± 0.35	1.77 [1.62; 1.77]	3.42 ± 0.36*	1.29 [1.24; 1.35]*		
Олеиновая, C18:1(n-9)	42.49 ± 3.89	19.27 [17.21; 19.38]	64.88 ± 1.11*	64.88 ± 1.11*	27.47 [27.32; 29.1]*	48.69 ± 4.85	18.25 [18.23; 18.48]		
Цис-вакценовая, C18:1(n-7)	4.77 ± 0.38	1.87 [1.83; 2.14]	4.99 ± 0.47	4.99 ± 0.47	2.14 [2.06; 2.27]	5.44 ± 0.4	1.79 [1.75; 1.79]		
C18:1(n-5)	1.99 ± 0.15	0.81 [0.78; 0.9]	—	—	—	—	—		
Линолевая, C18:2(n-6)	88.50 ± 6.48	39.51 [35.37; 40.8]	48.9 ± 11.38*	48.9 ± 11.38*	24.3 [18.49; 25.19]*	96.19 ± 14.03	37.57 [34.8; 37.95]		
C18:2(n-4)	—	—	1.74 ± 0.13	1.74 ± 0.13	0.74 [0.71; 0.74]	6.27 ± 0.73	2.33 [2.31; 2.4]		
Линоленовая, C18:3(n-3)	7.67 ± 1.19	3.18 [2.81; 3.65]	5.59 ± 0.77	5.59 ± 0.77	2.57 [2.27; 2.65]	8.56 ± 1.27	3.28 [3.06; 3.38]		
Арахидоновая, C20:0	—	—	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.13 [0.13; 0.13]	0.6 ± 0.06	0.19 [0.19; 0.19]		
Эйкозеновая, C20:1(n-9)	—	—	1.52 ± 0.08	1.52 ± 0.08	0.62 [0.61; 0.71]	1.47 ± 0.09	0.55 [0.53; 0.55]		
Бегеновая, C22:0	—	—	1.47 ± 0.14	1.47 ± 0.14	0.57 [0.56; 0.7]	1.61 ± 0.18	0.66 [0.59; 0.66]		
C22:1(n-11)	—	—	0.94 ± 0.05	0.94 ± 0.05	0.39 [0.38; 0.43]	1.14 ± 0.16	0.42 [0.4; 0.45]		
Трикозановая, C23:0	—	—	1.94 ± 0.14	1.94 ± 0.14	0.82 [0.76; 0.94]	2.07 ± 0.06	0.73 [0.73; 0.73]		
ΣЖК	235.95 ± 3.80	100 [100; 100]	228.76 ± 10.35	228.76 ± 10.35	100 [100; 100]	264.56 ± 25.72	100 [100; 100]		
ΣНЖК	88.8 ± 7.80	36.2 [34.86; 39.6]	98.68 ± 3.22	98.68 ± 3.22	41.21 [40.17; 45.57]	93.13 ± 5.06	33.97 [33.82; 33.97]		
ΣННЖК	147.14 ± 5.48	63.8 [60.4; 65.14]	130.08 ± 13.09	130.08 ± 13.09	58.79 [54.43; 59.83]	171.43 ± 20.68	66.03 [63.54; 66.18]		

Таблица 1. Окончание

ИДС		1.11 [1.03; 1.12]		0.89 [0.78; 0.91]	1.12 [1.07; 1.13]
SDR		0.87 [0.87; 0.89]		0.95 [0.94; 0.95]	0.93 [0.93; 0.94]
ODR		0.69 [0.67; 0.72]		0.49 [0.41; 0.5]*	0.69 [0.67; 0.69]
LDR		0.09 [0.07; 0.09]		0.1 [0.1; 0.11]	0.08 [0.08; 0.08]

Примечание. n = 3-5. * — различия с контролем достоверны при $P < 0.05$. Для доказательства наличия значимых различий между средними $M \pm SE$ применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference) Фишера — метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью. Для доказательства наличия значимых различий между медианами Me [25%, 75%] использовали Н-критерий Краскела—Уоллиса и последующее множественное сравнение медиан проводили по методу Стьюдента—Ньюмена—Кейлса. $\Sigma ЖЖ$ — сумма жирных кислот, $\Sigma НЖЖ$ — сумма ненасыщенных жирных кислот. Активность ацил-липидных мембранных $\omega 9$ -, $\omega 6$ - и $\omega 3$ -десатураз, отвечающих за введение двойных связей в углеводородные цепи олеиновой (C18:1(n-9)), линолевой (C18:2(n-6)) и α -линоленовой (C18:3(n-3)) ЖК, рассчитывали как стеароил- (SDR), олеоил- (ODR) и линолеил- (LDR) десатуразные отношения.

активное участие белки-переносчики, работа которых осуществляется за счет электрохимического градиента, генерируемого протонными помпами H^+ -АТФазой и H^+ -пирофосфатазой. Согласно литературным данным до сих пор очень мало информации о функционировании и регуляции протонных помп в растениях при стрессе, вызванным Pb^{2+} . Особенно это касается H^+ -пирофосфатазы тонопласта. В нашем исследовании проводилось изучение работы H^+ -пирофосфатазы в условиях стресса, вызванного действием различных концентраций Pb^{2+} . Как было показано другими исследователями в условиях абиотического стресса H^+ -пирофосфатаза может выступать в роли альтернативного источника энергии [29].

ТМ могут модулировать активность мембраносвязанных ферментов разными путями. Один из путей связан с прямым действием ТМ на работу фермента. В работе по изучению активности АТФазы плазмалеммы были объяснены некоторые механизмы прямого действия ТМ. К ним относятся образование ТМ комплексов с субстратом, взаимодействие с функциональными лигандами фермента и связывание ТМ с мембранными фосфолипидами [30]. В нашем исследовании оценивали прямое действие Pb^{2+} на активность H^+ -пирофосфатазы внесением этого металла в среду инкубации. Изучение гидролитической и транспортной активности H^+ -пирофосфатазы показало разный характер действия Pb^{2+} (рис. 3, 4). Достоверно значимое увеличение гидролитической активности изучаемого фермента в концентрациях до 100 мкМ включительно свидетельствует о непосредственном участии H^+ -пирофосфатазы в защите растительной клетки от токсического действия Pb^{2+} . Однако последующее повышение концентрации металла подавляло гидролитическую активность H^+ -пирофосфатазы, что, возможно, связано с непосредственным влиянием ионов Pb на каталитическую часть фермента. Как известно, Pb^{2+} могут связываться с SH-группами белков, которые необходимы для реакционного центра ферментов и стабилизации их третичной структуры [31], приводя, таким образом, к блокированию активности фермента и нарушению конформации белка. Это препятствует связыванию с субстратом, что мешает переходу фермента к стадии гидролиза субстрата. Кроме того, можно предположить, что Pb^{2+} способны замещать Mg^{2+} в структуре фермента, которые выступают в роли посредников при взаимодействии субстрата с аминокислотными остатками (Асп или Асн) [32], что также оказывает влияние на гидролиз субстрата.

Согласно одной из теорий, во время ферментативной реакции гидролиз пирофосфата и активная транслокация протонов механически

связаны. Как известно, остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот в ТМ6 (трансмембранной спирали) участвуют в принятии, перемещении и высвобождении протонов. Остатки лизина в ТМ16 выталкивают протоны, захваченные глутаматным остатком ТМ6, в просвет вакуоли, что сопровождается небольшим сдвигом ТМ16 [33]. Выявленное нарушение процесса гидролиза субстрата в присутствии высоких концентраций ионов Pb может приводить к снижению транспортной активности H⁺-пирофосфатазы.

В результате мы показали, что действие Pb²⁺ на гидролиз субстрата зависит от его концентрации в инкубационной среде, однако такая зависимость не подтверждалась для транспорта H⁺ в везикулы тонопласта.

Анализ полученных данных по изучению транспортной активности H⁺-пирофосфатазы в присутствии Pb²⁺ показал иной характер воздействия (рис. 4). При использовании низких концентраций металла (0.1 мкМ) происходило пирофосфат-зависимое усиление транспорта H⁺. Совместно с увеличением гидролиза субстрата эти результаты указывают на то, что H⁺-пирофосфатаза задействована в процессах транспорта Pb²⁺ в вакуоль. Последующее повышение концентрации Pb²⁺ в инкубационной среде до 100 мкМ не оказывало стимулирующего действия на активность пирофосфат-зависимого фермента. Наблюдалось некоторое разобщение в уровнях гидролитической и транспортной активности, что может являться одним из механизмов регуляции активности H⁺-пирофосфатазы. Разный характер действия ТМ на гидролитическую и транспортную функцию H⁺-пирофосфатазы прослеживается и в работах других исследователей [8]. Авторы показали, что Zn²⁺ и Ni²⁺ в концентрации 100 мкМ не оказывают существенного влияния на гидролитическую активность вакуолярной H⁺-пирофосфатазы корней огурца, однако влияют на транспортную активность фермента снижая пирофосфат-зависимый перенос протонов на 30–40%.

Интересно отметить, что в присутствии 1 мМ Pb²⁺ происходило значимое повышение транспортной активности H⁺-пирофосфатазы, в то время как гидролиз субстрата был снижен. Наблюдаемый эффект может быть связан с перестройкой в структуре вакуолярной мембраны, приводя к изменению в липидном окружении фермента, которое было вызвано ПОЛ инициированное Pb²⁺. Таким образом, это позволяет H⁺-пирофосфатазе обеспечивать поддержание электрохимического градиента, необходимого для работы белков переносчиков, изолирующих высокие концентрации Pb²⁺ в вакуоль. Концентрации свыше 1 мМ приводили к снижению как гидролиза субстрата, так и транспорта H⁺ внутрь везикул тонопласта, вызванные, по-видимому,

необратимыми изменениями в ответ на стрессовое воздействие Pb²⁺.

Как было показано ранее, по сравнению с действием Pb²⁺, ионы Cd не оказывали какого-либо существенного действия на вакуолярную H⁺-пирофосфатазу [34]. Тот факт, что H⁺-пирофосфатаза тонопласта неодинаково реагирует на действие этих ТМ, свидетельствует о разном уровне чувствительности этого фермента в зависимости от применяемого металла и его концентрации.

Как известно, в ответ на стрессовое воздействие, вызванное ТМ, происходят изменения в составе мембранных липидов [2, 22], которые могут оказывать косвенное действие на работу H⁺-пирофосфатазы. ЖК составляют основную часть липидов. Многими исследователями были показаны различия в составе ЖК у разных видов растений в зависимости от изучаемого металла [34, 35]. Для того, чтобы оценить изменения в липидной составляющей вакуолярной мембраны в ответ на стрессовое воздействие Pb²⁺, было проведено изучение состава ЖК. Анализ полученных данных показал, что в присутствии 1 мМ Pb²⁺ происходила перестройка липидов вакуолярной мембраны за счет изменения качественного и количественного состава ЖК. Как известно, в условиях абиотического стресса происходит активация ферментов, участвующих в мобилизации ненасыщенных ЖК для ремоделирования липидов клеточных мембран. Ремоделирование глицеролипид-ацилов — это процесс, при котором одна или обе ЖК заменяются, образуя промежуточный продукт — лизофосфолипид. Последние, в свою очередь, могут быть реацилированы лизофосфолипидацил-трансферазами с образованием фосфолипидов с различными ЖК. Это процесс играет важную роль в удалении окисленных или поврежденных ацильных цепей, секвестрации цитотоксических ЖК и высвобождении сигнальных липидов, а также в реакциях на стресс [36].

В результате, согласно нашим данным, отмечалась тенденция к увеличению насыщенности жирнокислотного состава, что может приводить к увеличению жесткости вакуолярной мембраны. Такие изменения, вероятно, необходимы для поддержания физико-химических свойств мембраны, что может выступать в роли механизма адаптации на стрессовые условия, вызванные Pb²⁺. Изменения в составе ЖК в ответ на действие Pb²⁺, приводящие к увеличению степени насыщенности, были отмечены и другими исследователями [2–4]. Такое же повышение насыщенности ЖК прослеживалось и при действии Cd²⁺ и Ni²⁺ [37, 38].

Несмотря на то, что общее содержание насыщенных ЖК повышалось, в составе отдельных ЖК было отмечено увеличение

содержание ненасыщенной олеиновой (C18:1(n-9)) ЖК. Известно, что олеиновая кислота, как и другие ненасыщенные C:18 ЖК, принимает непосредственное участие в механизмах защиты от стресса. Эти механизмы связаны с обеспечением поддержания надлежащей текучести мембран, необходимой для множества мембранозависимых процессов, таких как передача Ca^{2+} сигнала, прямое модулирование активности мембаносвязанных белков и т.д. [39].

Ремоделирование состава ненасыщенных C:18 ЖК происходит за счет работы десатуразы, которая катализирует реакции десатурации, встраивая двойные связи в жирную ацильную цепь. Образованные таким образом ненасыщенные ЖК играют жизненно важную роль в синтезе полиненасыщенных ЖК [40]. Анализ стеароил- (SDR), олеоил- (ODR) и линолеил- (LDR) десатуразных отношений позволил провести косвенную оценку активности десатураз ЖК. Согласно нашим данным, было отмечено значимое снижение ODR в присутствии 1 мМ Pb^{2+} , что говорит о снижении активности $\omega 6$ -десатуразы. Этот факт согласуется с увеличением содержания олеиновой кислоты. Значимых изменений в показателях SDR и LDR не было отмечено показывая, таким образом, что активность $\omega 9$ - и $\omega 3$ -десатураз оставалась на уровне контроля. Вероятно, процесс ремоделирования липидов вакуолярной мембраны, в данном случае, идет по другому пути, без участия $\omega 3$ -, $\omega 6$ -, $\omega 9$ - десатураз.

Кроме того, интересно отметить, что некоторые ЖК (табл. 1) были обнаружены только в ответ на действие Pb^{2+} , что может выступать в роли одного из защитных механизмов вакуолярной мембраны к стрессу, вызванному металлом. Подобные изменения, но в составе ЖК общих липидов *Arabidopsis lyrata* были отмечены в ответ на действие Ni^{2+} и Zn^{2+} [35].

В случае применения 2 мМ Pb^{2+} достаточно значимых отличий в сторону увеличения насыщенности или ненасыщенности ЖК не происходило, показатели $\Sigma\text{НЖК}$, $\Sigma\text{ННЖК}$ и ИДС оставались на уровне контроля. В связи с этим можно предположить, что применяемая концентрация достаточно высока и вакуолярная мембрана не в состоянии справиться с выработкой защитных механизмов в ответ на действие стрессового фактора. По-видимому, Pb^{2+} в этом случае могли оказывать влияние на работу мембраносвязанных ферментов, участвующих в ремоделировании жирнокислотного состава.

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что Pb^{2+} в концентрации 1 мМ и 2 мМ вызывают изменения структуры клеточных мембран корнеплодов столовой свеклы, приводя к увеличению их проницаемости и ПОЛ. Вакуолярная H^+ -пиро-

фосфатаза принимает активное участие в защите растительной клетки от стресса, вызванного действием Pb^{2+} в концентрации от 0.1 до 100 мкМ. На уровне вакуолярной мембраны в ответ на действие 1 мМ Pb^{2+} происходит перестройка жирнокислотного состава общих липидов. Выявленные изменения могут выступать в роли механизма адаптации тонопласта в ответ на токсичное воздействие Pb^{2+} .

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-26-00208 (<https://rscf.ru/project/23-26-00208/>) на оборудовании Центра коллективного пользования “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (г. Иркутск).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тутов А.Ф., Казнина Н.М., Каранетян Т.А., Доршакова Н.В. Влияние свинца на живые организмы // Журнал общей биологии. 2020. Т. 81. С. 147. <https://doi.org/10.31857/S0044459620020086>
2. Kobylńska A, Bernat P, Posmyk M.M. Melatonin mitigates lead-induced oxidative stress and modifies phospholipid profile in tobacco BY-2 suspension cells // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 5064. <https://doi.org/10.3390/ijms25105064>
3. Ejaz U., Khan S.M., Khalid N., Ahmad Z., Jehangir S., Rizvi Z.F., Lho L.H., Han H., Raposo A. Detoxifying the heavy metals: a multipronged study of tolerance strategies against heavy metals toxicity in plants // Front. Plant Sci. 2023. V. 14. P. 1154571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1154571>
4. Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001. V. 52. P. 469. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.469>
5. Segami S., Asaoka M., Kinoshita S., Fukuda M., Nakanishi Y., Maeshima M. Biochemical, structural and physiological characteristics of vacuolar H^+ -pyrophosphatase // Plant Cell Physiol. 2018. V. 59. P. 1300. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy054>
6. Gaxiola R.A., Palmgren M.G., Schumacher K. Plant proton pumps // FEBS Lett. 2007. V. 581. P. 2204. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.050>
7. Gutiérrez-Luna F.M., Hernandez-Dominguez E.E., Gabriela Valencia-Turcotte L.G., Rodríguez-Sotres R. Pyrophosphate and pyrophosphatases in plants, their involvement in stress responses and their possible relationship to secondary metabolism // Plant Sci. 2018. V. 267. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.10.016>

8. Kabała K., Janicka-Russak M., Ankiewicz A. Differential regulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-PPase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel // Plant Sci. 2011. V. 180. P. 531. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.013>
9. Kabała K., Janicka-Russak M., Ankiewicz A. Mechanism of Cd and Cu action on the tonoplast proton pumps in cucumber roots // Physiol. Plant. 2013. V. 147. P. 207. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01655.x>
10. Gouiaa S., Khoudi H. Expression of V-PPase proton pump, singly or in combination with a NHX1 transporter, in transgenic tobacco improves copper tolerance and accumulation // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 37037. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06852-x>
11. Cao F., Dai H., Hao P.F., Wu F. Silicon regulates the expression of vacuolar H⁺-pyrophosphatase 1 and decreases cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) // Chemosphere. 2020. V. 240. P. 124907. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124907>
12. Грищенко Н.Н., Лукаткин А.С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. Т. 1. С. 3.
13. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: Наука, 1972. 252 с.
14. Салеев Р.К., Кузеванов В.Я., Хантагаев С.Б., Копытчук В.Н. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений // Физиология растений. 1981. Т. 28. С. 1295.
15. Bredford D.P. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
16. Скулачев В.П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Москва: Наука, 1962. 153 с.
17. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Озолина Н.В., Салеев Р.К. Влияние цАМФ, жасмоновой и салициловой кислот на протонные помпы тонопласта // Доклады Академии наук. 2006. Т. 48. С. 411.
18. Folch J., Sloan Stanley G.H., Lees M. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497.
19. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // Advances in Lipid Methodology. 1993. V. 2. P. 69.
20. Nokhsorov V.V., Dudareva L.V., Petrov K.A. Seasonal dynamics of lipids and their fatty acids in leaf buds of *Betula pendula* Roth and *Alnus alnobetula* subsp. *fruticosa* (Rupr.) Raus under conditions of the cryolithozone // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 545. <https://doi.org/10.31857/S0015330320030185>
21. Лось Д.А. Восприятие стрессовых сигналов биологическими мембранами // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / Под ред. А.Б. Рубина. М.-Ижевск: НИЦ “Регуляторная и хаотичная динамика”, Институт компьютерных исследований, 2007. 329 с.
22. Devi S.R., Prasad M.N.V. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants // Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems / Eds. M.N.V. Prasad, J. Hagemeyer. Springer. 1999. P. 99. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07743-6_5
23. Wierzbicka M., Przedpeńska E., Ruzik R., Ouerdane L., Połec-Pawlak K., Jarosz M., Szpunar J., Szakiel A. Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells // Protoplasma. 2007. V. 231. P. 99. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0227-6>
24. Ivanov V.B., Bystrova E.I., Seregin I.V. Comparative impacts of heavy metals on root growth as related to their specificity and selectivity // Russ. J. Plant Physiol. 2003. V. 50. P. 398. <https://doi.org/10.1023/A:1023838707715>
25. Валиев Р.Ш., Ольшанская Л.Н. Некоторые физиологические аспекты фитоэкстракции тяжелых металлов // Химия и химическая технология. 2016. Т. 59. С. 30.
26. Опритов В.А., Пятагин С.С., Ревитин В.Г. Биоэлектrogenез у высших растений. Москва: Наука, 1991. 216 с.
27. Zhang Y., Song Z., Zhao H., Chen H., Zhao B. Integrative physiological, transcriptomic and metabolomic analysis reveals how the roots of two ornamental *Hydrangea macrophylla* cultivars cope with lead (Pb) toxicity // Sci. Total Environ. 2024. V. 910 P. 168615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168615>
28. Лукаткин А.С., Старкина М.И. Влияние тидиазурина на устойчивость проростков огурца к стрессовым факторам // Агрохимия. 2011. Т. 10. С. 31.
29. Munns R., Day D.A., Fricke W., Watt M., Arsova B., Barkla B.J., Bose J., Byrt C.S., Chen Z.H., Foster K.J., Gilliam M., Henderson S.W., Jenkins C.L.D., Kronzucker H.J., Miklavcic S.J. et al. Energy costs of salt tolerance in crop plants // New Phytol. 2020. V. 225. P. 1072. <https://doi.org/10.1111/nph.15864>
30. Ros R. Morales A., Segura J., Picazo I. In vivo and in vitro effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots // Plant Sci. 1992. V. 83. P. 1. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90055-Q](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90055-Q)
31. Seregin I.V., Ivanov V.B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants // Russ. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 523. <https://doi.org/10.1023/A:1016719901147>
32. Gordon-Weeks R., Steele S.H., Leigh R.A. The role of magnesium, pyrophosphate and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H⁺-pumping inorganic pyrophosphatase (studies using ligand protection from covalent inhibitors) // Plant Physiol. 1996. V. 111. P. 195. <https://doi.org/10.1104/pp.111.1.195>
33. Li K.M., Wilkinson C., Kellosalo J., Tsai J.Y., Kajander T., Jeuken L.J.C., Sun Y.J., Goldman A. Membrane pyrophosphatases from *Thermotoga maritima* and *Vigna radiata* suggest a conserved

- coupling mechanism // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 13596. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy054>
34. Spiridonova E.V., Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Gurina V.V., Nurminsky V.N., Donskaya L.I., Tretyakova A.V. Effect of cadmium on the roots of beetroot (*Beta vulgaris* L.) // Int. J. Phytoremediation. 2019. V. 21. P. 980. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1583722>
35. Seregin I., Ivanova T., Voronkov A.S., Kozhevnikova A.D., Schat H. Zinc- and nickel-induced changes in fatty acid profiles in the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and non-accumulator *Arabidopsis lyrata* // Plant Physiol. Biochem. 2023. V. 197. P. 107640. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107640>
36. Yu L., Zhou C., Fan J., Shanklin J., Xu C. Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants // Plant J. 2021. V. 107. P. 37. <https://doi.org/10.1111/tpj.15273>
37. Popova L.P., Maslennikova L.T., Yordanova R.Y., Ivanova, A.P., Krantev A.P., Szalai G., Janda T. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings // Plant Physiol. Biochem. 2009. V. 47. P. 224. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.11.007>
38. Gajewska E., Bernat P., Długoński J., Skłodowska M. Effect of nickel on membrane integrity, lipid peroxidation and fatty acid composition in wheat seedlings // J. Agron. Crop Sci. 2012. V. 198. P. 286. <https://doi.org/10.1111/J.1439-037X.2012.00514.X>
39. He M., Ding N.Z. Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 562785. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.562785>
40. Halim N.F.A.A., Ali M.S.M., Leow A.T.C., Rahman R.N.Z.R.A. Membrane fatty acid desaturase: biosynthesis, mechanism, and architecture // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 106. P. 5957. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12142-3>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ СЕМЯН САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА РОСТ, АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ УРОВНЕ ЦИНКА ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

© 2024 г. А. А. Игнатенко^{а, *}, И. А. Нилова^а, Н. М. Казнина^а, А. Ф. Титов^а

^аИнститут биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”,
Петрозаводск, Россия

*e-mail: angelina911@ya.ru

Поступила в редакцию 23.05.2024 г.

После доработки 31.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Исследовали влияние обработки семян салициловой кислотой (СК, 100 мкМ) на прорастание семян, рост, уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и функционирование ряда компонентов антиоксидантной системы у растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Злата, выращиваемых при оптимальном (2 мкМ) или избыточном (1500 мкМ) содержании цинка в корнеобитаемой среде. Показано, что избыток цинка оказывает ингибирующее действие на рост корня и побега, а также усиливает накопление одного из индикаторов развития ПОЛ — малонового диальдегида (МДА). При этом структурная целостность мембран сохранялась, на что указывает отсутствие изменения проницаемости мембран, регистрируемое по выходу электролитов. Активность антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) — в этих условиях не изменялась, а активность гваякол-специфичной пероксидазы (ГвПО) снижалась. Обработка семян СК в концентрации 100 мкМ, стимулирующей их прорастание, усиливала отрицательное воздействие избытка цинка в отношении показателей роста и накопления МДА в листьях пшеницы. Однако и в этом случае выход электролитов не увеличивался, что, предположительно, связано с возрастанием активности СОД и ГвПО. На основании представленных в работе и полученных ранее данных, а также анализа литературы, сделан вывод, что реакция растений на избыток цинка во внешней среде, подобно реакции на другие абиотические стрессы, является не только многокомпонентной и многофакторной, но и вариативной, зависящей от многих факторов и обстоятельств — дозы воздействия (концентрации цинка и продолжительности его действия), биологических особенностей вида (сорта) растений, их возрастного состояния и т.д. Обработка семян СК может изменять характер реакции растений на действие избытка цинка, при этом направленность этих изменений будет, в свою очередь, зависеть от концентрации СК, продолжительности ее действия и способа обработки.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., антиоксидантные ферменты, избыток цинка, обработка семян, пролин, рост, салициловая кислота, тяжелые металлы

DOI: 10.31857/S0015330324060085, EDN: MANDHZ

ВВЕДЕНИЕ

Цинк является одним из наиболее важных микроэлементов для роста и развития растений. Он входит в структуру или является кофактором большого числа ферментов, участвует в белковом, углеводном и липидном обмене, метаболизме ДНК и РНК, синтезе хлорофиллов и фитогормонов [1, 2]. Помимо этого, цинк

необходим для поддержания целостности клеточных мембран, он может выступать в роли вторичного мессенджера, а также влиять на активность и фолдинг белков [3–5]. Однако в высоких концентрациях, которые достаточно часто возникают во внешней среде в результате антропогенной деятельности, он токсичен для растений. Известно, в частности, что избыток цинка оказывает отрицательное воздействие на ростовые процессы, фотосинтетическую активность, водный обмен и минеральное питание растений, что в конечном итоге снижает их про-

Сокращения: ГвПО — гваякол-специфичная пероксидаза; КАТ — каталаза; СК — салициловая кислота; СОД — супероксиддисмутаза; ТБК — тиобарбитуровая кислота.

дуктивность [5–8]. Поэтому важной и актуальной задачей является поиск способов повышения устойчивости растений к действию высоких концентраций цинка во внешней среде. Особую актуальность подобные исследования приобретают в отношении ведущих сельскохозяйственных культур, к которым относится пшеница, чьи посевные площади только в России по данным Росстата [9] составили в 2023 г. более 29 млн га.

К числу наиболее эффективных и экологически безопасных способов повышения устойчивости растений к действию тяжелых металлов относят обработку семян или побегов фитогормонами [10]. Согласно данным, имеющимся в литературе, экзогенное применение фитогормонов индуцирует запуск широкого спектра физиологических, биохимических и молекулярных реакций, которые обеспечивают не только выживание растений, но и их способность успешно произрастать в условиях действия достаточно высоких концентраций тяжелых металлов [10]. С этой точки зрения особый интерес представляет многофункциональное соединение фенольной природы – салициловая кислота (СК). Ее роль в регуляции различных физиологических процессов, таких как прорастание семян, вегетативный рост, движение устьиц, цветение, фотосинтез, термогенез, а также реакции растений на действие стресс-факторов, хорошо известна [6, 11, 12]. Отмечено, что одним из первых стресс-факторов абиотической природы, в отношении которого была установлена защитная роль СК, были тяжелые металлы [12]. В частности, получены данные, указывающие на участие СК в повышении устойчивости растений к действию кадмия, меди, свинца, ртути, никеля, хрома и цинка [7, 8, 10, 12–14]. В отношении цинка показана эффективность применения СК с целью снижения его отрицательного влияния на прорастание семян [2], рост растений и биосинтез хлорофилла [6, 13, 14], ее положительное влияние на активность антиоксидантных ферментов [15], экспрессию кодирующих их генов [8], содержание глутатиона [15], сахаров [8], крахмала [16], элементов минерального питания [6] и баланс других фитогормонов [2]. Кроме того, выявлены заметные различия по степени накопления цинка в корнях и побегах растений, которые обрабатывались или не обрабатывались СК [2, 6, 8, 16].

Как известно, важную роль в неспецифических защитных реакциях растений на действие тяжелых металлов, включая цинк, играет активизация компонентов антиоксидантной системы. В единичных работах имеются сведения о влиянии СК на окислительно-восстановительный баланс в клетках, что вносит существенный вклад в формирование устойчивости растений к действию высоких концентраций цинка [7, 8,

15, 16]. Защитную роль СК, прежде всего, связывают с ее способностью снижать содержание активных форм кислорода (АФК) и соединений, образующихся в результате реакций окисления липидов [7, 8], в том числе за счет повышения уровня низкомолекулярных протекторных соединений и активности антиоксидантных ферментов [15, 16]. Высказано также предположение, что СК может поддерживать активность антиоксидантных ферментов на более высоком уровне, препятствуя возможному связыванию ионов цинка с активными центрами некоторых ферментов, например, с активным центром Cu , Zn -супероксиддисмутазы [7].

Цель работы – изучение влияния обработки семян СК на растения пшеницы, подвергнутые воздействию избытка цинка в корнеобитаемой среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) ярового сорта Злата, семена которой были предоставлены ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”. После стерилизации 5% гипохлоритом натрия их проращивали в чашках Петри в темноте в течение 3 сут. При этом одну часть семян проращивали на дистиллированной воде (вариант “СК 0”), а другую – в течение 1 сут. выдерживали на растворе СК, затем отмывали от него и продолжали проращивать на дистиллированной воде (вариант “СК 100”). Проклюнувшиеся семена высаживали в пластиковые контейнеры (1.4 л), содержащие питательный раствор Хогланда-Арнона с оптимальным (2 мкМ, pH 5.7) или избыточным (1500 мкМ, pH 5.7) содержанием цинка – варианты “Zn 2” и “Zn 1500”, соответственно. Цинк вносили в форме его сернокислой соли ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Растения выращивали в течение 11 сут. в камере искусственного климата при температуре воздуха 22°C, относительной влажности 60–70%, ФАР 180 мкмоль/(м²·с) и фотопериоде 14 ч. Все измерения проводили на втором листе.

Оптимальная концентрация СК (100 мкМ) была подобрана на основании специальных опытов, в которых семена пшеницы замачивали на 24 ч в растворах СК с разной концентрацией (от 1 до 700 мкМ). После этого семена отмывали от СК и продолжали проращивать на дистиллированной воде. О реакции растений на СК судили по энергии прорастания и всхожести от начала проращивания согласно [17], а также по изменению линейных размеров корня, его сырой и сухой биомассы. Концентрация цинка (1500 мкМ) выбрана на основании предварительных опытов, позволивших рассматривать ее в качестве сублетальной для растений пшеницы.

Энергию прорастания и всхожесть семян определяли согласно [17], подсчитывая количество нормально проросших и всхожих семян на 3 и 7 сут. от начала проращивания, соответственно. Показатели энергии прорастания и всхожести семян рассчитывали в процентах к общему числу высеванных семян.

Линейные размеры корней и побегов измеряли общепринятым способом. Площадь листа определяли по формуле:

$$S = 2/3 \times l \times d, \text{ где:}$$

l — длина листовой пластинки;

d — ширина листовой пластинки [18].

Проницаемость мембран клеток определяли по выходу электролитов из высечек листьев с использованием кондуктометрического метода [19]. Для этого растительный материал (300 мг) тщательно промывали в дистиллированной воде для удаления клеточного сока со срезов, высушивали с помощью фильтровальной бумаги и помещали в колбы с 30 мл дистиллированной воды. Колбы ставили на шейкер S-4, SkyLine (“ELMI”, Латвия) на 4 ч и затем оценивали выход электролитов по изменению электропроводности с использованием кондуктометра (“HANNA”, Италия). После этого колбы инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 20 мин, затем быстро охлаждали, доводили объем в колбах до исходной величины и помещали их на шейкер на 20 мин. Полный выход электролитов определяли по электропроводности вытяжки после разрушения мембран кипячением. Результирующий выход электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода, при этом из полученных значений вычитали электропроводность дистиллированной воды.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Растительный материал (100 мг) гомогенизировали в 2 мл 20% охлажденного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), помещали в холодильник на 10 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g и температуре 4°C. Из полученного гомогената отбирали 700 мкл с помощью дозатора (“Экрос-Аналитика”, Россия), добавляли к ним 1300 мкл 0.5% ТБК в 20% ТХУ и 50 мкл 2% тритона X-100. Использовали дополнительный контроль (без ТБК), в который вместо смеси 0.5% ТБК в 20% ТХУ добавляли 1300 мкл 20% ТХУ. Реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 30 мин, затем быстро охлаждали и центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g и температуре 4°C. Оптическую плотность супернатанта измеряли с помощью спектрофотометра (“Спектр”,

Россия) при 532, 600 и 440 нм. Содержание МДА рассчитывали по формуле [20], используя коэффициент экстинкции, равный 155 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) и гваякол-специфичной пероксидазы (ГвПО, 1.11.1.7) растительный материал (100 мг) гомогенизировали в 2 мл буфера (pH 7.5), который включал 50 мМ HEPES, 5 мМ MgCl_2 , 0.4 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF, 1% PVP, 10% глицерол. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 14000 g и температуре 4°C. Полученный супернатант использовали для определения активности ферментов и содержания белка с помощью спектрофотометра СФ-2000 (“Спектр”, Россия). Общую активность СОД определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия до формазана согласно методу [21] с модификацией [22]. Оптическую плотность раствора измеряли при 560 нм. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению пероксида водорода при 240 нм [23]. Активность ГвПО оценивали по увеличению оптической плотности при 470 нм в результате окисления гваякола в присутствии пероксида водорода [24]. Общее содержание белка анализировали согласно [25], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Содержание свободного пролина анализировали методом Бейтса с соавт. [26]. Растительный материал (500 мг) гомогенизировали в 10 мл 3% сульфосалициловой кислоты, затем центрифугировали в течение 10 мин при 5100 g и температуре 4°C. К 2 мл супернатанта добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл нингидринового реактива. Для приготовления последнего смешивали нингидрин, 6М ортофосфорную кислоту и ледяную уксусную кислоту. Полученную смесь инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 60 мин, затем быстро охлаждали и определяли оптическую плотность с помощью спектрофотометра (“Спектр”, Россия) при 520 нм. Содержание пролина определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор химически чистого L-пролина (“Вектон”, Россия).

В работе представлены средние значения по трем независимым опытам и их стандартные ошибки. В каждом опыте ростовые показатели изучали на выборке, представленной 12 растениями. При изучении биохимических показателей биологическая повторность, представляющая собой смешанную пробу 2–3 растений, была 3–5-кратная, аналитическая — 3-кратная. Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методами с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимыми считали различия при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация СК (100 мкМ), использованная нами в основной части исследования, была выбрана на основании серии специальных опытов, которые показали, что в концентрациях от 1 до 700 мкМ она не оказывает ощутимого влияния на всхожесть и энергию прорастания семян пшеницы (табл. 1). Что касается роста корней, то СК в концентрациях 1–100 мкМ или не влияла на их рост, или слегка стимулировала этот процесс, а ее более высокие концентрации оказывали на него небольшое ингибирующее воздействие (табл. 1).

В следующей серии опытов было изучено влияние цинка в концентрации 1500 мкМ на ряд физиологических и биохимических показателей у растений пшеницы, а также оценен эффект обработки семян СК на ответную реакцию растений на избыток цинка. Опыты показали, что у растений пшеницы, семена которых не подвергались обработке СК (СК 0), избыток цинка вызывал значительное торможение роста. В частности, длина корня, размер побега и площадь листа у растений в этом варианте

опыта (Zn 1500) были, соответственно, на 40, 32 и 48% меньше, чем в варианте с оптимальным содержанием цинка (Zn 2) (табл. 2). У растений, семена которых предварительно обрабатывались СК (СК 100), в условиях оптимального минерального питания не отмечено значимых изменений изученных ростовых показателей по сравнению с вариантом СК 0, тогда как в варианте с избыточным содержанием цинка обработка СК несколько усиливала отрицательный эффект данного металла на рост корней и побегов (табл. 2).

Важно отметить, что независимо от концентрации цинка в корнеобитаемой среде (Zn 2 или Zn 1500), в вариантах с обработкой семян СК или без нее нарушения проницаемости клеточных мембран в листьях растений не происходило, о чем свидетельствуют данные о выходе электролитов (рис. 1а). Тем не менее под влиянием избытка цинка в листьях растений возрастало содержание МДА как в варианте без обработки СК (СК 0), так и после обработки ею семян (СК 100), причем во втором случае в большей степени (рис. 1б).

Таблица 1. Влияние разных концентраций СК на энергию прорастания, всхожесть семян, размер корня и его биомассу у растений пшеницы в оптимальных условиях роста

Концентрация СК, мкМ	Энергия прорастания, %	Всхожесть семян, %	Длина корня, см		Биомасса корня, мг	
			3 сут.	7 сут.	сырая	сухая
0 (без СК)	92 ± 0.85 ^a	92 ± 1.44 ^a	5.68 ± 0.06 ^b	13.97 ± 0.30 ^b	57.57 ± 2.93 ^{bc}	5.92 ± 0.32 ^{bc}
1	93 ± 1.35 ^{ab}	95 ± 1.49 ^a	5.80 ± 0.05 ^b	14.16 ± 0.29 ^{ab}	63.43 ± 2.81 ^{ab}	6.35 ± 0.36 ^{ab}
10	95 ± 1.04 ^{ab}	94 ± 1.03 ^a	5.98 ± 0.05 ^a	14.79 ± 0.28 ^a	67.36 ± 2.90 ^a	6.89 ± 0.31 ^a
100	96 ± 0.87 ^b	94 ± 0.63 ^a	6.06 ± 0.06 ^a	14.65 ± 0.29 ^{ab}	66.43 ± 3.12 ^a	6.57 ± 0.39 ^{ab}
300	95 ± 1.44 ^{ab}	94 ± 1.19 ^a	5.65 ± 0.06 ^b	14.03 ± 0.29 ^{ab}	57.96 ± 2.71 ^{bc}	5.49 ± 0.28 ^{cd}
500	96 ± 1.58 ^{ab}	94 ± 1.49 ^a	5.46 ± 0.06 ^c	13.88 ± 0.27 ^b	51.23 ± 2.47 ^c	4.46 ± 0.25 ^d
700	93 ± 0.75 ^{ab}	92 ± 1.03 ^a	5.06 ± 0.06 ^d	13.62 ± 0.26 ^b	51.14 ± 2.53 ^c	4.64 ± 0.35 ^d

Примечание: разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между вариантами, в которых использовались разные концентрации СК, при $P \leq 0.05$. На третьи сутки оценивали энергию прорастания и измеряли длину корня, на седьмые сутки — всхожесть семян, длину корня, его сырую и сухую биомассу.

Таблица 2. Размеры корня и побега у растений пшеницы, выращенных из необработанных и обработанных СК семян, при оптимальном или избыточном содержании цинка в корнеобитаемой среде

Показатель	Zn 2		Zn 1500	
	СК 0	СК 100	СК 0	СК 100
Длина корня, см	13.53 ± 0.25 ^a	14.00 ± 0.30 ^a	8.13 ± 0.24 ^b	6.36 ± 0.13 ^c
Высота побега, см	32.30 ± 0.57 ^a	32.27 ± 0.55 ^a	21.87 ± 0.62 ^b	19.30 ± 0.43 ^c
Площадь второго листа, см ²	7.92 ± 0.26 ^a	7.67 ± 0.21 ^a	4.10 ± 0.23 ^b	3.21 ± 0.18 ^c

Примечание: Zn 2 — растения выращивали при оптимальном содержании цинка (2 мкМ); Zn 1500 — растения выращивали при избыточном содержании цинка (1500 мкМ); СК 0 — семена не обрабатывались раствором СК; СК 100 — семена в течение 1 сут. обрабатывались раствором СК (100 мкМ). Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними величинами при $P \leq 0.05$.

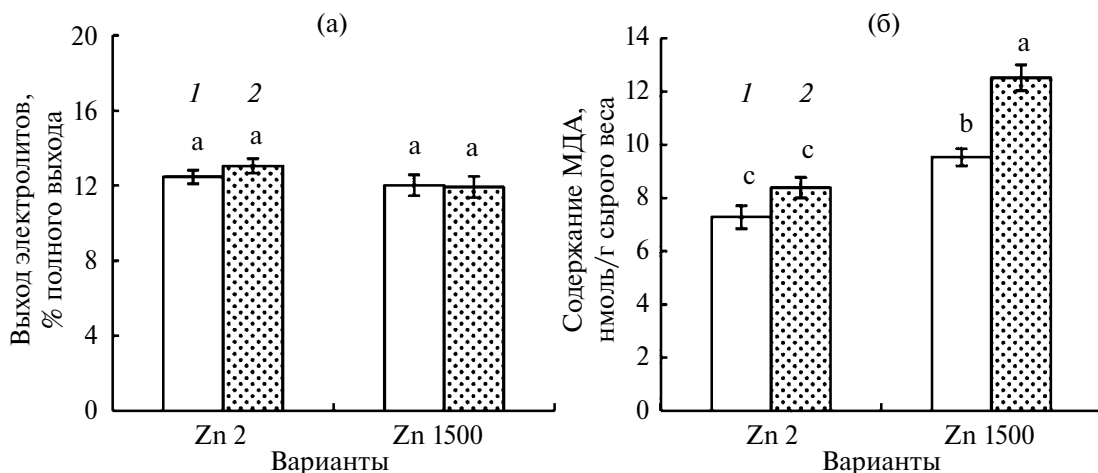


Рис. 1. Выход электролитов (а) и содержание МДА (б) у растений пшеницы, выращенных из необработанных и обработанных СК семян, при оптимальном или избыточном содержании цинка в корнеобитаемой среде. Zn 2 – растения выращивали при оптимальном содержании цинка (2 мкМ); Zn 1500 – растения выращивали при избыточном содержании цинка (1500 мкМ); 1 – семена не обрабатывались раствором СК; 2 – семена в течение 1 сут. обрабатывались раствором СК (100 мкМ). Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними величинами при $P \leq 0.05$.

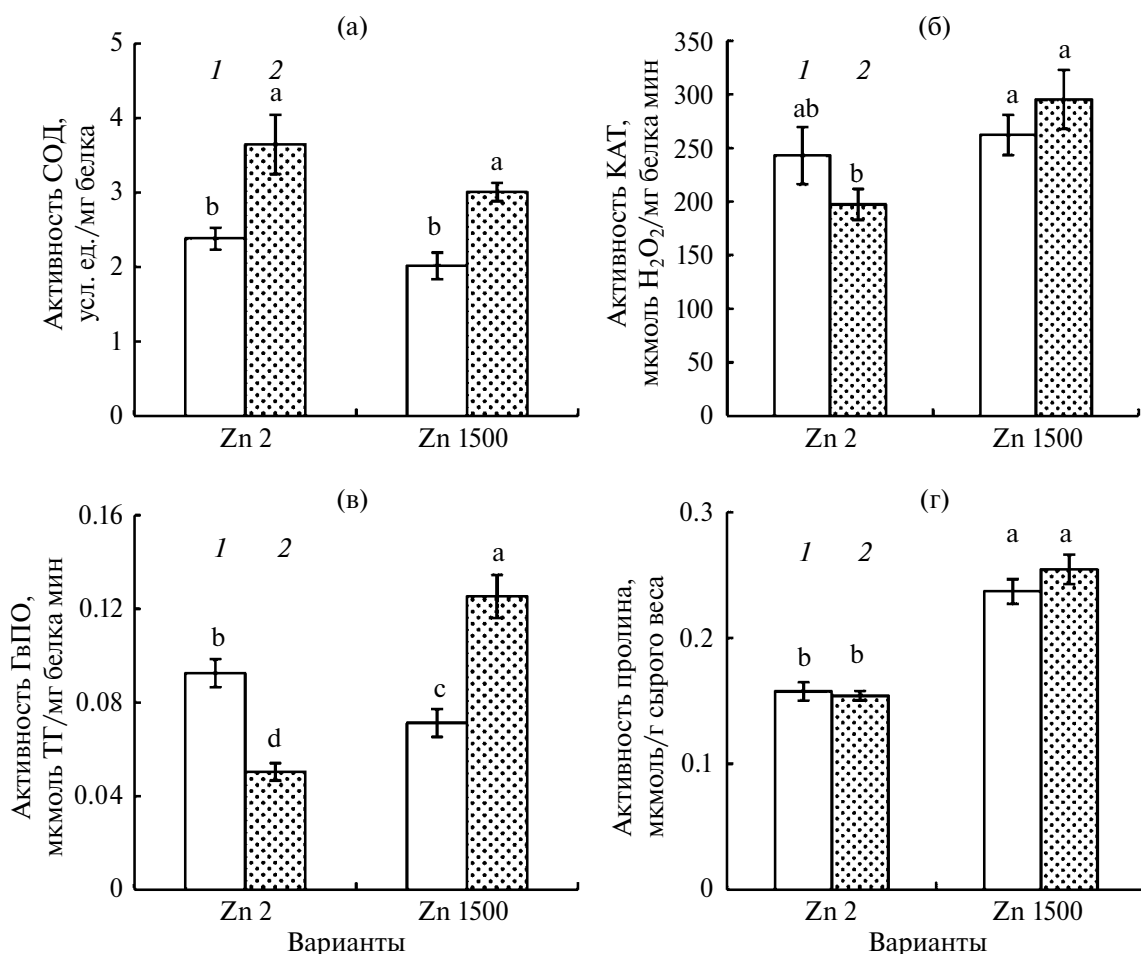


Рис. 2. Активность СОД (а), КАТ (б), ГвПО (в) и содержание пролина (г) у растений пшеницы, выращенных из необработанных и обработанных СК семян, при оптимальном или избыточном содержании цинка в корнеобитаемой среде. Zn 2 – растения выращивали при оптимальном содержании цинка (2 мкМ); Zn 1500 – растения выращивали при избыточном содержании цинка (1500 мкМ); 1 – семена не обрабатывались раствором СК; 2 – семена в течение 1 сут. обрабатывались раствором СК (100 мкМ); ТГ – тетрагваякол. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между средними величинами при $P \leq 0.05$.

Анализ активности антиоксидантных ферментов показал, что под влиянием избытка цинка (Zn 1500) у растений, семена которых не подвергались обработке СК, активность СОД (рис. 2а) и КАТ (рис. 2б) в листьях сохранялась на уровне растений, выращиваемых при оптимальном содержании цинка (Zn 2), а активность ГвПО (рис. 2в) оказалась ниже в 1.3 раза по сравнению с таковой в варианте Zn 2. После обработки семян СК (СК 100) у растений в оптимальных условиях минерального питания (Zn 2) активность СОД (рис. 2а) возрастала в 1.5 раза, активность ГвПО (рис. 2в), наоборот, снижалась в 1.8 раза по сравнению с вариантом без обработки СК, а активность КАТ (рис. 2б) не изменялась. В варианте с избытком цинка обработка семян СК также приводила к увеличению в листьях растений активности СОД в 1.5 раза (рис. 2а) и ГвПО – в 1.8 раза по сравнению с вариантом без обработки (рис. 2в) при отсутствии изменений в активности КАТ (рис. 2б).

Наряду с антиоксидантными ферментами в защите клеток от окислительного стресса активно участвуют неферментные компоненты, такие как пролин. В наших опытах под влиянием избытка цинка (Zn 1500) его содержание в листьях пшеницы заметно возрастало (в 1.5 раза по сравнению с вариантом Zn 2), причем как после обработки семян СК, так и без нее (рис. 2г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение содержания цинка в окружающей среде, вызванное антропогенной деятельностью или иными причинами, как правило, приводит к изменению и/или нарушению хода многих (если не всех) физиолого-биохимических процессов у растений, одним из ранних проявлений которого является торможение их роста [7, 8, 27]. В наших опытах воздействие избытка цинка (1500 мкМ) также оказывало выраженный негативный эффект на рост пшеницы, который прежде всего проявлялся в отношении корней, что было ожидаемо, поскольку именно они контактируют с ионами цинка, находящимися в корнеобитаемой зоне, и накапливают их в наибольших количествах. Торможение роста растений в подобных условиях могло быть обусловлено целым рядом причин. Например, избыток цинка способен вызывать у растений остановку митотического деления клеток [1], повреждение клеточных мембран [16], снижение скорости фотосинтеза [8, 28], а также может приводить к нарушению поглощения элементов минерального питания [6].

Как известно, важную роль в регуляции ростовых процессов, в том числе и при воздействии на растения тяжелых металлов, играют фитогормоны. Под их контролем находятся не

только деление и растяжение клеток, лежащие в основе роста и морфогенеза, но и связанные с ними (напрямую или опосредованно) многие другие физиолого-биохимические процессы [29]. В отношении СК и ее производных показано, что при действии тяжелых металлов, включая цинк, они, применяемые в определенных концентрациях, могут способствовать увеличению линейных размеров и/или накоплению биомассы растений [7, 13, 16]. Так, например, обработка семян СК в концентрации 50 [13] или 100 мкМ [7] поддерживала на более высоком уровне рост побега или корня растений пшеницы в условиях избытка цинка. Обработка растений с помощью опрыскивания с использованием более высоких концентраций СК (500 и 1000 мкМ) оказывала положительный эффект на рост шалфея и люцерны, который проявлялся в увеличении размеров надземной и подземной части растений или в усилении накопления их сырой биомассы при высоком содержании цинка во внешней среде [6, 8]. Предполагается, что стимулирующее влияние СК на ростовые процессы в условиях действия на растения тяжелых металлов может быть связано с увеличением поглощения ими элементов минерального питания, необходимых для роста [6], поддержанием гормонального баланса [30] и/или увеличением интенсивности фотосинтеза [13]. Повышение скорости последнего при избыточном (1500 мкМ) содержании цинка в субстрате, коррелирующее с поддержанием в листьях более высокого содержания фотосинтетических пигментов и устойчивой проводимости, обнаружено нами у растений пшеницы, семена которых предварительно обрабатывались СК (100 мкМ) [28]. Однако, что касается стимулирующего эффекта СК на рост пшеницы, в настоящем исследовании он зафиксирован только на начальных стадиях роста растений пшеницы и при их выращивании в темноте. При этом в условиях избытка цинка в корнеобитаемой зоне обработка семян СК, напротив, несколько усиливала ингибирующее действие избытка цинка на рост побега и корня растений. Отметим, что в литературе имеются сведения о том, что данное фенольное соединение не всегда оказывает на ростовые процессы только стимулирующий эффект. Его проявление может быть опосредованно влиянием СК на транспорт и распределение ауксина [31], эксудацию органических кислот из корней в ризосферу [32] или на окислительно-восстановительный баланс [33]. Наблюдаемые различия в характере реакции на обработку семян СК, фиксируемые по ростовым показателям, могут объясняться наличием видовых (и сортовых) особенностей, условиями выращивания растений, фазой развития, на которой анализируется ответная реакция растения на действие избытка

цинка, интенсивностью (концентрацией цинка) и продолжительностью его воздействия, а также условиями обработки растений СК (способ обработки и ее длительность, концентрация СК).

По своей химической характеристике цинк не является редокс-активным металлом, однако его избыточное накопление в клетках может приводить к развитию окислительного стресса, вызванного усилением образования АФК [7]. Результатом окислительного стресса является окисление биологических молекул, в частности, липидов, которое сопровождается накоплением одного из его конечных продуктов – МДА. Увеличение содержания МДА в клетках растений при избытке цинка отмечалось ранее в других работах [13, 16, 34] и в наших опытах. Важно подчеркнуть, что в присутствии концентрации цинка 1500 мкМ уровень МДА в наибольшей степени повышался у тех растений пшеницы, семена которых подвергались обработке СК. Об увеличении содержания АФК и/или ТБК-активных продуктов под влиянием СК ранее сообщали другие авторы [11, 30, 33]. Проявление подобного эффекта СК связывают с ингибированием транспорта электронов в ЭТЦ митохондрий и окислительного фосфорилирования, усилением высвобождения цитохрома *c* из митохондрий, увеличением активности мембранной НАДФН-оксидазы, снижением активности КАТ [35]. При этом накопление АФК и продуктов деградации мембранных липидов, с одной стороны, может приводить к нарушению ультраструктуры клеточных органелл (в частности, митохондрий) и сопровождаться торможением роста растений [33]. С другой стороны, окисление липидов, а именно полиненасыщенных жирных кислот, приводит к образованию (ферментативным или неферментативным путем) оксилипинов, вовлеченных не только в регуляцию процессов роста и развития, но и защитных реакций растений, в частности, на действие тяжелых металлов [36]. Что касается СК, образующиеся радикалы и продукты перекисного окисления липидов рассматриваются в качестве важных посредников, участвующих в сигнальных путях этого фитогормона [11]. В пользу этого свидетельствует то, что ингибирование генерации АФК и ряда других эффектов, наблюдаемое при обработке пшеницы СК, увеличивает восприимчивость растений к ионам кадмия [30]. При этом транзиторное увеличение интенсивности окислительного стресса под влиянием СК может служить своего рода сигналом, необходимым, в том числе, для активизации работы антиоксидантной системы, во многом обеспечивающей повышение устойчивости растений к внешним факторам [11].

Действительно, есть сведения о том, что в условиях избытка цинка применение СК (обработка семян, опрыскивание растений или выращивание на растворе с добавлением СК) вы-

зывало в растениях повышение активности СОД, КАТ, ферментов аскорбат-глутатионового цикла и экспрессии кодирующих их генов [8, 15, 16], а также индуцировало увеличение содержания глутатиона [8], аскорбата [15], хлорофиллов [6], флавоноидов, пролина и сахаров [16]. В наших опытах при избытке цинка в корнеобитаемой среде обнаружено повышение активности СОД и ГвПО, причем только у тех растений, семена которых были обработаны СК. При этом обращает на себя внимание существенное повышение в этих условиях активности ГвПО. Пероксидаза является одним из наиболее полифункциональных ферментов, а гваяколовой пероксидазе помимо детоксикации АФК отводят важную роль в биосинтезе лигнина [37]. Его отложение в клеточных стенках не только придает тканям механическую прочность, но и может замедлять (или даже подавлять) транспорт тяжелых металлов в ксилему и их перемещение в надземную часть растений [38]. При этом повышение активности лигнифицирующих пероксидаз напрямую коррелирует с увеличением содержания лигнина в тканях, что обнаружено, например, у растений клевера [37], ромашки [39] и пшеницы [30]. О возможности участия в регуляции этих процессов СК также упоминается в литературе [30, 39]. С этой точки зрения, интерес представляют данные о повышении уровня МДА при избытке цинка в тканях растений пшеницы, семена которых обрабатывались СК. Как известно, окислительная полимеризация монолигнолов (один из этапов биосинтеза лигнина) происходит в присутствии АФК, и накопление лигнина усиливается наряду с увеличением содержания МДА [37, 39]. На фоне этого у растений наблюдается торможение ростовых процессов, что может объясняться лигнификацией, которая уменьшает пластичность клеточной стенки и ограничивает рост клеток [37]. Поэтому нельзя исключить, что отмеченное нами накопление МДА и рост активности гваяколовой пероксидазы у растений пшеницы, семена которых обрабатывались СК, и, как следствие, торможение роста взаимосвязаны и могут объясняться усилением биосинтеза лигнина и увеличением его содержания. О взаимосвязи этих процессов у растений, а также участии в их регуляции СК свидетельствуют также данные, полученные Shakirova с соавт. [30].

Наряду с антиоксидантными ферментами в стабилизации клеточных мембран, в том числе и благодаря своим антиоксидантным свойствам, участвует свободный пролин. Он также способен выступать в роли хелатора, образующего нетоксичные металл-пролиновые комплексы с рядом металлов [40]. Его накопление в клетках растений при избытке цинка отмечалось ранее в других работах [8, 16] и в наших опытах. Что же касается эффекта СК на содержание пролина, то

в наших опытах он не был зафиксирован. Вполне вероятно, что в этом случае для поддержания жизнеспособности растений, испытывающих действие избытка цинка, достаточно было активизации под влиянием СК ряда антиоксидантных ферментов и, возможно, усиления биосинтеза каких-то других низкомолекулярных соединений, содержание которых в данной работе не определялось.

Все перечисленные выше факты и их анализ приводит нас к выводу о многообразии (и разнообразии) защитно-приспособительных реакций и защитных механизмов, которыми располагают растения и благодаря которым они способны выживать в условиях стресса, в частности, вызванного действием на них тяжелых металлов. СК как один из элементов гормональной системы способна включаться в эти события и вносить свой вклад в общую картину наблюдаемых в растениях изменений в обмене веществ под влиянием стресса (рис. 3). При этом важно подчеркнуть, что характер ответной реакции растений на действие избытка цинка под влиянием СК может изменяться по-разному в зависимости от конкретного показателя. В данной и предыдущей работе [28] нами в совокупности было изучено 14 показателей, значения шести из которых под влиянием обработки семян СК возрастали (интенсивность фотосинтеза, активность СОД и ГвПО, содержание хлорофиллов и каротиноидов, содержание МДА), четырех

других снижались (длина корня, высота побега, площадь второго листа, активность карбоангидразы), а четырех — не изменялись (выход электролитов, устьичная проводимость, содержание пролина, активность КАТ).

Очевидно, что расширение набора изучаемых показателей приведет к увеличению перечня показателей в каждой из трех указанных выше групп. Это служит аргументом того, что реакция растений на стресс является не только многокомпонентной и многоэшелонной, но и весьма вариативной, зависящей от многих факторов и обстоятельств — силы (интенсивности) и продолжительности стресса, сопутствующих стрессу внешних факторов (температура, влажность, освещенность и др.), биологических особенностей вида (сорта) растений, их возрастного состояния и т.д. Следовательно, логично ожидать, что характер реакции растений, семена которых были подвергнуты обработке СК, на избыток цинка во внешней среде может варьировать как количественно, так и качественно в зависимости от указанных выше факторов, а также в зависимости от концентрации СК, продолжительности ее действия и способа введения в растения. Именно это находит свое подтверждение в работах авторов, исследования которых посвящены данному вопросу.

Наконец, следует сказать, что реальная картина происходящих под влиянием СК изменений в растениях, находящихся в условиях избытка



Рис. 3. Влияние обработки семян СК (100 мМ) на характер ответной реакции растений пшеницы на действие избытка цинка (1500 мкМ) в корнеобитаемой среде.

ка цинка во внешней среде, является еще более сложной, т.к. здесь мы не обсуждаем вовлеченность в защитно-приспособительные реакции растений других гормонов, участие генетической системы и вклад структурных (ультраструктурных) изменений. Но без ее всестороннего изучения и более глубокого понимания невозможна разработка эффективных методов и способов повышения устойчивости и продуктивности растений, культивируемых в разных агроклиматических условиях.

Авторы выражают благодарность руководителю лаборатории аналитической Института леса КарНЦ РАН к.б.н. Никеровой К.М. за методическую помощь, и.о. зав. лабораторией селекции и первичного семеноводства озимой пшеницы ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр “Немчиновка” к.с.-х.н. Мамедову Р.З. за семенной материал для исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания FMEN-2022-0004 на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельского научного центра Российской академии наук”.

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. Jain R., Srivastava S., Solomon S., Shrivastava A.K., Chandra A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.) // *Acta Physiol. Plant.* 2010. V. 32. P. 979. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0487-9>
2. Huang Y.T., Cai S.Y., Ruan X.L., Chen S.Y., Mei G.F., Ruan G.H., Cao D.D. Salicylic acid enhances sunflower seed germination under Zn^{2+} stress via involvement in Zn^{2+} metabolic balance and phytohormone interaction // *Sci. Horti.* 2021. V. 275. Art. 109702. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109702>
3. Sharma A., Soares C., Sousa B., Martins M., Kumar V., Shahzad B., Singh Sidhu G.-P., Bali A.S., Asgher M., Bhardwaj R., Kumar Thukral A.K., Fidalgo F., Zheng B. Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects // *Physiol. Plant.* 2020. V. 168. P. 318. <https://doi.org/10.1111/ppl.13004>
4. Liu B., Yu H., Yang Q., Ding L., Sun F., Qu J., Feng W., Yang Q., Li W., Fu F. Zinc Transporter ZmLAZ1-4 modulates zinc homeostasis on plasma and vacuolar membrane in maize // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. Art. 881055. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881055>
5. Wang Y., Kang Y., Yu W., Lyi S.M., Choi H.W., Xiao E., Li L., Klessig D.F., Liu J. AtTIP2;2 facilitates resistance to zinc toxicity via promoting zinc immobilization in the root and limiting root-to-shoot zinc translocation in *Arabidopsis thaliana* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022. V. 233. Art. 113333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113333>
6. Es-sbihi F.Z., Hazzoumi Z., Joutei K.A. Effect of salicylic acid foliar application on growth, glandular hairs and essential oil yield in *Salvia officinalis* L. grown under zinc stress // *Chem. Biol. Tech. Agril.* 2020. V. 7. Art. 26. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00192-6>
7. Mazumder M.K., Sharma P., Moulick D., Tata K.S., Choudhury S. Salicylic acid ameliorates zinc and chromium-induced stress responses in wheat seedlings: a biochemical and computational analysis // *Cereal Res. Commun.* 2022. V. 50. P. 407. <https://doi.org/10.1007/s42976-021-00201-w>
8. Li Q., Guan C., Zhao Y., Duan X., Yang Z., Zhu J. Salicylic acid alleviates Zn-induced inhibition of growth via enhancing antioxidant system and glutathione metabolism in alfalfa // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2023. V. 265. Art. 115500. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115500>
9. Кулистикова Т. Росстат: посевная площадь оказалась меньше прошлогодней; <https://www.agroinvestor.ru/markets/news/40784-rosstat-posevnaya-ploshchad-okazalas-menshe-proshlogodney>
10. Rahman S.U., Li Y., Hussain S., Hussain B., Khan W.-D., Riaz L., Ashraf M.N., Khaliq M.A., Du Z., Cheng H. Role of phytohormones in heavy metal tolerance in plants: a review // *Ecol. Indicat.* 2023. V. 146. Art. 109844. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109844>
11. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010. 352 с.
12. Janda T., Szalai G., Pál M. Salicylic acid signalling in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Art. 2655. <https://doi.org/10.3390/ijms21072655>
13. Гильванова И.Р., Еникеев А.Р., Степанов С.Ю., Рахманкулова З.Ф. Участие салициловой кислоты и оксида азота в защитных реакциях растений пшеницы при действии тяжелых металлов // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48. С. 103.
14. Stanislawska-Glubiak E., Korzeniowska J. Effect of salicylic acid foliar application on two wheat cultivars grown under zinc stress // *Agronomy.* 2022. V. 121. Art. 60. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010060>
15. Namdjoyan S., Kermanian H., Soorki A.A., Tabatabaei S.M., Elyasi N. Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide in alleviating zinc toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) // *Ecotoxicol.* 2017. V. 26. P. 752. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1806-3>

16. *Taherbahrani S., Zoufan P., Zargar B.* Modulation of the toxic effects of zinc oxide nanoparticles by exogenous salicylic acid pretreatment in *Chenopodium murale* L. // *Env. Sci. Poll. Res.* 2021. V. 28. Art. 65644. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15566-y>
17. ГОСТ 12038-84. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Дата введения: 1986-07-01. М.: Изд-во стандартов.
18. *Аникиев В.В., Кутузов Ф.Ф.* Новый способ определения площади листовой поверхности у злаков // *Физиология растений.* 1961. Т. 8. С. 375.
19. *Грищенко Н.Н., Лукаткин А.С.* Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // *Поволж. экол. журн.* 2005. Т. 1. С. 3.
20. *López-Hidalgo C., Meijón M., Lamelas L., Valledor L.* The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample // *Plant Cell Environ.* 2021. V. 4. P. 1977. <https://doi.org/10.1111/pce.14007>
21. *Beauchamp Ch., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276.
22. *Ershova M.A., Nikerova K.M., Galibina N.A., Sofronova I.N., Borodina M.N.* Some minor characteristics of spectrophotometric determination of antioxidant system and phenolic metabolism enzyme activity in wood plant tissues of *Pinus sylvestris* L. // *Protein Pept. Lett.* 2022. V. 9. P. 711. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220414104747>
23. *Aebi H.* Catalase in vitro // *Methods in Enzymol.* 1984. V. 105. P. 121.
24. *Maehly A.C., Chance B.* The assay of catalase and peroxidase // *Meth. Biochem. Anal.* 1954. V. 1. P. 357. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
25. *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/10.1006/abio.1976.9999>
26. *Bates L.S., Waldeen 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>
27. *Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В.* Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2014. 194 с.
28. *Игнатенко А.А., Нилова И.А., Холопцева Е.С., Титов А.Ф., Казнина Н.М.* Влияние обработки салициловой кислотой на фотосинтетический аппарат и активность карбоангидразы у пшеницы при избытке цинка // *Докл. РАН. Науки о жизни.* 2023. Т. 513. С. 570. <https://doi.org/10.31857/S2686738923700415>
29. *Чумикина Л.В., Арапова Л.И., Колпакова В.В., Топунов А.Ф.* Фитогормоны и абиотические стрессы (обзор) // *Химия раст. сырья.* 2021. Т. 4. С. 5. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021049196>
30. *Shakirova F.M., Bezrukova M.V., Maslennikova D.R.* Endogenous ABA as a hormonal intermediate in the salicylic acid induced protection of wheat plants against toxic ions // *Salicylic acid* / Eds. Hayat S., Ahmad A., Alyemeni M. Springer, Dordrecht. 2013. P. 119. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6428-6_7
31. *Tan S., Abas M., Verstraeten I., Glanc M., Molnar G., Hajny J., Lasak P., Petrík I., Russinova E., Petrasek J., Russinova E., Petrasek J., Novak O., Pospisil J., Friml J.* Salicylic acid targets protein phosphatase 2A to attenuate growth in plants // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. P. 381. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.058>
32. *Yang Z.M., Wang J., Wang S.H., Xu L.L.* Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. // *Planta.* 2003. V. 217. P. 168. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-0980-0>
33. *Дмитриева С.А., Пономарева А.А., Минибеева Ф.В., Гордон Л.Х.* АФК и протон-опосредованное действие салициловой кислоты на рост и ультраструктуру клеток корней пшеницы // *Учен. зап. Казан. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки.* 2008. Т. 150. С. 123.
34. *Seregin I.V., Ivanova T.V., Voronkov A.S., Kozhevnikova A.D., Schat H.* Zinc- and nickel-induced changes in fatty acid profiles in the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and non-accumulator *Arabidopsis lyrata* // *Plant Physiol. Biochem.* 2023. V. 197. Art. 107640. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107640>
35. *Poor P.* Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants // *Biomolecules.* 2020. V. 10. Art. 341. <https://doi.org/10.3390/biom10020341>
36. *Савченко Т.А., Застрижная О.М., Климов В.В.* Оксипилены и устойчивость растений к абиотическим стрессам // *Биохимия.* 2014. Т. 79. С. 458. <https://doi.org/10.1134/S0006297914040051>
37. *Lee B.-R., Kim K.-Y., Jung W.-J., Avice J.-C., Ourry A., Kim T.-H.* Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.) // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 1271. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl280>
38. *Liu Q., Luo L., Zheng L.* Lignins: biosynthesis and biological functions in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 335. <https://doi.org/10.3390/ijms19020335>
39. *Kovacik J., Gruz J., Backor M., Strnad M., Repcak M.* Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants // *Plant Cell Rep.* 2009. V. 28. P. 135. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0627-5>
40. *Тарчевский И.А., Егорова А.М.* Участие пролина в адаптации растений к действию стресс-факторов и его использование в агробиотехнологии (обзор) // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2022. Т. 58. С. 315.

УДК 581.1

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАКРОЭЛЕМЕНТОВ, ВОДЫ И СВЕТА У *Lactuca sativa* (L.) В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ СВИНЦОМ

© 2024 г. Е. Н. Икконен^а, *, Н. М. Казнина^а^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, Россия

*e-mail: likkonen@gmail.com

Поступила в редакцию 13.06.2024

После доработки 25.06.2024

Принята к публикации 27.06.2024

В контролируемых условиях среды изучали влияние загрязнения почвы свинцом (50 и 250 мг Pb²⁺ на кг сухого веса почвы) на скорость фотосинтетической ассимиляции CO₂ (A_n), содержание основных макроэлементов в листьях, фотосинтетическую эффективность использования N (PNUE), P (PPUE) и K (PKUE), а также воды (PWUE) и света (α) у растений листового салата сорта Медвежье ушко. Выявлено отрицательное воздействие металла на скорость фотосинтеза (A_n), что связано с уменьшением содержания хлорофилла, снижением PNUE, PPUE, PKUE и величины α . Показатель квантовой эффективности ФС II (F_v/F_m) снижался, но оставался в допустимых для нормального функционирования фотосистемы пределах. Выраженного влияния свинца на содержание микроэлементов в листьях растений не обнаружено. У растений опытных вариантов уменьшение PNUE, PPUE и PKUE сопровождалось увеличением соотношения массы листа к его площади, что отражает тесные структурно-функциональные связи при адаптации растений к стрессовым условиям загрязнения почвы тяжелым металлом. Показано, что свинец даже в самой высокой из исследованных концентраций (250 мг/кг почвы) не влиял на скорость транспирации, а также на фотосинтетическую эффективность использования воды у растений.

Ключевые слова: листовый салат, фотосинтез, тяжелые металлы, азот, фосфор, калий

DOI: 10.31857/S0015330324060092, EDN: LWJAIA

ВВЕДЕНИЕ

Проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и накопление их в больших количествах в органах сельскохозяйственных культур не ослабевает уже на протяжении нескольких десятков лет. Это связано с сильным отрицательным воздействием данных химических элементов на жизнедеятельность растений и их продуктивность, а также с повышенным риском здоровью животных и человека [1]. Как следствие, исследования, посвященные изучению механизмов поступления и накопления металлов в органах растений и их влияния на основные физиологические процессы, и в настоящее время сохраняют свою актуальность.

Свинец изучен в гораздо меньшей степени, чем, например, кадмий или цинк, несмотря на то что он является одним из наиболее распространенных загрязняющих веществ среди тяжелых металлов. Тем не менее известно, что повышение содержания свинца в почве приводит к увеличению его концентрации в подземных и надземных органах растений и негативно отражается на всех физиологических процессах и продуктивности [2]. Так, обнаружено отрицательное воздействие этого элемента на поглощение других ионов, что приводит к дисбалансу элементов минерального питания [3–5]. При высоких концентрациях металла нарушается водный обмен растений, тормозится поступление воды в корень, замедляется транспирация, уменьшается оводненность тканей [6]. В присутствии свинца у растений замедляется скорость фотосинтеза, что является одной из основных причин его ингибирующего действия на рост и развитие. Негативный эффект свинца на фотосинтез связан с целым рядом изменений и нарушений в фотосинтетическом аппарате растений (ФСА), в том числе, с дегра-

Сокращения: ФАР — фотосинтетически активная радиация; LMA — отношение сухой массы листа к его площади (англ. Leaf mass per area); PKUE — фотосинтетическая эффективность использования калия; PNUE — фотосинтетическая эффективность использования азота; PPUE — фотосинтетическая эффективность использования фосфора; SPAD — показатель содержания хлорофилла (англ. Soil Plant Analysis Development).

дацией хлорофилла, снижением эффективности преобразования энергии ФС II и транспорта электронов, активности ферментов цикла Кальвина [1, 7, 8]. Данных о воздействии свинца на фотосинтетическую эффективность использования макроэлементов, воды и света практически нет, хотя именно этот показатель считается важным функциональным признаком растений, от которого во многом зависит их продуктивность [9]. Эффективностью фотосинтетического использования макроэлементов называется скорость видимого фотосинтеза, осуществляемого на единицу содержания азота, фосфора или калия в листе (PNUE, PPUE или PKUE, соответственно) [9]. Эффективность фотосинтетического использования воды (или света) определяется как скорость фотосинтеза на единицу транспирационного потока (или поглощенной световой энергии) [10, 11]. Именно от этих показателей, вариабельность которых может быть обусловлена другими физиологическими процессами, а также факторами среды [12], во многом зависит фотосинтетическая способность растений.

Цель работы – оценка влияния загрязнения почвы свинцом на фотосинтетическую эффективность использования основных макроэлементов, воды и света у одной из популярных пищевых культур – листового салата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опыте использовали дерново-подзолистую почву, содержащую 0.39% общего азота, 1.6 г/кг подвижного фосфора и калия и 0.13 мг/кг подвижного свинца [13]. Воздушно-сухую почву просеивали, вносили по 150 мг/кг N, P и K, в опытные варианты добавляли Pb^{2+} в виде $Pb(NO_3)_2$ в концентрации 50 или 250 мг/кг (по элементу). Подготовленную почву помещали в сосуды объемом 0.8 л, увлажняли и инкубировали при температуре $21^\circ \pm 2^\circ C$ в течение 14 сут. Каждый вариант опыта включал восемь сосудов.

Семена листового салата (*Lactuca sativa* L., сорт Медвежье ушко) высаживали в сосуды. Растения выращивали в контролируемых условиях при фотопериоде 16 ч, температуре $23/20^\circ C$ день/ночь, интенсивности освещения 250 мкмоль/(m^2 с) фотосинтетически активной радиации (ФАР). Полив осуществляли дистиллированной водой.

Спустя 46 сут. у растений контрольного и опытных вариантов измеряли скорость видимого фотосинтеза (A_n) и транспирационного потока (Tr) с единицы площади листа с использованием портативной фотосинтетической системы HSM-1000 (Walz, Германия) при температуре листа $23^\circ C$, освещенности листа 1200, 60, 40 и 20 мкмоль/(m^2 с) ФАР, влажности воздуха в измерительной камере 65–70%, содержании CO_2 , равном 400–420 ppm. Измерения выполняли после полной стабилизации процессов

газообмена CO_2 и H_2O . Максимальную эффективность ФС II (F_v/F_m) определяли с использованием флуориметра MINI-PAM (Walz, Германия) после 30-минутной темновой адаптации листьев. Содержание хлорофилла оценивали экспресс-методом с использованием SPAD-502 (Minolta, Япония). Для указанных выше измерений был взят самый молодой лист из полностью сформированных.

Для определения величины массы листа к единице площади (LMA, *leaf mass per area*) все листья с растений срезали, сканировали и вычисляли площадь с использованием программы AreaS. Затем листья высушивали при $70^\circ C$ до постоянного веса и рассчитывали LMA как соотношение массы листовой пластинки к ее площади [14].

Содержание макроэлементов (N, P, K) и свинца (Pb) в единице массы листа выполняли в аналитической лаборатории Института леса на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”. Для измерения содержания N и P растительную навеску подвергали мокрому озолению по методу Кьельдаля. Общий азот и фосфор определяли, соответственно, с реактивом Несслера и молибденово-кислым аммонием на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ-Спектр, Россия). Для оценки содержания K и Pb растительные образцы измельчали и навесками по 0.2–0.3 г помещали во фторопластовые стаканы. Минерализацию проводили смесью кислот в течение 30 мин при температуре $135^\circ C$ в микроволновой системе разложения Berghof Speedwave (MWS four digestion system, Германия). Содержание K измеряли атомно-абсорбционным методом с пламенной атомизацией на спектрофотометре AA-6800 (Shimadzu, Япония), содержание Pb – электротермической атомизацией на спектрофотометре AA-7000 (Shimadzu, Япония). В качестве калибровочных стандартов использовали сертифицированные многоэлементные растворы (Inorganic Ventures, США).

Для расчета содержания макроэлементов в единице площади листа использовали значения LMA и содержание элементов в единице массы листа. Фотосинтетическую эффективность использования N, P и K (PNUE, PPUE и PKUE, соответственно) рассчитывали как отношение A_n к содержанию N, P и K в единице площади листа [9]. Эффективность использования воды при фотосинтезе (PWUE) вычисляли как соотношение A_n и Tr [10]. Фотосинтетическую эффективность использования растением света выражали посредством одного из параметров световой зависимости фотосинтеза, который в отечественной литературе называется видимым квантовым выходом (α). Его вычисляли по тангенсу накло-

на световой кривой фотосинтеза, построенной по значениям скорости фотосинтеза при 60, 40 и 20 мкмоль/(м²с) ФАР [11].

Биологическая повторность в зависимости от показателя составляла шесть и более растений, аналитическая повторность была 3-кратной. В работе представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями определяли при $P < 0.05$ на основе дисперсионного анализа (LSD-тест) с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Линейный регрессионный анализ был использован для оценки взаимосвязи между исследованными параметрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что при повышении концентрации свинца в почве у растений замедлялась скорость фотосинтеза относительно контрольного варианта, что более

отчетливо проявилось при концентрации металла 250 мг/кг почвы (табл. 1). При этом в обоих вариантах опыта несколько уменьшалась (по сравнению с контролем) величина показателя F_v/F_m , оставаясь, однако, в пределах, необходимых для нормального функционирования ФС II [15]. Содержание хлорофилла значительно снижалось только при наиболее высокой концентрации металла, использованной в данной работе. Обнаружено, что показатель LMA, широко используемый в качестве индикатора функционирования таких процессов как фотосинтез, дыхание, водный обмен [16], наоборот, возрастал при загрязнении почвы свинцом, главным образом, за счет уменьшения площади листа (табл. 1). Ярко выраженного воздействия металла на скорость транспирации обнаружено не было, наблюдалась лишь тенденция к ее снижению.

Увеличение концентрации свинца в почве приводило к повышению его содержания в листьях салата (табл. 2). В частности, при

Таблица 1. Влияние загрязнения почвы свинцом на некоторые показатели фотосинтетического аппарата растений салата сорта Медвежье ушко

Показатель	Вариант опыта		
	контроль	Pb ²⁺ 50 мг/кг почвы	Pb ²⁺ 250 мг/кг почвы
A_n , мкмоль/(м ² с)	7.1 ± 0.3 ^a	5.8 ± 0.3 ^{ab}	4.9 ± 0.2 ^b
Tg, ммоль/(м ² с)	1.06 ± 0.09 ^a	0.93 ± 0.10 ^a	0.94 ± 0.13 ^a
F_v/F_m	0.844 ± 0.004 ^a	0.827 ± 0.006 ^b	0.830 ± 0.007 ^b
SPAD index	15.3 ± 0.6 ^a	14.1 ± 0.6 ^a	11.0 ± 1.1 ^b
LMA, г/м ²	36 ± 1 ^b	42 ± 2 ^a	40 ± 1 ^a

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между контрольным и опытными вариантами при $P < 0.05$. Измерения A_n и Tg выполнены при ФАР, равной 1200 мкмоль/(м²с).

Таблица 2. Содержание свинца и макроэлементов в листьях салата сорта Медвежье ушко при загрязнении почвы свинцом

Элемент	Вариант опыта		
	контроль	Pb ²⁺ 50 мг/кг почвы	Pb ²⁺ 250 мг/кг почвы
Pb, мг/кг	0.4 ± 0.1 ^c	2.3 ± 0.3 ^b	4.6 ± w1.2 ^a
N, %	2.0 ± 0.7 ^a	2.4 ± 0.3 ^a	2.3 ± 0.3 ^a
P, %	0.17 ± 0.05 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.07 ^a
K, %	8.1 ± 0.8 ^c	10.1 ± 0.2 ^b	11.0 ± 0.1 ^a
N, г/м ²	0.7 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.1 ^a
P, мг/м ²	0.06 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.03 ^a
K, г/м ²	2.90 ± 0.30 ^b	4.26 ± 0.07 ^a	4.40 ± 0.03 ^a

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между контрольным и опытными вариантами при $P < 0.05$.

концентрации металла в почве 50 мг/кг его содержание оказалось более чем в 5 раз выше, чем у растений контрольного варианта, а при концентрации 250 мг/кг — в 11.5 раз. Важно отметить, что при этом содержание азота и фосфора в обоих опытных вариантах оставалось на уровне контрольного как при его расчете на массу, так и при перерасчете на площадь листа. В отличие от этого, содержание калия независимо от концентрации свинца в почве и способа расчета возрастало в 1.5 раза по сравнению с контролем.

Загрязнение почвы свинцом приводило к существенному снижению (более чем в 1.8 раз по сравнению с контролем) величин PNUE, PPUE и PKUE, причем практически в равной степени при обоих использованных в исследовании концентрациях металла (табл. 3). Для всех вариантов опыта оценка зависимости скорости фотосинтеза и фотосинтетической эффективности использования макроэлементов от величины LMA показала отрицательную связь с LMA у A_n (рис. 1 а), PNUE (рис. 1 б), PPUE (рис. 1 в) и PKUE (рис. 1 г). Результаты исследования также показали, что PWUE не зависела от присутствия металла в почве, а величина α снижалась при наибольшей концентрации свинца (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Задачей нашего исследования была оценка влияния избытка свинца в почве на накопление в листьях салата основных макроэлементов и эффективность их использования в процессе фотосинтетической ассимиляции углерода. Ранее было показано, что ингибирование роста растений под воздействием свинца во многом связано с нарушением ионного гомеостаза растений [5]. В частности, в присутствии свинца снижалось содержание кальция, магния, цинка и серы в надземных органах пшеницы, шпината и бобов [3, 4]. Основными причинами этого являются сокращение поступления ионов необ-

ходимых элементов вследствие уменьшения размеров корня, конкуренция ионов питательных элементов и ионов свинца за сайты связывания при их транслокации в корень и далее по тканям растений, а также снижение активности некоторых транспортных белков, участвующих в переносе необходимых ионов через мембраны клеток [17]. В наших исследованиях негативного влияния загрязнения почвы свинцом на содержание азота и фосфора в листьях салата не было обнаружено, а содержание калия даже возрастало (табл. 2). Полученный эффект, вероятно, можно объяснить тем, что при изменении внешних условий именно для макроэлементов характерно поддержание постоянства элементного состава в отличие от микроэлементов, существенная вариабельность содержания которых была ранее выявлена в контрастных условиях роста растений, включая контрастность по уровням загрязнения почвы тяжелыми металлами [18–20].

В отличие от содержания макроэлементов, фотосинтетическая эффективность использования N, P и K существенно падала в условиях загрязнения почвы свинцом (табл. 3). Это сопровождалось уменьшением интенсивности фотосинтеза. Известно, что доступность элементов питания, и особенно N, является одним из факторов, определяющих фотосинтетическую способность растений к ассимиляции углерода [21]. Однако в нашем исследовании содержание азота в листьях опытных растений не снижалось. Следовательно, ингибирование фотосинтеза было в данном случае обусловлено другими причинами, среди которых можно выделить снижение эффективности использования света на ассимиляцию CO_2 (α) (табл. 3). Фотосинтетическая эффективность световой энергии, или видимый квантовый выход фотосинтеза, отражает эффективность работы ФСА преимущественно при малой и средней интенсивности света [11] и может определять скорость первичной продукции, изменяясь в зависимости от условий, в ко-

Таблица 3. Фотосинтетическая эффективность использования азота (PNUE), фосфора (PPUE), калия (PKUE), воды (PWUE) и света (α) у растений салата сорта Медвежье ушко при загрязнении почвы свинцом

Показатель	Вариант опыта		
	контроль	Pb ²⁺ 50 мг/кг почвы	Pb ²⁺ 250 мг/кг почвы
α , моль CO_2 /моль квант	0.018 ± 0.001^a	0.017 ± 0.001^{ab}	0.014 ± 0.002^b
PWUE, мкмоль CO_2 /ммоль H_2O	6.8 ± 0.7^a	6.4 ± 0.6^a	6.4 ± 0.9^a
PNUE, мкмоль CO_2 /(г(N) с)	12.9 ± 5.0^a	6.0 ± 0.7^b	5.3 ± 0.7^b
PPUE, мкмоль CO_2 /(г(P) с)	157 ± 21^a	83 ± 6^b	75 ± 29^b
PKUE, мкмоль CO_2 /(г(K) с)	2.49 ± 0.26^a	1.35 ± 0.02^b	1.11 ± 0.01^c

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между контрольным и опытными вариантами при $P < 0.05$.

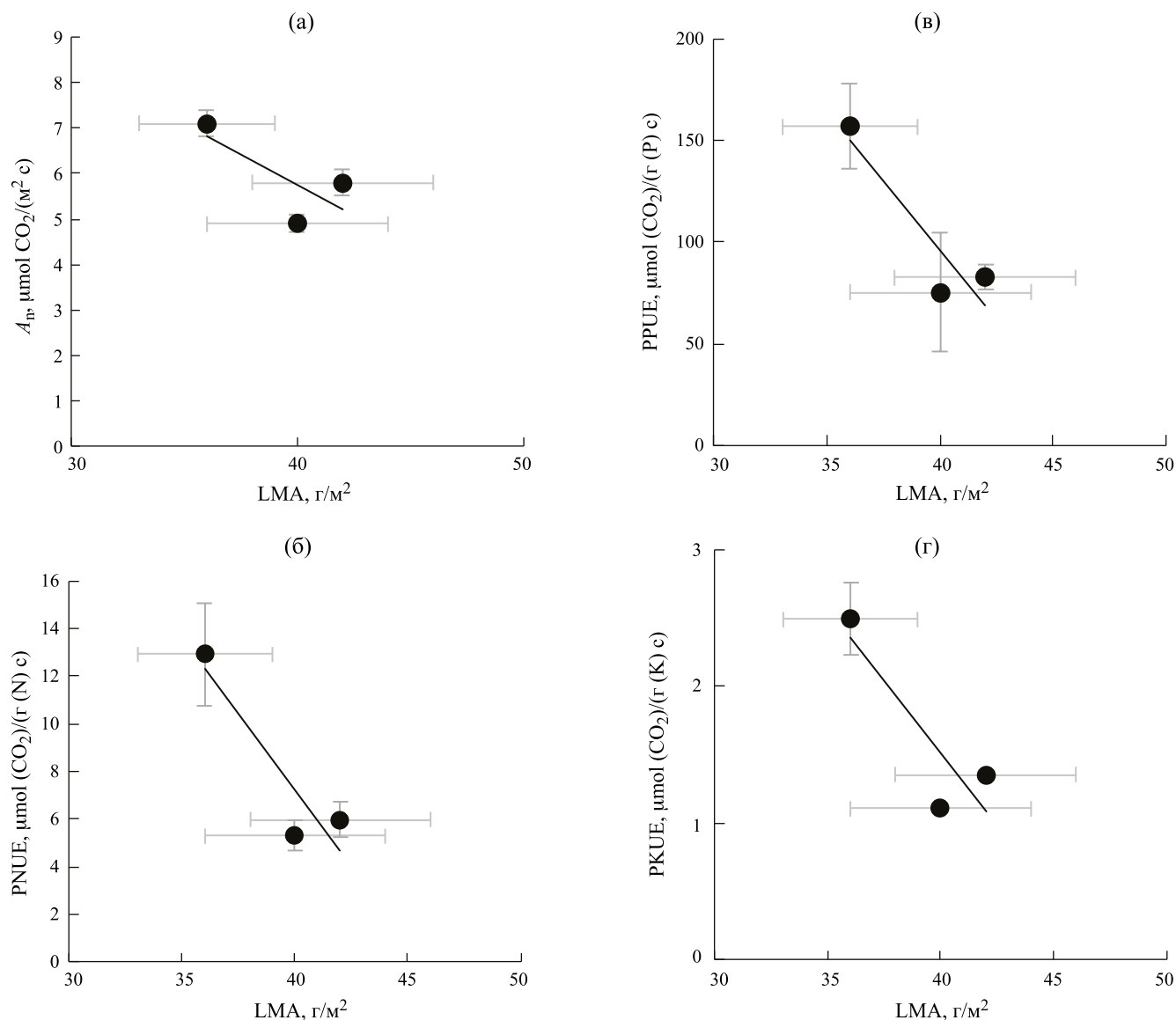


Рис. 1. Зависимость скорости видимого фотосинтеза A_n , (а), фотосинтетической эффективности использования азота PNUE (б), фосфора PPUE (в) и калия PKUE (г) от величины отношения массы листа к единице его площади (LMA) в листьях салата сорта Медвежье ушко. $R^2 = 0.53$ для A_n , $R^2 = 0.84$ для PNUE и PPUE, а также $R^2 = 0.77$ для PKUE.

торых осуществляется фотосинтез [22]. Предполагается, что основным фактором падения эффективности использования света в фотосинтетических реакциях является повышение интенсивности фотодыхания [22], что отмечается при воздействии высоких концентраций свинца [6]. Снижение величины α связывают также с защитными реакциями растений на действие стрессового фактора, осуществляемыми, в том числе, посредством преобразования пигментного комплекса [11], включающего дегградацию хлорофилла или замедление его синтеза [23]. Уменьшение содержания хлорофиллов наблюдалось и в нашем опыте в присутствии наиболее высокой концентрации свинца.

Снижение фотосинтетической эффективности использования всех исследованных ма-

кроэлементов в условиях загрязнения почвы свинцом (табл. 3) соотносилось с повышением величины LMA (табл.1). Отрицательная связь скорости фотосинтетической ассимиляции CO_2 и величины LMA, выявленная в данной работе (рис. 1а), была ранее обнаружена и другими исследователями [24–26]. Более высокие значения LMA могут соответствовать более низким значениям A_n из-за увеличения затрат на формирование листа, снижения доли фотосинтетически активных тканей по отношению к объему клеточных стенок в сухой массе [14] или уменьшения проводимости CO_2 в стромах хлоропластов [27]. Показана также отрицательная связь LMA с эффективностью использования макроэлементов на фотосинтез [25, 28], что подтвердили результаты данного исследования (рис. 1 б–г).

Снижение PNUE у листьев салата при загрязнении почвы свинцом могло быть связано со структурными изменениями, например, с большим инвестированием азота в клеточные стенки и снижением его использования для синтеза фотосинтетических ферментов, в том числе RuBisCO/O. Это подтверждает и увеличение величины LMA [29]. Аналогично, перераспределение фосфора с его использования в метаболических процессах на формирование структурных компонентов может быть причиной снижения PPUE в листьях салата при повышенных концентрациях свинца в почве.

Отметим также, что эффективность использования воды при обеих концентрациях свинца сохранялась на уровне контрольных растений (табл. 3), что могло быть связано с некоторым уменьшением скорости транспирации, сопровождавшим снижение A_n под влиянием свинца. В среднем для всех опытных вариантов значения WUE, определенные для листового салата в нашем эксперименте, являются достаточно высокими и характерны в большей степени для C4-, а не C3-растений [30], к которым относится *L. sativa*, что, видимо, связано с достаточно низкими значениями транспирационных потерь воды исследованным видом.

Таким образом, загрязнение почвы свинцом не оказывало отрицательного воздействия на содержание азота, фосфора и калия в листьях салата, однако эффективность фотосинтетического использования перечисленных макроэлементов в этих условиях уменьшалась, что сопровождалось замедлением скорости фотосинтеза. Одной из причин снижения фотосинтетической активности растений при избытке свинца в почве может являться перенаправление использования макроэлементов в большей степени в структурные, чем фотосинтетические процессы, что подтверждается увеличением значения LMA. Уменьшение эффективности использования света на фотосинтез также рассматривается как одна из причин снижения скорости фотосинтетической ассимиляции CO₂ при повышенных концентрациях металла в почве. Вместе с тем сохранение фотосинтетической эффективности использования воды может способствовать поддержанию активности ФСА растений в условиях загрязнения почвы свинцом.

Исследования выполнены при финансовой поддержке государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0004) на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

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. Shu X., Yin L.Y., Zhang Q.F., Wang W.B. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2012. V. 19. P. 893. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0625-y>
2. Тутов А.Ф., Казнина Н.М., Каранетян Т.А., Доршакова Н.В. Влияние свинца на живые организмы // Журн. общ. биол. 2020. Т. 81. С. 147. <https://doi.org/10.31857/S0044459620020086>
3. Cannata M.G., Carvalho R., Bertoli A.C., Bastos A.R.R., Carvalho J.G., Freitas M.P., Augusto A.S. Effects of lead on the content, accumulation, and translocation of nutrients in bean plant cultivated in nutritive solution // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 2013. V. 44. P. 939. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.747605>
4. Lamhamdi M., El Galiou O., Bakrim A., Novoa-Munoz J.C., Arias-Estevéz M., Aarab A., Lafont R. Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings // Saudi J. Biol. Sci. 2013. V. 20. P. 29. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.09.001>
5. He H., Wang X., Wu M., Guo L., Fan C., Peng Q. Cadmium and lead affect the status of mineral nutrients in alfalfa grown on a calcareous soil // Soil Sci. Plant Nutr. 2020. V. 66. P. 506. <https://doi.org/10.1080/00380768.2020.1747362>
6. Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2011. V. 213. P. 113. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_4
7. Lambers H., Chapin F.S. III, Pons T.L. Plant Physiological Ecology. Springer: New York, NY, USA. 1998. 540 p.
8. Seregin I.V., Kozhevnikova A.D. Distribution of cadmium, lead, nickel, and strontium in imbibing maize caryopses // Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. P. 565. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0084-8>
9. Hikosaka K. Interspecific difference in the photosynthesis – nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance // J. Plant Res. 2004. V. 117. P. 481. <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0174-2>
10. Field C., Merino J., Mooney H.A. Compromises between water-use efficiency and nitrogen-use efficiency in five species of California evergreens // Oecologia. 1983. V. 60. P. 384. <https://doi.org/10.1007/BF00376856>
11. Гармаш Е.В., Головки Т.К. CO₂-газообмен и рост *Rhaponticum carthamoides* в условиях подзоны средней тайги европейского северо-востока. Зависимость фотосинтеза и дыхания от внешних факторов // Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 854.
12. Chen Z.F., Xiong P.F., Zhou J.J., Lai S.B., Jian C.X., Wang Z., Xu B.C. Photosynthesis and nutrient-use efficiency in response to N and P addition in three dominant grassland species on the semiarid Loess Plateau // Photosynthetica. 2020. V. 58. P. 1028. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.056>

13. *Ikkonen E., Chazhengina S., Jurkevich M.* Photosynthetic nutrient and water use efficiency of *Cucumis sativus* under contrasting soil nutrient and lignosulfonate levels // *Plants*. 2021. V. 10. P. 340. <https://doi.org/10.3390/plants10020340>
14. *Васфилов С.П.* Анализ причин изменчивости отношения сухой массы листа к его площади у растений // *Журн. общ. биол.* 2011. Т. 72. С. 436.
15. *Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R.* The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochem. Biophys. Acta*. 1989. V. 990. P. 87. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
16. *de la Riva E.G., Olmo M., Poorter H., Uberta J.L., Villar R.* Leaf Mass per area (LMA) and its relationship with leaf structure and anatomy in 34 Mediterranean woody species along a water availability gradient // *PLoS ONE*. 2016. V. 11. P. 0148788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148788>
17. *Sinha P., Dube B.K., Srivastava P., Chatterjee C.* Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead // *Chemosphere*. 2006. V. 65. P. 651. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.068>
18. *Han W.X., Fang J.Y., Reich P.B., Ian Woodward F., Wang Z.H.* Biogeography and variability of eleven mineral elements in plant leaves across gradients of climate, soil and plant functional type in China // *Ecol. Lett.* 2011. V. 14. P. 788. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01641.x>
19. *Yu Q., Elser JJ, He N, Wu H, Chen Q, Zhang G, Han X.* Stoichiometric homeostasis of vascular plants in the Inner Mongolia grassland // *Oecologia*. 2011. V. 166. P.1. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1902-z>
20. *de la Riva E.G., Villar R., Perez-Ramos I.M., Quero J.L., Matías L., Poorter L., Maranon T.* Relationships between leaf mass per area and nutrient concentrations in 98 Mediterranean woody species are determined by phylogeny, habitat and leaf habit // *Trees*. 2018. V. 32. P. 497. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-646-z>
21. *Kattge J., Knorr W., Raddatz T., Wirth C.* Quantifying photosynthetic capacity and its relationship to leaf nitrogen content for global-scale terrestrial biosphere models // *Glob. Chang. Biol.* 2009. V. 15. P. 976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01744.x>
22. *Ehleringer J., Björkman O.* Quantum yields for CO₂ uptake in C3 and C4 plants. Dependence on temperature, CO₂ and O₂ concentration // *Plant Physiol.* 1977. V. 59. P. 86. <https://dx.doi.org/10.1104/pp.59.1.86>
23. *Gardiner E.S., Krauss K.W.* Photosynthetic light response of flooded cherrybark oak (*Quercus pagoda*) seedlings grown in two light regimes // *Tree Physiol.* 2001. V. 21. P. 1103. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.15.1103>
24. *Parkhurst D.F.* Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves // *New Phytol.* 1994. V. 126. P. 449. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04244.x>
25. *Hidaka A., Kitayama K.* Divergent patterns of photosynthetic phosphorus-use efficiency versus nitrogen-use efficiency of tree leaves along nutrient-availability gradients // *J. Ecol.* 2009. V. 97. P. 984. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01540.x>
26. *Икконен Е.Н., Шибаева Т.Г.* Вариабельность величины отношения массы листа растения к его площади в условиях кратковременных ежесуточных понижений температуры // *Журн. общ. биол.* 2020. V. 81. P. 47. <https://doi.org/10.31857/S0044459620010030>
27. *Poorter H., Niinemets U., Poorter L., Wright I.J., Villar R.* Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis // *New Phytol.* 2009. V. 182. P. 565. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>
28. *Wright I.J., Reich P.B., Westoby M.* Strategy shifts in leaf physiology, structure and nutrient content between species of high and low-rainfall and high- and low-nutrient habitats // *Funct. Ecol.* 2001. V. 15. P. 423. <https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00542.x>
29. *Poorter H., Evans J.R.* Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area // *Oecologia*. 1998. V. 116. P. 126. <https://doi.org/10.1007/s004420050560>
30. *Way D.A., Katul G.G., Manzoni S., Vico G.* Increasing water use efficiency along the C3 to C4 evolutionary pathway: a stomatal optimization perspective // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 3683. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru205>

УДК 581.1

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПИГМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА СФАГНОВЫХ МХОВ НА ПРИМЕРЕ *Sphagnum papillosum* Lindb.

© 2024 г. А. К. Штанг^{а,*}, Т. И. Пономарева^а, Д. А. Шпанов^а

^аФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова
Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

*e-mail: a_shtang@inbox.ru

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 05.04.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Авторами изучено содержание фотосинтетических пигментов и их соотношение в теплый период года (май–октябрь) и в период с устойчивым снежным покровом (апрель) у сфагнового мха *Sphagnum papillosum* Lindb. на олиготрофном болотном массиве в Архангельской области. Содержание фотосинтетических пигментов уменьшалось от мая к июлю, достигая минимума, а затем вновь возрастало к осени. Содержание пигментов в тканях мха под снегом было сравнимо с июльским минимумом. На основании результатов факторного и кластерного анализов было выдвинуто предположение, что пигментный комплекс *S. papillosum* в первой половине вегетации адаптирован к высокой инсоляции и длинному фотопериоду, что отражают такие показатели как соотношение хлорофиллов *a/b* и доля хлорофиллов в светособирающем комплексе. Кроме того, в ходе вегетации, по-видимому, происходит адаптация пигментного комплекса к условиям увлажнения, зависящим от выпадения атмосферных осадков, особенно в период летнего понижения уровня болотных вод, что отражает соотношение Хл/Кар.

Ключевые слова: *Sphagnum papillosum*, каротиноиды, мохообразные, олиготрофные болота, сезонная динамика, хлорофилл

DOI: 10.31857/S0015330324060101, EDN: LWFPLT

ВВЕДЕНИЕ

Продуктивность — результат всех биохимических процессов растения, но в первую очередь этот показатель основывается на фотосинтезе. Ключевым компонентом фотосинтетического процесса являются пигменты пластид. Информация о содержании фотосинтетических пигментов в растениях применяется исследователями для изучения продукционных процессов через расчет таких показателей как хлорофильный индекс и хлорофильный фотосинтетический потенциал [1]. Состав пластидных пигментов у мохообразных не отличается от такового у сосудистых растений: хлорофиллы *a* и *b* и антенные пигменты — каротиноиды. Несмотря на сходство строения пигментного комплекса мохообразных и сосудистых растений, состав пластидных хлорофилл-белковых комплексов у бриофитов уникален [2]. Кроме того, существенные анатомические отличия мхов от сосудистых растений и их пойкилогидрическая природа [3] позволяют предположить, что существующие сведения о пигментном аппарате сосудистых растений не вполне применимы к мохообразным.

Мохообразные, относящиеся к роду *Sphagnum*, заметно отличаются от прочих бриофитов, как внешне, так и по своей экологии, становясь особенно заметными невооруженным глазом в роли эдификаторов болотных экосистем. Практическое применение мохообразных ассоциируется, в первую очередь, именно со сфагновыми мхами. Известно, что сфагнум традиционно использовался народами мира в качестве влагоудерживающего и воздухопроницаемого материала для изготовления пеленок и повязок для ран, при этом предпочтительнее были, судя по имеющимся сведениям, виды секции *Sphagnum* [3]. Современные исследования подтверждают эффективность использования мохообразных секции *Sphagnum* (таких как *S. papillosum* и *S. magellanicum*) в медицинских целях [4]. В настоящее время сфагновые мхи используются, в основном, для приготовления субстратов для выращивания растений, которым виды секции *Sphagnum*, благодаря вышеперечисленным свойствам, могут придавать необходимую структуру и пористость. Это делает сфагновые мхи перспективным объектом болотного земледелия,

а значит — актуализирует изучение их эколого-физиологических особенностей [5]. В достаточно обширном перечне современных статей в качестве предмета исследования рассматриваются рост и продуктивность сфагновых мхов [6, 7], тогда как исследования, посвященные конкретно фотосинтетическим пигментам сфагновых мхов европейской части России, немногочисленны [8, 9], и лишь малая их часть посвящена изменениям, происходящим в пигментном комплексе мхов с течением времени в меняющихся условиях среды [10, 11]. Еще меньше исследователей уделяют внимание физиологическим изменениям, происходящим в период устойчивого снежного покрова [12], несмотря на то, что существуют свидетельства наличия ростовых процессов у сфагнума в зимнее время [6].

Частым объектом исследований, посвященных теме “sphagnum farming”, является мезоолиготрофный гигрофитный вид *S. papillosum*, широко распространенный в таежной зоне Северного полушария [13]. *Sphagnum papillosum* характеризуется крупными размерами гиалиновых клеток, побегов и капюшоновидных, сильно вогнутых веточных листьев, обеспечивающих одновременно влагоемкость и воздухоемкость общей массы моховой дернины, хотя этот вид и уступает по водоудерживающей способности родственному виду *S. magellanicum*. Средняя продуктивность *S. papillosum* при искусственном выращивании довольно высока и составляет 3.6 т/га в г., что сравнимо с показателями высокопродуктивного вида *S. palustre* (3.4–6.8 т/га в г.) [14, 15]. Мощные, со вздутыми веточками буровато-коричневые побеги *S. papillosum* хорошо идентифицируются в полевых условиях в пределах местообитаний этого вида, к которым относятся мочажины и берега озерков олиготрофных болот, гряды аапа-болот, а также участки осоково-сфагновых болот [16, 17]. Стоит упомянуть, что узнаваемость вида без использования оптических приборов и формирование им достаточно крупных популяций крайне важны при проведении эколого-физиологических исследований мохообразных, поскольку снижают вероятность ошибочного определения вида при массовом отборе растительного материала и позволяют получать необходимые объемы навесок для последующего лабораторного анализа. Исходя из вышеперечисленного, в качестве объекта исследования был выбран *Sphagnum papillosum* Lindb. — представитель секции *Sphagnum*.

Целью работы является характеристика сезонной динамики пигментного комплекса сфагновых мхов на примере вида *S. papillosum*. Для достижения поставленной цели определяли концентрации и соотношения фотосинтетических пигментов в ходе вегетации мхов (с мая по октябрь) и в период устойчивого снежного покро-

ва (апрель). Гипотеза исследования заключается в двух положениях: 1) наибольшему прессингу пигментный комплекс сфагновых мхов подвержен в жаркий период лета с низким уровнем болотных вод, а также под снегом, в холодное время года; 2) благоприятные условия для функционирования пигментного комплекса приходится на начало вегетационного сезона и на осень, когда температура воздуха невысока, а уровень болотных вод достаточно близок к поверхности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Исследование проводили в Приморском районе Архангельской области на Иласском болотном массиве олиготрофного типа (N 64°19'43", E 40°36'45"), состоящем из комплексов, сформированных грядами, мочажинами и озерками. Данные о климате и погоде района проведения исследования были получены с сайтов <https://www.pogodaiklimat.ru/>, <http://www.sevmeteo.ru/>, <http://meteo.ru/> (по метеостанции “Архангельск”), а также <http://www.worldclimateguide.co.uk/>. Отбор побегов *S. papillosum* для проведения лабораторных исследований осуществляли в крупной популяции этого вида, локализованной в центральной части грядово-мочажинного комплекса по краю шейхцериево-сфагновой мочажины, прилегающей к невысокой гряде с высоким проективным покрытием сфагнов, а также вереском и багульником на кочках.

Методы определения фотосинтетических пигментов. Пробы для определения содержания фотосинтетических пигментов отбирали один раз в месяц в период с мая по октябрь 2021 г. В день отбора проб замеряли уровень болотных вод в гидрологическом колодце, расположенном на гряде вблизи пробной площади. Дополнительно мох отбирали в начале апреля 2022 г. Из светло-коричневых неразложившихся частей побегов (визуально определяемых как живые) формировали смешанную пробу путем измельчения и перемешивания мха, после чего проводили экстракцию 80% ацетоном с дальнейшим определением концентрации хлорофиллов и каротиноидов в вытяжке на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония), при 3-кратной биологической и аналитической повторности. Параллельно с экстракцией пигментов в двукратной повторности было определено содержание воды в анализируемых побегах мхов путем высушивания в сушильном шкафу до постоянной массы. Извлеченные из-под снега в апреле, вмерзшие в лед побеги мхов размораживали без доступа света, после чего из них извлекали пигменты тем же способом. Расчет концентрации пигментов производили по формулам, предложенным Lichtenthaler (для 80% ацетона) [18]. Со-

держание пигментов пересчитывали на сухую массу растительного материала. Помимо концентраций пигментов рассчитывали их соотношения и долю хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК) от их общего количества, исходя из предположения о том, что весь хлорофилл *b* находится в ССК ФСII, соотношение хлорофиллов *a/b* в котором составляет 1.2 [18].

Статистический анализ. Для статистического анализа полученных данных использовали усредненные значения температуры воздуха за 10-дневный период, предшествовавший дню отбора проб, и суммарное количество осадков за тот же период [19]. Все необходимые вычисления, включая расчет элементов описательной статистики (среднее арифметическое и стандартное отклонение), проводили в программе Microsoft Excel 2010. Сравнение выборок, кластерный и факторный анализ полученных данных осуществляли в программе SPSS 11. Первичные полученные данные формируют малые выборки, не поддающиеся нормальному распределению, поэтому для их сравнения был выбран непараметрический критерий Краскела-Уоллиса (при $P < 0.05$). Апостериорные сравнения проводили с применением непараметрического критерия U Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Применение поправки Бонферрони, корректирующей уровень статистической значимости рассчитываемого критерия, связано с необходимостью избежать совершения ошибки первого рода при анализе малых выборок [20]. Для определения факторов, характеризующих связь между параметрами пигментного комплекса и микроклиматическими условиями, применяли факторный анализ с использованием метода главных компонент [20]. Для объединения в группы ежемесячных данных по параметрам пигментного комплекса использовали иерархический кластерный анализ с измерением расстояния методом квадрата Евклидова расстояния. Данные, анализируемые с помощью кластерного анализа, из-за разности в шкалах измерения, приводили к единой *z*-шкале [20]. Первичные данные по содержанию пигментов, полученные в апреле, использовали только для сравнения с результатами по другим месяцам, и не включали в прочие статистические анализы, за исключением кластерного анализа соотношения хлорофиллов *a/b* и доли хлорофилла в ССК, в котором не задействованы микроклиматические параметры.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика условий произрастания Sphagnum papillosum

В начале вегетационного сезона (май-июнь) 2021 г. среднемесячная температура воздуха заметно превысила среднемноголетние значения,

кроме того, количество выпавших в мае осадков оказалось выше нормы. В оставшиеся летние месяцы (июль-август) среднемесячная температура была приближена к среднемноголетним значениям, однако количество осадков, выпавших за месяц, вплоть до сентября было ниже нормы. Сентябрь оказался единственным месяцем за рассматриваемый период, когда среднемесячная температура оказалась ниже среднемноголетнего значения. Средняя температура октября 2021 г. была выше среднемноголетнего значения, а количество осадков, выпавших за этот месяц, соответствовало норме. Число дней с осадками за каждый месяц было значительно ниже среднемноголетнего числа дней с осадками. Уровень болотных вод (УБВ) на исследуемой территории демонстрирует тенденцию к снижению от мая к августу, месяцу с минимальным УБВ (–35.8 см), и дальнейшее увеличение к октябрю. В начале и в конце вегетационного сезона УБВ был примерно одинаков и составил –14.7 см в мае и –13 см в октябре (рис. 1).

Погода в мае 2021 г. была неустойчивой, контрастной, с нередкими обильными осадками. Во второй декаде месяца, в период отбора проб дневная температура достигала +30°C, перед отбором выпало значительное количество осадков. Июнь был жарким (до +33°C), осадки в первой половине месяца практически отсутствовали, ночью температура опускалась до –4°C. В первой половине июля сохранялась жаркая и сухая погода (до +33°C днем, до +17°C в ночные часы), но во второй декаде шли кратковременные дожди. К концу третьей декады августа наступило похолодание до +16°C днем и до –4°C ночью, осадки выпадали периодически. Третья декада сентября была теплой и сухой (днем до +12°C, ночью до –5°C), с небольшим количеством осадков. Во второй декаде октября осадки стали регулярными, температура воздуха днем достигала +8°C, ночью –2°C.

Объединение диаграмм, отражающих среднесуточные температуры воздуха и суммы осадков, позволяет отметить на получившемся графике сочетание периодов с высокой среднесуточной температурой и довольно продолжительных периодов с малым или нулевым количеством осадков, распределенных неравномерно в ходе вегетационного сезона 2021 г. (рис. 2).

Гидротермический коэффициент увлажнения Селянинова (показатель влагообеспеченности территории), рассчитанный за период с мая по октябрь 2021 г., составил 1.09, что характеризует условия как слабо засушливые [21].

Содержание воды в образцах сфагнового мха, непосредственно зависящее от условий произрастания в конкретный момент времени, за период проведения исследования изменялось от 86 до 91%. В период с июня по август содержание

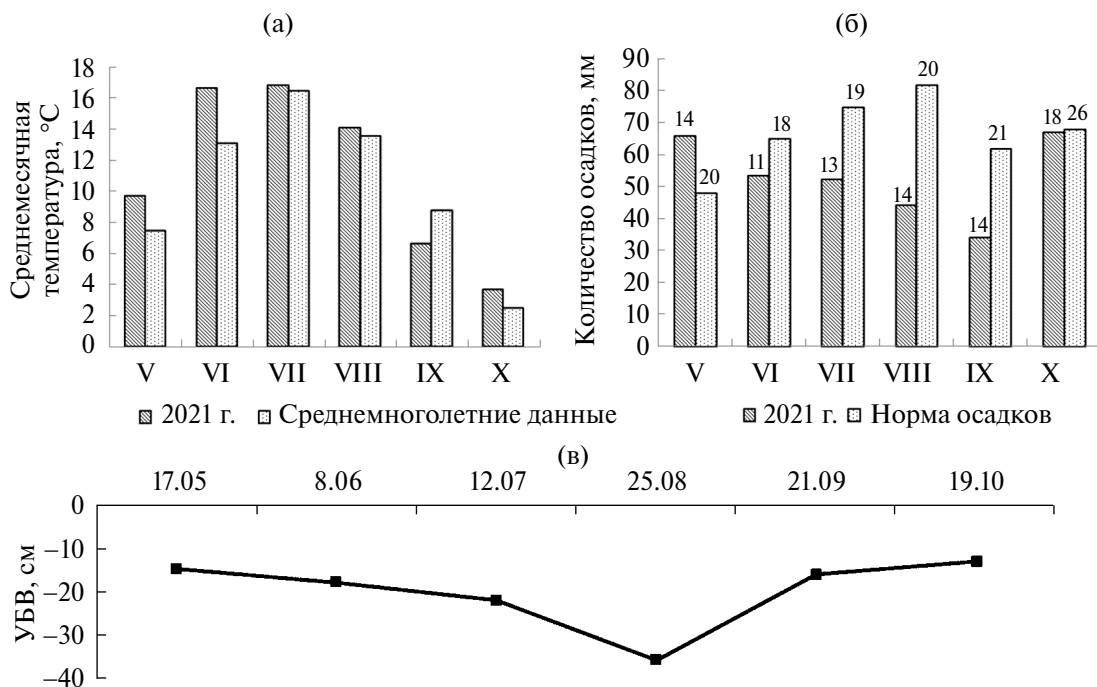


Рис. 1. Гидрометеорологическая характеристика условий произрастания *Sphagnum papillosum* в период с мая по октябрь: (а) — среднемесячная температура воздуха в 2021 г. и согласно среднемноголетним данным; (б) — количество осадков по месяцам в 2021 г. и согласно норме осадков; (в) — уровень болотных вод в 2021 г. Числа над диаграммой количества осадков означают фактическое число дней с осадками (для 2021 г.) и среднемноголетнее число дней с осадками (для нормы осадков).

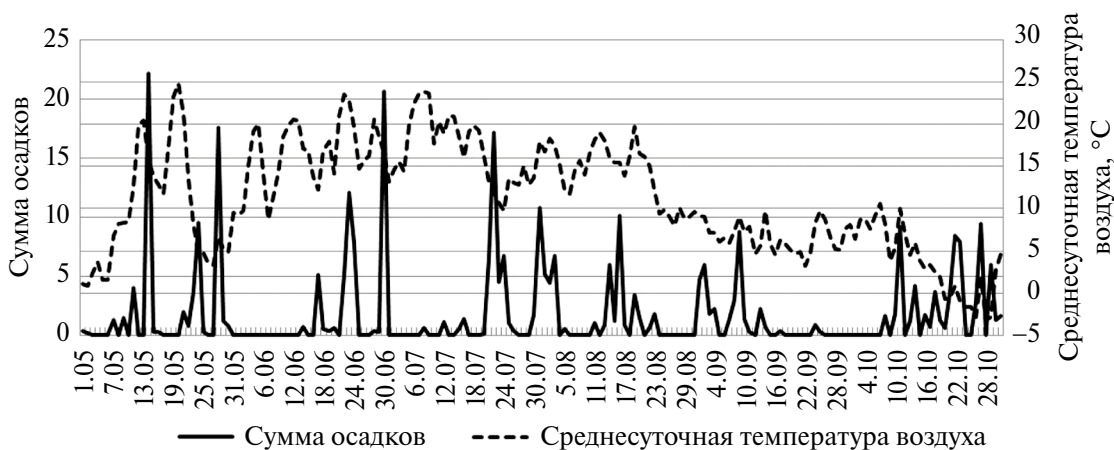


Рис. 2. Динамика суммы осадков и среднесуточной температуры воздуха на Иласском болотном массиве в мае–октябре 2021 г.

воды в побегах было ниже 90%. В мае, сентябре–октябре и в апреле, содержание воды составило 90–91% (табл. 1).

Содержание и соотношения фотосинтетических пигментов

Концентрация хлорофиллов в живых тканях *S. papillosum*, на протяжении всего периода исследования составляла, в среднем, от 0.14 до 0.63 мг/г, а концентрация каротиноидов в этот же период изменялась от 0.07 до 0.31 мг/г. Значительная доля фотосинтетического пигментно-

го комплекса *S. papillosum* представлена хлорофиллом *a* (36–48%) и каротиноидами (30–39%). На долю хлорофилла *b* приходится 19–28% пула фотосинтетических пигментов. Статистически значимые различия в содержании хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов по месяцам обнаружены между значениями июля (минимальная концентрация) и октября (максимальная концентрация) (табл. 1). Соотношение хлорофиллов *a/b* на протяжении всего эксперимента находилось в диапазоне от 1.34 до 2.24, статистически значимых различий по этому показателю по месяцам

Таблица 1. Концентрация фотосинтетических пигментов и их соотношения в тканях мха *S. papillosum*

Дата отбора	Хл <i>a</i> , мг/г сухой массы	Хл <i>b</i> , мг/г сухой массы	Хл (<i>a</i> + <i>b</i>), мг/г сухой массы	Кар, мг/г сухой массы	Хл <i>a/b</i>	Хл/Кар	ССК, %	Содержание воды в побегах мха, %
17.05.21	0.33 ± 0.12	0.16 ± 0.05	0.49 ± 0.17	0.22 ± 0.07	2.12 ± 0.15	2.17 ± 0.12	71 ± 3.3	90
8.06.21	0.20 ± 0.02	0.09 ± 0.004	0.29 ± 0.03	0.17 ± 0.01	2.18 ± 0.15	1.74 ± 0.02	69 ± 3.2	87
12.07.21	0.09 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.07 ± 0.02	2.24 ± 0.29	1.96 ± 0.15	68 ± 6.1	86
25.08.21	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.005	0.17 ± 0.02	0.09 ± 0.01	1.54 ± 0.06	1.80 ± 0.05	87 ± 2.1	88
21.09.21	0.16 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.16 ± 0.03	1.63 ± 0.14	1.61 ± 0.09	84 ± 4.7	91
19.10.21	0.40 ± 0.08	0.23 ± 0.04	0.63 ± 0.13	0.31 ± 0.01	1.75 ± 0.04	2.01 ± 0.33	80 ± 1.1	90
10.04.22	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.09 ± 0.001	1.34 ± 0.06	1.97 ± 0.18	94 ± 2.4	91

Примечание: в таблице приведены среднее арифметическое ± стандартное отклонение значений. Жирным шрифтом выделены выборки, различия между которыми статистически значимы ($P < 0.05$).

выявлено не было. Соотношение хл/кар в мае-октябре и в апреле находилось в пределах от 1.61 до 2.17, при этом статистически значимые различия выявлены между значениями мая (максимум) и сентября (минимум). Доля хлорофиллов в светособирающем комплексе у исследуемого вида сфагнума составила от 69% до 94%, статистически значимых различий не обнаружено.

Взаимосвязь параметров пигментного комплекса и окружающей среды

С целью описания взаимодействия параметров пигментного комплекса мха *S. papillosum* и параметров окружающей среды в сезонной динамике на основании исследованных переменных был применен метод главных компонент с последующим определением физического смысла, выделенных факторов [22]. Результаты факторного анализа представлены в табл. 2, содержащей коэффициенты корреляции исходных переменных с полученными факторами.

Рассчитанные мера выборочной адекватности Кайзера-Мейера-Олкина (0.598) и критерий сферичности Бартлетта ($P \leq 0.05$) указывают на применимость факторного анализа к полученным данным. Кумулятивный процент, накопленный к третьему выделенному фактору, составил 95%, что говорит о состоятельности факторного решения [20].

ОБСУЖДЕНИЕ

Для мохообразных, в целом, характерны низкие концентрации фотосинтетических пигментов, по сравнению с сосудистыми растениями [8], а концентрация пигментов в сфагновых мхах в несколько раз ниже, чем у представителей

других семейств бриофитов [23, 9]. Полученные в ходе данного исследования значения концентрации хлорофиллов и каротиноидов попадают в диапазон, обозначенный в публикациях, касающихся пигментного комплекса сфагновых мхов, при этом величина стандартного отклонения при определении концентраций пигментов в тканях *S. papillosum* оказалась довольно высокой. Подобная вариабельность для мхов увлажненных местообитаний была отмечена и ранее [12, 23]. Мхи, растущие в условиях, в которых они могут испытывать водный дефицит, по-видимому, демонстрируют меньшую вариабельность концентраций пигментов фотосинтеза [27].

Низкая концентрация фотосинтетических пигментов у сфагновых мхов связана с небольшой долей живых клеток листьев, содержащих хлоропласты. Около 75% площади листа у сфагновых мхов составляют мертвые, с порами в клеточной стенке, не имеющие органеллы гиалиновые (водоносные) клетки. Гиалиновые клетки окружают хлорофиллоносные клетки и выполняют функцию резервуаров с водой, позволяющих живым клеткам осуществлять биохимические реакции. Стебель сфагновых мхов практически не участвует в проведении воды, но густо облиственные веточки, плотно прилегающие к стеблю и переплетающиеся веточками соседних побегов, благодаря крупным пористым гиалиновым клеткам, формируют капиллярную сеть, отвечающую за водный режим моховой дернины [24]. Благодаря капиллярному подъему влаги от торфяной залежи побеги *Sphagnum papillosum* способны переживать жаркие и сухие периоды лета, однако головки мхов, подверженные избыточной инсоляции и нагреву могут

быстро терять воду, находясь на открытом воздухе. В июле и августе 2021 г. на Иласском болотном массиве под действием высоких температур и в отсутствие атмосферных осадков произошло обгорание верхушечных веточек сфагнома, что, вероятно, привело к некоторому снижению содержания воды в живой части мха в летний период, а также к деструкции фотосинтетических пигментов, локализованных у сравнительно плотно растущих видов сфагновых мхов, по большей части, в головках побегов.

Состояние пигментного комплекса растений различных местообитаний варьирует в зависимости от освещения, влажности и температуры окружающей среды в разные сезоны года, при этом степень влияния этих факторов на физиологию мхов может изменяться в зависимости уровня стояния болотных вод [25]. Исследователи отмечают низкие концентрации хлорофиллов в середине лета у мохообразных, обитающих в обводненных условиях [3], что, в рамках исследования оказалось справедливым для *S. papillosum*. Гораздо более высокие концентрации пигментов были зарегистрированы в начале и в конце вегетационного сезона. В работе Зарубиной и Коновалова [10] авторы отмечали линейное снижение концентрации хлорофилла *a* у *S. magellanicum* (таксономически близкого *S. papillosum*) от июня к сентябрю. Однако исследование было проведено в сосняке кустарничково-сфагновом, а не на верховом болоте, и в вегетационный период, по температуре и количеству осадков близкий к среднегодовой норме [10].

Соотношение хлорофиллов *a/b* у мохообразных, согласно литературным источникам, составляет, обычно, 2–3, но может быть и больше [3]. Для *S. papillosum* в период проведения исследования соотношение хлорофиллов *a/b* составило 2, что соотносится с имеющимися данными для мохообразных [23]. Считается, что соотношения хлорофиллов *a/b* у растений хорошо освещенных открытых местообитаний обычно превышает 3 [2], в то время как для *S. papillosum* получены значения, считающиеся характерными для сосудистых растений, растущих в тени [26]. Доля хлорофилла в ССК в эксперименте всегда превышала 50%, что, относительно сосудистых растений, считают адаптацией к низкой освещенности, характерной для растений бореальной зоны [27]. Соотношение Хл/Кар, характерное для мохообразных, можно считать высоким (зачастую оно превышает 4), но в нашем эксперименте со *Sphagnum papillosum* соотношение Хл/Кар на протяжении всего исследования не превышало 2.17. Похожие значения соотношения Хл/Кар выявлены у мохообразных, населяющих горную тундру [28], что, в целом, можно связать

с высокой степенью инсоляции, как в горах, так и на открытом верховом болоте.

Начиная с осени и до ранней весны при наступлении заморозков клетки растений могут разрушаться из-за образования внутриклеточного льда. При контакте листьев сфагновых мхов, образованных одним слоем клеток, с внешним льдом происходит циторриз — вода быстро выходит из клеток, в результате чего клетка деформируется. У пойкилогидрических растений, в том числе и у сфагновых мхов, процесс циторриза и восстановление клеток после него происходит очень быстро [29]. В литературе показано, что клетки вида *Sphagnum magellanicum* способны переживать циторриз без повреждений при температуре выше -16.6°C [30]. По данным, полученным с автоматически замерявшего температуру поверхности болота логгера “Термохрон”, сфагновые мхи на Иласском болотном массиве в апреле находились при температуре -0.5°C , а значит, клетки исследуемого вида не были повреждены, несмотря на то, что побеги были извлечены из ледяной прослойки. Тем не менее под снегом, в зимнее время содержание фотосинтетических пигментов снижается до минимальных значений [31], сравнимых с июльским уровнем. В конце осени фотосинтезирующие части побегов сфагновых мхов оказываются под снегом и переживают зиму в практически неизменном состоянии, что позволяет провести определенную аналогию между этими мохообразными и зимне-зелеными травянистыми растениями: для сфагнов, как и для некоторых сосудистых растений, в конце зимы может быть характерен процесс окислительной деструкции фотосинтетических пигментов [32]. Кроме того, мохообразные, по-видимому, имеют определенные минимальные величины содержания пигментов, достигнутые мхом *S. papillosum* в июле и апреле, обеспечивающие функционирование организма в неблагоприятных условиях [8] и позволяющие в нужный момент быстро восстановить фотосинтетическую активность [33]. Исследований, позволяющих корректно сравнить зимние значения содержания пигментов и их соотношений, существует не так много. В работе Marschall и Proctor [34] общее содержание хлорофилла у *S. papillosum* составило, в среднем, 0.27 мг/г [33], что заметно больше полученного нами значения 0.18 мг/г. Соотношение хлорофиллов и каротиноидов также оказалось очень высоким и составило 4.18 [34]. Стоит отметить, что отбор проб в указанном исследовании проводили на территории Великобритании, где средняя температура месяца отбора (января) составляет $+5.4^{\circ}\text{C}$, а значит, на болотах отсутствует мощный снежный покров и промерзающие мочажины. В работе Kuttim с соавт. [12], исследование проводили в Финляндии, в окрестностях г. Оулу.

Средняя температура воздуха в апреле в г. Оулу составляет 0.5°C, что сравнимо с показателями г. Архангельска. Kuttim с соавт. [12], показали, что концентрация хлорофилла *a* в головках *S. magellenicum* в апреле сравнима с значениями сентября и ниже значений ноября, что согласуется с полученными нами результатами. Вместе с тем, для других видов, изученных на болоте в Финляндии, таких как *S. angustifolium* (секция *Cuspidata*) и *S. fuscum* (секция *Acutifolia*) была выявлена несколько другая динамика содержания хлорофилла *a* за то же время [12].

Спектр функций фотосинтетических пигментов позволяет растениям с течением времени приспосабливаться к меняющимся условиям в ходе вегетации. Результаты факторного анализа (табл. 2, 3) отражают некоторые из таких приспособлений.

При анализе первого фактора (ГК 1) сразу обращает на себя внимание тот факт, что в его состав входит большое количество переменных, таких как концентрация каждого из фотосинтетических пигментов, УБВ, температура воздуха и естественная влажность мха. Таким образом, первый фактор показывает, что концентрация пигментов у сфагновых мхов – пойкилогидрических растений, для которых характерен C_3 -фотосинтез, связана с микроклиматическими условиями местообитания (гидро- и терморегим), поэтому фактор ГК 1 можно считать адаптацией сфагнов к гидротермическим условиям эдафотопы. Фактор ГК 2 включает в себя соотношение хлорофиллов *a/b* и долю хлорофилла в светособирающем комплексе, благодаря чему данный фактор можно назвать “Адаптация к сезонным условиям освещенности”. Такие переменные как соотношение Хл/Кар и количество осадков входят в состав фактора ГК 3, которому было дано наименование “Адаптация к режиму атмосферного увлажнения”. Переменные, вошедшие в состав факторов ГК 1 и ГК 2 и отражающие конкретный аспект сезонных изменений пигментного комплекса, были проанализированы отдельно с помощью кластерного анализа с дальнейшим построением дендрограмм (рис. 3 и 4).

Адаптация к сезонным условиям освещенности у *S. papillosum*, согласно полученным данным, связана с соотношением хлорофиллов *a/b* и долей хлорофилла в ССК. В ходе анализа данные были поделены на два кластера (рис. 3). В кластер А были объединены значения, полученные в августе-октябре и в апреле. Кластер В включил в себя значения мая-июля. Вероятно, разделение массива данных на две части связано с сезонным изменением продолжительности светового дня, а вместе с ним – количества поступающей солнечной радиации. В пользу данного предположения говорит наличие положительной кор-

Таблица 2. Значения факторных нагрузок выделенных главных компонент (ГК)

Переменные	ГК 1	ГК 2	ГК 3
Хлорофилл <i>a</i>	0.71		
Хлорофилл <i>b</i>	0.73		
Каротиноиды	0.82		
<i>a/b</i>		0.99	
Хл/Кар			0.82
ССК		–0.99	
УБВ	0.87		
Температура воздуха	–0.87		
Осадки			0.91
Содержание воды в побегах мха	0.68		

Примечание: в таблице приведены только статистически значимые коэффициенты корреляции переменных и выделенных главных компонент ($P \leq 0.05$).

Таблица 3. Интерпретация полученных факторов и их вклад в описание дисперсии рассматриваемых переменных

Фактор (ГК)	Описание	% дисперсии
ГК 1	Адаптация к гидротермическим условиям эдафотопы	36.9
ГК 2	Адаптация к сезонным условиям освещенности	30.4
ГК 3	Адаптация к режиму атмосферного увлажнения	27.2

реляции соотношения хлорофиллов *a/b* и отрицательной корреляции доли хлорофилла в ССК с длиной светового дня ($r_{a/b} = 0.69$, $r_{ССК} = -0.69$, $P \leq 0.05$). Известно, что при высокой интенсивности света при длительном фотопериоде содержание общего хлорофилла у растений снижается [2] (этот процесс можно было наблюдать с мая по июль, когда концентрации пигментов в тканях *S. papillosum* достигали своего минимума в середине лета). В первой половине вегетационного сезона сфагновые мхи на открытых верховых болотах в целом подвержены избыточной инсоляции, а в сухие годы – в еще большей степени, что приводит к замедлению метаболических процессов и даже к полному их прекращению [35]. При более высокой освещенности соотношение хлорофиллов *a/b* выше, а доля хлорофилла в ССК – ниже, что и наблюдается в первой половине вегетационного сезона [36]. Начиная с августа, со снижением интенсивности освещения и длины светового дня, соотношение хлорофиллов *a/b* снижается, а доля хлорофилла в ССК растет. Стоит отметить, однако,

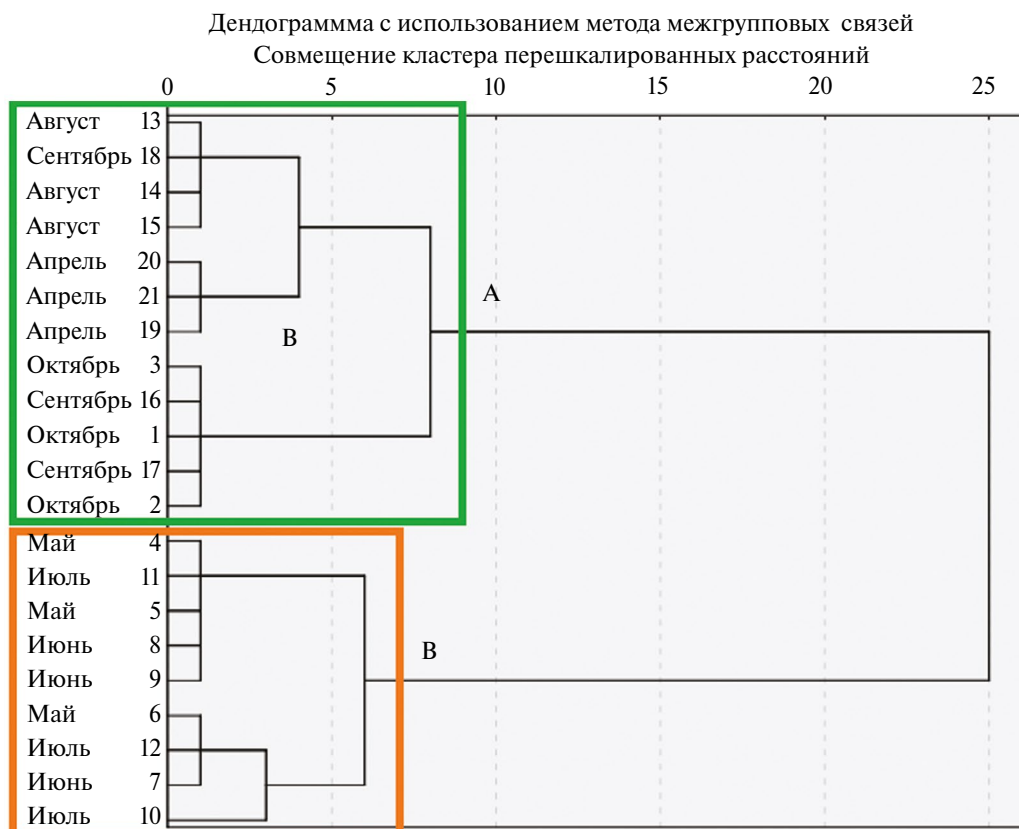


Рис. 3. Дендограмма сходства показателей адаптации мха к сезонным условиям освещенности (соотношение хлорофиллов a/b , доля хлорофилла в ССК) в сезонной динамике. А, В – выделенные кластеры.

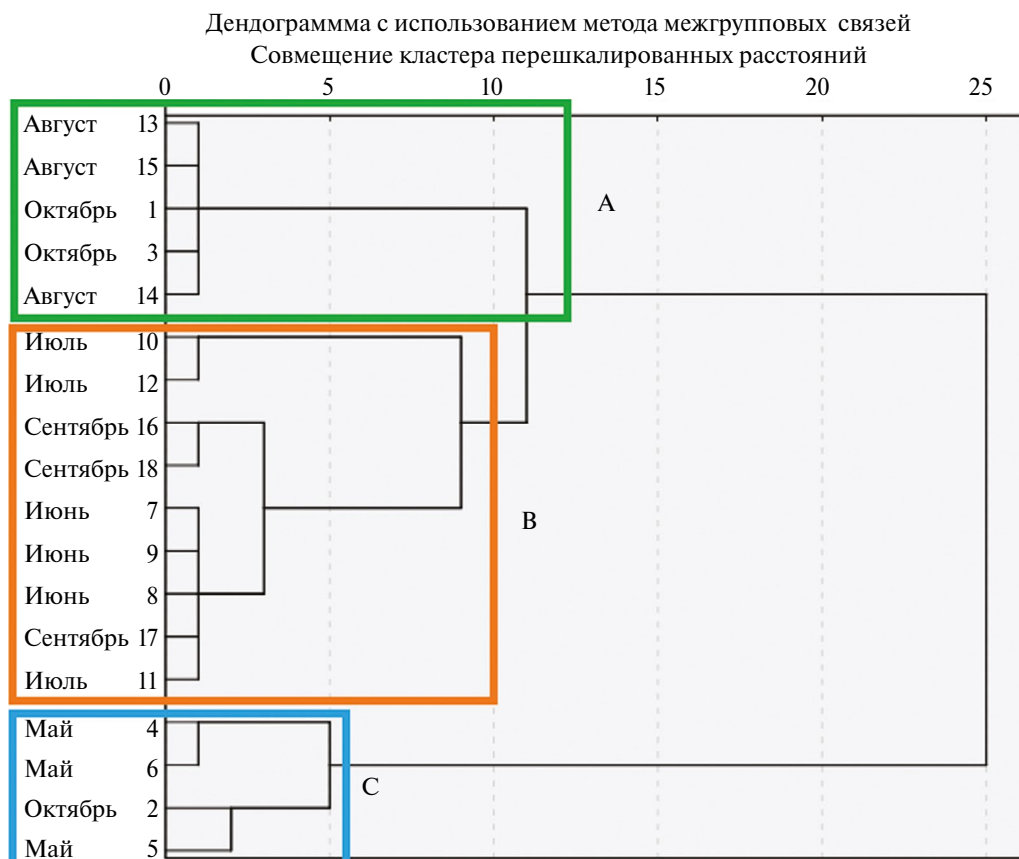


Рис. 4. Дендограмма сходства показателей адаптации мха к режиму атмосферного увлажнения (соотношение Хл/Кар, количество осадков). А, В, С – выделенные кластеры.

что существуют данные о большем количестве хлорофилла, ассоциированного со светособирающими комплексами и меньшем — с реакционными центрами у мохообразных по сравнению с сосудистыми растениями [2], поэтому расчет абсолютных значений доли хлорофилла в ССК по формуле, принятой для сосудистых растений, может быть неточным для мхов.

Фактор, описывающий адаптацию к режиму атмосферного увлажнения у *S. papillosum*, связан с соотношением Хл/Кар и количеством осадков (особенно в условиях летнего снижения УБВ), сезонные значения которых в ходе анализа были поделены на три кластера (рис. 4). Кластеры А и В соответствуют периодам с наибольшим количеством выпавших осадков, а оставшиеся месяцы — периодам с наименьшим количеством. В неблагоприятных условиях, таких как недостаток воды или высокие температуры, хлоропласты растений являются генераторами активных форм кислорода, приводящих к окислительному стрессу [3, 37]. В ответ на окислительный стресс мобилизуется антиоксидантная система растений, включающая в себя каротиноиды, что приводит к увеличению соотношения Хл/Кар [38, 39]. Осень и ранняя весна, напротив, характеризуются благоприятным для функционирования растений с C_3 -типом фотосинтеза сочетанием водного и температурного режимов, что способствует увеличению концентрации пигментов и снижению и снижению соотношения Хл/Кар [3].

В работе Kuttim с соавт. [12], в которой авторы рассматривают ростовые процессы и содержание хлорофилла у сфагновых мхов на верховых болотах в комплексе, обнаруживается положительная корреляция между концентрацией хлорофилла *a* и скоростью линейного прироста в целом для всех видов за весь период исследования. Однако при разделении выборки по видам статистически значимые корреляции были выявлены для двух видов из трех, а при разделении данных по сезонам корреляции отсутствовали полностью [12]. В случае со *S. papillosum*, опираясь на результаты приведенного выше исследования можно предположить, что периоды наиболее интенсивного роста у этого вида совпадают с периодами максимального накопления хлорофилла *a*, а в середине лета происходит замедление всех физиологических процессов, в том числе и ростовых.

Таким образом, показано, что в условиях севера бореальной зоны гидротермический режим и особенности высокоширотного фотопериода олиготрофных местообитаний определяют сезонную динамику и особенности адаптации гигрофитного мха *Sphagnum papillosum*. В слабо засушливых условиях вегетационного сезона

минимальные концентрации пигментов приходятся на жаркую и сухую середину лета. Максимальные концентрации пигментов характерны для весны и осени, вероятно, из-за более благоприятных водно-температурных условий вегетации мхов. Значения концентрации пигментов в период с устойчивым снежным покровом сравнимы с летним минимумом. Соотношение хлорофиллов *a/b* и доля хлорофилла в ССК связаны с адаптацией *S. papillosum* к условиям освещения, различающихся в первой и второй половине вегетационного сезона, вероятно, в связи с изменениями интенсивности инсоляции и длины светового дня. Данные о соотношении Хл/Кар и количестве выпавших осадков отражают адаптацию мха к условиям увлажнения, поскольку в условиях летнего понижения УБВ главным источником воды для болотных мхов являются атмосферные осадки. Полученные результаты, по-видимому, могут быть справедливы для других мхов секции *Sphagnum*, однако для характеристики пигментного комплекса мочажинных и ковровых сфагнов как экологической группы необходимо расширить список объектов, включив в него виды, входящие в другие секции семейства *Sphagnaceae*.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 23-24-10022).

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. Дымова О.В., Головки Т.К. Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология, биологическая активность // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. С. 5.
<https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-4-3-5-16>
2. Aro E.-M. A comparison of the chlorophyll-protein composition and chloroplast ultrastructure in two bryophytes and two higher plants // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1982. V. 108. P. 97.
[https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(82\)80060-3](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(82)80060-3)
3. Glime J.M. Physiological ecology. In: Glime, J. M. Bryophyte Ecology. 2017. Ebook sponsored by Michigan technological university and the international association of bryologists, free access: <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology/>
4. Бабешина Л., Келус Н., Котляр М. История применения сфагновых мхов в медицине // Врач. 2016. № 12. С. 31.
5. Gaudig G., Fengler F., Krebs M., Prager A., Schulz J., Wichmann S., Joosten H. Sphagnum farming in Ger-

- many – a review of progress // Mires and Peat. 2014. V. 13. P. 11.
6. Миронов В.Л. Об экстремальных условиях вегетации *Sphagnum majus* в болотных топях Карелии // Труды ИБВВ РАН. 2017. Вып. 79–82. С. 115. <https://doi.org/10.24411/0320-3557-2017-10057>
7. Миронов В.Л., Кузнецов О.Л., Канцеров Л.В., Кутенков С.А., Игнашов П.А., Талбонен Е.Л., Васюта В.С., Свирида А.Н. Сравнение линейных приростов и первичной продукции сфагновых мхов, полученных с применением трех методов исследований (болотная система Койвуламбисуо, Южная Карелия) // Труды КарНЦ РАН. 2023. № 8. С. 48.
8. Shmakova N.Y., Markovskaya E.F. Photosynthetic pigments of plants and lichens inhabiting arctic tundra of West Spitsbergen // Russ. J. Plant Physiol. 2010. T. 57. P. 764. <https://doi.org/10.1134/S1021443710060038>
9. Шмакова Н.Ю., Марковская Е.Ф. Фотосинтетические пигменты мхов на Западном Шпицбергене // Ботанический журнал. 2012. № 6. С. 791.
10. Зарубина Л.В., Коновалов В.Н. Особенности сезонной динамики пигментов в листьях растений сосняка кустарничково-сфагнового // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2009. № 4. С. 24.
11. Селянина С.Б., Татаринцева В.Г., Зубов И.Н., Кутакова Н.А., Пономарева Т.И. Пигментный состав *Sphagnum fuscum* заболоченных территорий в условиях техногенного воздействия // Изв. Высш. Уч. Зав. Лесной журнал. 2020. № 6. С. 120. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-6-120-131>
12. Küttim M., Küttim L., Ilomets M., Laine A. Controls of *Sphagnum* growth and the role of winter // Ecol. Res. 2020. V. 35. P. 219. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12074>
13. Бабешина Л.Г., Дмитрук В.Н., Дмитрук С.Е. Экологические группы сфагновых мхов Томской области // Доклады ТУСУР. 2004. Т. 1. № 9. С. 61.
14. Pouliot R., Hugron S., Rochefort L. *Sphagnum* farming: A long-term study on producing peat moss biomass sustainably // Ecol. Engin. 2015. V. 74. P. 135. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.10.007>
15. Gaudig G. *Sphagnum* growth and its perspectives for *Sphagnum* farming. Inauguraldissertation zur erlangung des akademischen grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. at.). Stralsund: Universität Greifswald, 2019. 108 p.
16. Носкова М.Г. Полевой атлас-определитель сфагновых мхов таежной зоны Европейской России. Тула: Аквариус, 2016. 112 с.
17. Игнатов М.С., Игнатова Е.А. Флора мхов средней части европейской России. Том 1. Sphagnaceae-Hedwigiaceae. Москва: КМК, 2003. 608 с.
18. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
19. Ivanov L.A., Ronzhina D.A., Yudina P.K., Kalashnikova I.V., Ivanova L.A., Zolotareva N.V. Seasonal dynamics of the chlorophyll and carotenoid content in the leaves of steppe and forest plants on species and community level // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 453. <https://doi.org/10.1134/S1021443720030115>
20. Наследов А.Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. СПб: Питер, 2008. 416 с.
21. Ионова Е.В., Лиховидова В.А., Лобунская И.А. Засуха и гидротермический коэффициент увлажнения как один из критериев оценки степени ее интенсивности (обзор литературы) // Зерновое хозяйство России. 2020. № 6. С. 18. <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2019-66-6-18-22>
22. Михален С.Г., Воробьева Е.М., Судницына Д.Н., Борисов В.В. Использование многомерных методов анализа при изучении динамики биомассы планктонных сине-зеленых, диатомовых и зеленых водорослей в южной части Чудско-псковского озера // Труды КарНЦ РАН. 2022. № 6. С. 133. <https://doi.org/10.17076/lim1626>
23. McCall K.K., Martin C.E. Chlorophyll concentrations and photosynthesis in three forest understory mosses in northeastern Kansas // Bryologist. 1991. № 94. P. 25. <https://doi.org/10.2307/3243713>
24. Rice K.S., Aclander L., Hanson D.T. Do bryophyte shoot systems function like vascular plant leaves or canopies? Functional trait relationships in *Sphagnum* mosses (Sphagnaceae) // Am. J. Bot. 2008. V. 95. P. 1366. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800019>
25. Molchanov A.G. Gas exchange in *Sphagnum* mosses at different near-surface groundwater levels // Russ. J. Ecol. 2015. V. 46. P. 230. <https://doi.org/10.1134/S1067413615030066>
26. Ivanov L.A., Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Yudina P.K. Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural // Russ. J. Plant Physiol. 2013. V. 60. P. 812. <https://doi.org/10.1134/S1021443713050075>
27. Головки Т.К., Дымова О.В., Пыстина Н.В. Адаптогенез фотосинтетического аппарата теневыносливых растений // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2001. С. 77.
28. Шнак О.В. Эколого-физиологическая характеристика некоторых видов мхов в Хибинах. Дисс. ... канд. биол. наук. СПб: Ботанический институт им. В. Л. Комарова, 2008. 96 с.
29. Buchner O., Neuner G. Freezing cytorrhysis and critical temperature thresholds for photosystem II in the peat moss *Sphagnum capillifolium* // Protoplasma. 2010. V. 243. P. 63. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0053-8>
30. Balagurova N., Drozdov S., Grabovik S. Cold and heat resistance of five species of *Sphagnum* // Ann. Bot. Fenn. 1996. V. 33. P. 33.
31. Melick D.R., Seppelt R.D. Seasonal investigations of soluble carbohydrates and pigment levels in antarctic

- bryophytes and lichens // Bryolog. 1994. V. 97. P. 13.
<https://doi.org/10.2307/3243343>
32. 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. 266.
<https://doi.org/10.7868/S001533031401014X>
33. Suleiman A.A.A., Lewis D.H. Carbohydrate metabolism in the leafy liverwort, *Plagiochyla asplenioides* (L.) dum. var. *major* nees. // New Phytol. 1980. P. 45.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb00748.x>
34. Marshall M., Proctor M.C.V. Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids // Ann. Bot. 2004. P. 593.
<https://doi.org/10.1093/aob/mch178>
35. Грабовик С.И., Кузнецов О.Л. Рост и продуктивность сфагновых мхов на естественных и трансформированных болотах Карелии // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 4. С. 59.
<https://doi.org/10.17076/eco290>
36. Dymova O.V., Golovko T.K. Pigment apparatus in *Ajuga reptans* plants as affected by adaptation to light growth conditions // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 39.
<https://doi.org/10.1134/S1021443707010062>
37. Kolupaev Y.E., Karpets Y.V., Kabashnikova L.F. Anti-oxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 441.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
38. Маслова Т.Г., Марковская Е.Ф., Слемнев Н.Н. Функции каротиноидов в листьях высших растений (обзор) // Журнал общей биологии. 2020. Т. 81. № 4. С. 297.
<https://doi.org/10.31857/S0044459620040065>
39. Хозеева Е.В., Зими́на Ю.А., Срослова Г.А. Окислительный стресс растений: химия, физиология, способы защиты // Природные системы и ресурсы. 2020. Т. 10. № 4.
<https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2020.4.4>

УДК 581.1.593.161.42:578.24.262.5

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА КОККОЛИТОФОРИДУ *Emiliania huxleyi* ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В СРЕДЕ

© 2024 г. Л. В. Стельмах^{a,*}, Р. Р. Сагадатов^a, О. С. Алатарцева^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского Российской академии наук”, Севастополь, Россия

*e-mail: lustelm@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2024 г.

После доработки 01.07.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Кокколитофорида *Emiliania huxleyi* была выделена в клоновую культуру из планктона прибрежных вод Черного моря в феврале 2023 г. Штамм альговируса EhV-SS2, поражающий этот вид водорослей, изолирован из прибрежных вод в мае 2023 г. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что вирусные частицы имели форму икосаэдра диаметром 124–174 нм. Выявлено наличие суперкапсида у данного штамма и определен его титр (2.5×10^5 вирионов/мл). Исследовано влияние альговируса на рост и эффективность работы ФС II (F_v/F_m) *E. huxleyi* при различном уровне биогенных элементов в среде. На протяжении латентного периода альговируса (0–101 ч) отмечено снижение отношения F_v/F_m водорослей относительно его значений в контроле. В интервале времени с 101 по 168 ч в культуре появились первые лизированные вирусом клетки, выявленные с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии. В течение периода с 168 по 264 ч процесс лизиса усилился, а его скорость на полной среде f/2 была в пять раз выше, чем при дефиците азота или фосфора. Скорость лизиса клеток на морской воде, лишенной питательных элементов, была в два раза ниже, чем на полной среде. К концу эксперимента (через 264 ч) в инфицированной культуре наблюдались функционально активные клетки, как покрытые кокколитами, так и лишенные их. Доля последних на среде f/2 составила 95%, тогда как при дефиците азота и фосфора она была незначительной.

Ключевые слова: *Emiliania huxleyi*, альговирус, биогенные вещества, максимальная эффективность работы ФС II, сканирующая электронная микроскопия, Черное море

DOI: 10.31857/S0015330324060112, EDN: LWBPTS

ВВЕДЕНИЕ

Кокколитофорида — мелкие одноклеточные планктонные водоросли, одни из наиболее распространенных в Мировом океане эукариотических организмов. Среди них самым массовым видом, вызывающим регулярные обширные “цветения” морских вод, является *Emiliania huxleyi* [1]. В Черном море на ее долю приходится 90–99% биомассы всех кокколитофорид [2]. Особое внимание к этому виду обусловлено его важной ролью в глобальных циклах углерода [3], а также способностью клеток, покрытых известковыми пластинками — кокколитами — осуществлять сильное светорассеяние и изменять оптические свойства вод [4]. Кокколитофорида влияют также на глобальный цикл серы: они продуцируют диметилсульфид (ДМС) — климатически активный газ, который усиливает образование облаков в атмосфере [5].

Наиболее интенсивное “цветение” воды, вызываемое *E. huxleyi*, наблюдается в Черном море, как правило, в конце мая — начале июня [6–8], после чего происходит его деградация. Одной из основных причин гибели функционально активных клеток *E. huxleyi* на завершающей стадии ее интенсивного развития в морских экосистемах является вирусная инфекция [9, 10]. Показано, что в Северном море в период затухания “цветения” *E. huxleyi* почти 50% ее клеток были инфицированы, и основной причиной их гибели являлся вирусный лизис [10], так как заражение литическим вирусом неизбежно приводит к разрушению клеток хозяина [11]. Выявлено, что во время “цветения” *E. huxleyi* в больших открытых мезокосмах вызванный вирусом лизис приводил к гибели от 12 до 100% ее клеток [9]. При этом происходило выделение органических веществ в окружающую среду, где они потребляются,

главным образом, бактериями. Этот процесс называется “вирусным шунтом” [12].

На контакт между альговирусами и их хозяевами существенное влияние оказывают не только свет и температура, но и биогенные вещества [13, 14]. Исследования, проведенные в различных регионах Мирового океана, показали, что в водах, богатых питательными веществами, количество вирусов больше, чем в бедных [15–17]. Показано, что фосфор, азот, а также микроэлементы ослабляют репликацию вирусных частиц. При ограничении концентрации железа в среде продукция вирусов, поражающих микроводоросли, замедляется [18]. Подобные результаты наблюдались при дефиците азота и фосфора [9, 14, 19, 20,]. Однако пока не совсем ясно, недостаток какого элемента — азота или фосфора — в большей мере ослабляет вирусную инфекцию, а значит и лизис клеток водорослей. Поэтому влияние истощения питательных веществ на взаимодействие альговируса и клетки-хозяина является областью, требующей дальнейшего исследования.

Цель работы — изучение влияния вирусной инфекции на структурные и функциональные характеристики кокколитофориды *E. huxleyi* при разном уровне содержания биогенных веществ в воде. Достижение этой цели будет способствовать выявлению факторов среды, определяющих успех контакта альговирусов с водорослями в море.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и содержание культуры водорослей

В качестве объекта исследований была использована альгологически чистая клоновая культура кокколитофориды *Emiliania huxleyi*, выделенная нами из планктона прибрежных вод Черного моря в районе Севастополя в феврале 2023 г. Культуру содержали на пастеризованной морской воде с добавлением питательной среды f/2 [21] в пропорции 1 : 1000 при естественном рассеянном освещении и температуре 17°C. Высокий уровень ее физиологического состояния поддерживали путем еженедельных пересевов в свежую среду.

Изоляция вируса, определение его титра, размеров и некоторых морфологических характеристик

Пробы морской воды объемом 500 мл отбирали из поверхностного слоя Мартыновой бухты (Черное море, Севастопольский район) в точке с координатами 44°37' с.ш. и 33°30' в.д. в мае 2022 г. Воду фильтровали через нуклеопоровую мембрану с диаметром пор 0.2 мкм (РЕАТРЕК-Фильтр, Россия). К культуре *E. huxleyi* объемом 25 мл, находившейся в экспоненциальной фазе роста, добавляли аликвоту полученного фильтрата морской воды в соотношении 1 : 1. В контрольную культуру вносили пастеризован-

ную морскую воду с питательной средой в такой же пропорции. Экспериментальные и контрольные пробирки были инкубированы при естественном рассеянном освещении и температуре 18°C в течение двух недель. Наличие вируса, специфичного для указанного хозяина в тестируемом образце, оценивали на основании лизиса клеток культуры водорослей. Этот процесс был зафиксирован с использованием светового микроскопа Carl Zeiss Primo Star (Carl Zeiss, Германия). В следующих четырех последовательных пассажах наблюдалось сокращение, а затем стабилизация инкубационного периода. Чистый патоген, условно обозначенный нами как EhV-SS2, был получен через два цикла серии 10-кратного разведения вирусных частиц в пробирках объемом 10 мл, содержащих культуру *E. huxleyi*. Лизат из наиболее разбавленных пробирок подвергали центрифугированию при 10000 g в течение 5 мин с использованием центрифуги ОПН-3 при 15°C для удаления разрушенных клеток водорослей, а затем пропускали через нуклеопоровую мембрану (РЕАТРЕК-Фильтр, Россия) с диаметром пор 0.2 мкм. Очищенный лизат, содержащий искомый вирус, хранили при температуре 12°C в темноте.

С целью определения титра вирусного штамма EhV-SS2 проводили серию 10-кратных разведений вирусной суспензии с разведениями от 10^0 до 10^{-9} . Аликвоту из каждого разведения объемом 0.2 мл инокулировали в 1.8 мл экспоненциально растущей культуры водорослей в пяти повторностях. В контрольную культуру добавляли 0.2 мл питательной среды. Процесс лизиса клеток *E. huxleyi* контролировали с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Primo Star. Концентрацию вирусных частиц рассчитывали на основе таблиц наиболее вероятного числа, или MPN-таблиц [22].

Для выявления наличия суперкапсида у вирусных частиц данного штамма суспензию обрабатывали раствором хлороформа в конечной концентрации 10% и выдерживали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем ее центрифугировали при 10000 g и температуре 15°C в течение 10 мин для удаления основной части хлороформа. Образцы оставляли на сутки в открытых пробирках, что позволяло полностью устранить остатки хлороформа из вирусной суспензии [23]. После чего культуру *E. huxleyi* подвергали воздействию вирусных частиц, обработанных хлороформом. В качестве контроля исследовали контакт культуры водорослей с суспензией вируса, которую не обрабатывали хлороформом. Наблюдения проводили в течение недели с помощью световой микроскопии. Все эксперименты были выполнены в трех повторностях. Размеры вирусных частиц и их форму определяли с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Hitachi, Япония).

Исследование влияния вирусной инфекции на *Emiliania huxleyi*

Для оценки влияния альговирусов на микроводоросли при различных уровнях питательных веществ 10 мл культуры *E. huxleyi*, предварительно адаптированной к интенсивности непрерывного света 50 мкЭ/(м² с), помещали в контрольные и опытные колбы объемом 100 мл и разбавляли в 10 раз пастеризованной морской водой, содержащей в первом варианте экспериментов среду f/2. Во втором варианте среда f/2 была лишена нитратов, в третьем — фосфатов, а в четвертом варианте водоросли были помещены в морскую воду без биогенных веществ. В опытные колбы вносили вирусную суспензию в соотношении 1 : 9 по объему. В контрольные колбы к культуре клеток *E. huxleyi* добавляли пастеризованную морскую воду в такой же пропорции. Контрольные и опытные колбы в двух повторностях экспонировали при интенсивности непрерывного света 50 мкЭ/(м² с) и температуре 19°–20°С в течение 264 ч.

В ходе эксперимента из колб отбирали аликвоты в трех повторностях для определения численности клеток и эффективности работы ФС II исследуемой культуры водорослей, а также пробы для выполнения световой и сканирующей электронной микроскопии с интервалом 5 и 19 ч.

Измерение параметров

Подсчет численности клеток *E. huxleyi* в контрольных пробах осуществляли с помощью автоматического счетчика частиц Luna II (Logos Biosystems, Inc., Южная Корея). В опытных образцах водоросли учитывали в камере Горяева с помощью светового микроскопа Olympus CX33 (Olympus, Япония) при общем увеличении 400×. Относительная ошибка расчетов составляла не более 10%.

Суточную величину удельной скорости роста водорослей и скорости их отмирания рассчитывали по формуле:

$$m = \ln(N_t/N_0)/t,$$

где N_0 и N_t — исходная численность клеток и их количество через время t в сутках, кл/мл.

Измерения максимальной эффективности работы ФС II или максимального квантового выхода (F_v/F_m) осуществляли на ПАМ флуориметре Aqua Pen-C AP 110 (Photon System Instruments, Чехия).

Для регистрации вирусов и их воздействия на клетки водорослей использовали сканирующий электронный микроскоп Hitachi SU3500 (Hitachi, Япония). С этой целью экспериментальные пробы объемом 2 мл, содержащие клетки *E. huxleyi* и вирусные частицы, фильтровали через трековую мембрану с диаметром пор 0.4 мкм (РЕАТ-

РЕК-Фильтр, Россия). Чистую вирусную суспензию пропускали через трековую мембрану с диаметром пор 0.03 мкм. Затем образцы обеззараживали с помощью этилового спирта различной концентрации: 20, 30, 50, 75, 96 и 100% [24] и сушили в критической точке (1.5–2.5 ч) с использованием установки Leica EM CPD300 (Leica microsystems, Германия). Для напыления металлов (Au/Pd; 0.5–1.0 мин) применяли прибор Leica EM ACE200 (Leica microsystems, Германия).

Статистический анализ и построение графиков

Обработка данных выполнена в программе Excel 2007 (корпорация Microsoft) для Windows. Были рассчитаны среднеарифметические значения исследуемых параметров и стандартное отклонение. Статистическую значимость различий средних значений определяли по t-критерию Стьюдента. Проверку на принадлежность наблюдаемой выборки нормальной генеральной совокупности проводили по критерию Шапиро–Уилка с использованием программы SigmaPlot 12.1. Построение графиков осуществляли с помощью программы Grafer 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Некоторые характеристики *E. huxleyi* и штамма альговируса EhV-SS2

Здоровые клетки культуры имели форму шара диаметром около 5–7 мкм и были покрыты пластинками, так называемыми кокколитами, диаметром 1–1.5 мкм (рис. 1а). Для культуры, содержащейся до начала эксперимента при естественном рассеянном освещении и температуре 17°С, пока-

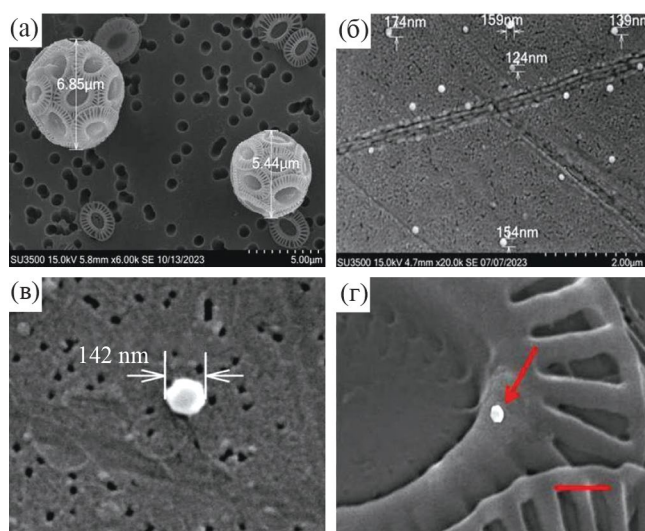


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия здоровых клеток *Emiliania huxleyi* (а) и вирусных частиц штамма EhV-SS2 (б, в, г); стрелкой отмечен вирус на поверхности кокколита, размерная шкала 0.5 мкм (г).

зана высокая эффективности работы ФС II. Среднее значение F_v/F_m составило 0.63 ± 0.02 , что близко к максимально возможным величинам этого параметра для морских микроводорослей.

Результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что вирусные частицы выделенного штамма EhV-SS2 имели форму икосаэдра с диаметром 124–174 нм (рис. 1б–г). Вирусная суспензия, обработанная хлороформом, теряла свою инфекционную активность, в результате чего лизис клеток водорослей не наблюдался. Это может свидетельствовать о наличии суперкапсида у изучаемого вируса. Исходный титр неразбавленной вирусной суспензии составлял $2.50 (\pm 0.16) \times 10^5$ вирусных частиц/мл.

Влияние альговируса на *E. huxleyi* при разном уровне питательных веществ

Начальная численность клеток водорослей во всех вариантах эксперимента составляла 1.00

$(\pm 0.12) \times 10^6$ кл./мл. В контроле на полной среде f/2 наблюдался наибольший прирост клеток культуры. Максимальная их численность, составившая 6.4×10^6 кл./мл, была достигнута через 192 ч от начала эксперимента, а затем постепенно снижалась (рис. 2а). При дефиците азота или фосфора в среде, а также на морской воде без макроэлементов рост водорослей замедлялся, в результате чего численность клеток в максимуме была в 2–2.4 раза ниже, чем на полной среде, после чего наблюдалось ее снижение (рис. 2 б–г).

Исходная численность EhV-SS2 в экспериментах была равна $2.50 (\pm 0.16) \times 10^4$ вирусных частиц/мл. Клетки *E. huxleyi* в присутствии вирусной инфекции показали начало замедления прироста относительно контроля после 53 ч экспозиции, достигнув максимальных значений численности через 101 ч (рис. 2а–г). На полной среде она составила 4.2×10^6 кл./мл, на среде без

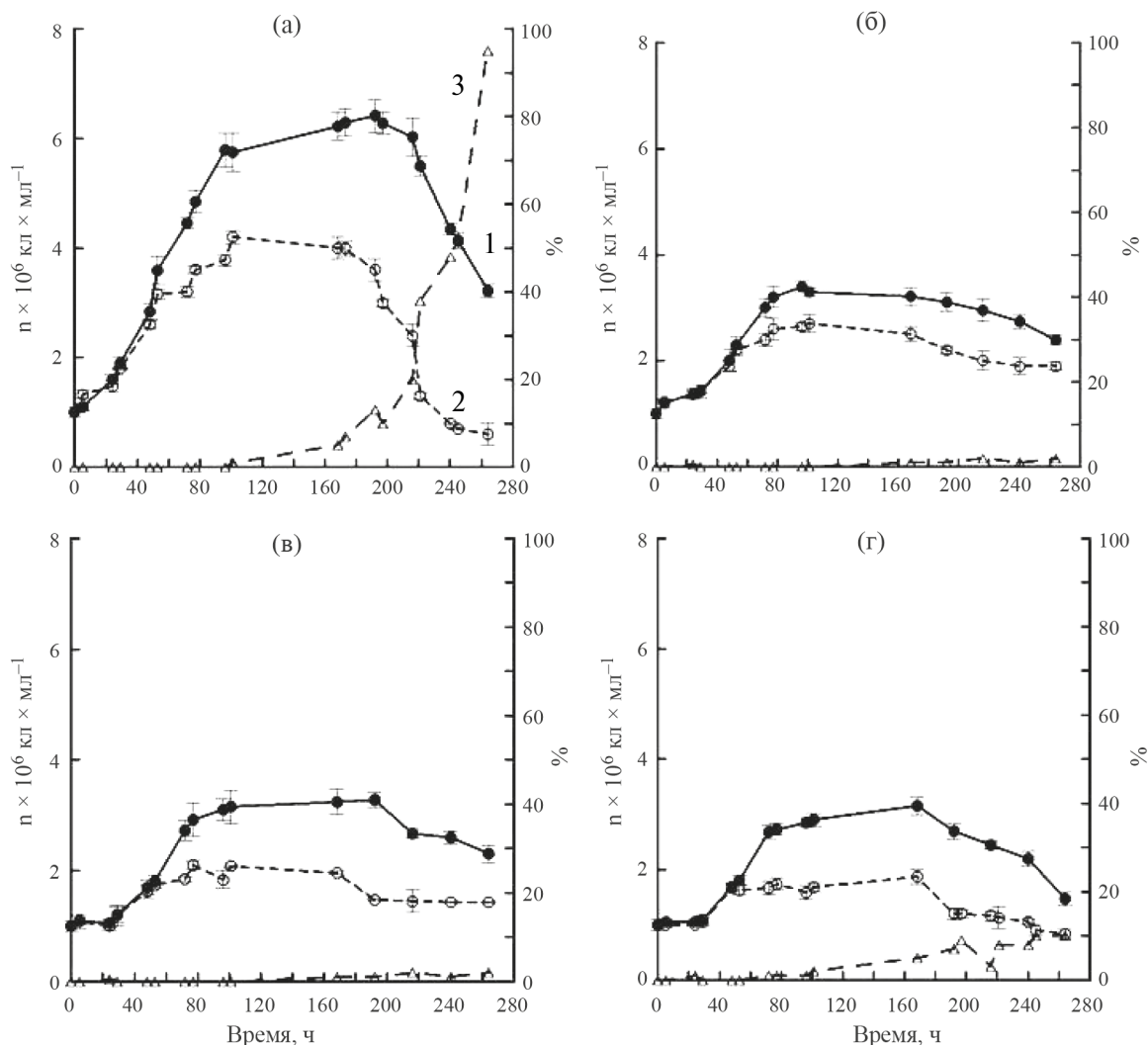


Рис. 2. Динамика численности клеток *Emiliana huxleyi* под влиянием вирусной инфекции: 1 — неинфицированные клетки; 2 — инфицированные клетки; 3 — “голые” клетки; а — полная среда f/2; б — среда без азота; в — среда без фосфора; г — морская вода без биогенных элементов.

азота — 2.7×10^6 кл/мл, на среде без фосфора — 2.1×10^6 кл/мл. На морской воде, лишенной питательных веществ, численность клеток в максимуме была равна 1.7×10^6 кл/мл. За этот временной интервал (53–101 ч) средняя величина удельной скорости роста водорослей составила на полной среде 0.14 сут.^{-1} , на среде без азота — 0.10 сут.^{-1} , без фосфора — 0.09 сут.^{-1} , тогда как на морской воде без азота и фосфора клетки практически не делились. Полученные значения удельной скорости роста были существенно ниже соответствующих контрольных величин (табл. 1). Их различия по критерию Стьюдента были статистически значимы ($P \leq 0.0005$). Отношение F_v/F_m водорослей к концу анализируемого периода (101 ч) в опыте было ниже контрольных значений (рис. 3а–г). Его среднее значение на

полной среде составило 0.48, на среде без азота — 0.51, без фосфора — 0.48 и на морской воде, обедненной по биогенным веществам — 0.47. Полученные величины были достоверно ниже исходного значения F_v/F_m (0.63) согласно критерию Стьюдента. Для всех вариантов опыта последний показатель превышал критические значения ($P \leq 0.026$). Важно отметить, что эффективность работы ФС II как в контроле, так и в опыте в процессе эксперимента в большей мере снижалась при дефиците фосфора, чем азота. Однако эти различия были слабыми.

В интервале времени с 101 по 168 ч в опыте на полной среде и в условиях дефицита азота наблюдалось слабое снижение численности клеток водорослей вследствие их разрушения под действием вирусов. В среде без фосфора и на

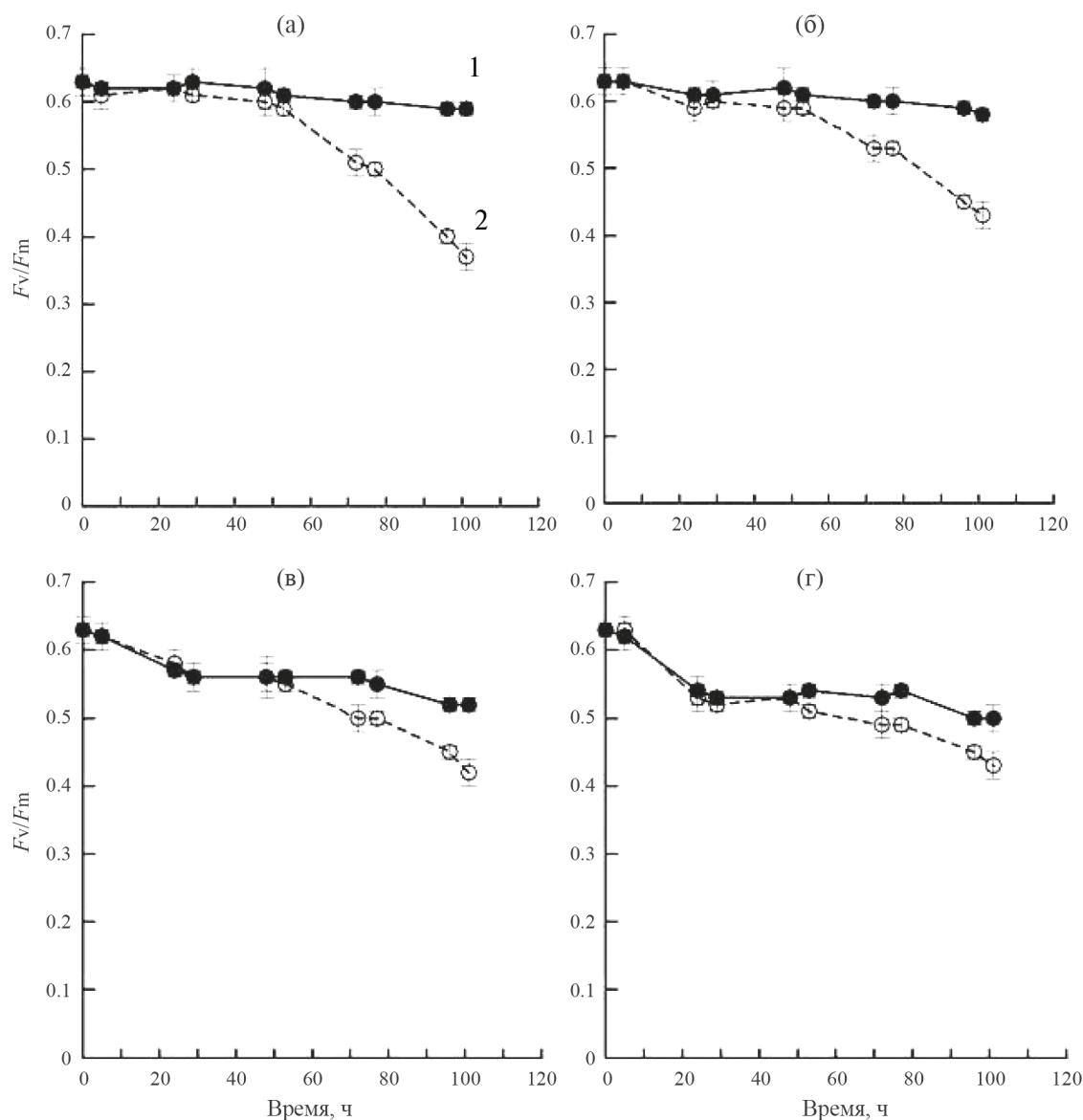


Рис. 3. Динамика максимальной эффективности фотосистемы II (F_v/F_m) под влиянием вирусной инфекции: 1 — неинфицированные клетки; 2 — инфицированные клетки; а — полная среда f/2; б — среда без азота; в — среда без фосфора; г — морская вода без биогенных элементов.

морской воде без биогенных элементов количество водорослей было практически постоянным, однако появились единичные лизированные клетки. В последующий период с 168 по 264 ч на полной среде происходило быстрое отмирание водорослей в результате их вирусного лизиса. При дефиците азота, фосфора или на обедненной по биогенным элементам морской воде этот процесс замедлялся. За указанный временной интервал среднее значение удельной скорости отмирания *E. huxleyi* на среде f/2 составило 0.95 сут.⁻¹, на среде, лишенной азота – 0.19 сут.⁻¹, без фосфора – 0.18 сут.⁻¹. Эти значения были достоверно выше величин в контроле ($P \leq 0.039$), где наблюдалась естественная гибель клеток после достижения стационарной фазы роста. На морской воде без биогенных элементов удельная скорость отмирания водорослей под действием вирусов была равна в среднем 0.44 сут.⁻¹ и достоверно не отличалась от этого показателя в контроле (табл. 1).

Исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии показали, что на стадии отмирания инфицированной вирусом культуры можно было наблюдать различную степень разрушения клеток (рис. 4а–в). Однако часть клеток оставалась живой, а некоторые из них при этом сбрасывали кокколиты (рис. 4 г). Диаметр “голых” клеток был в 2.5–3.5 раза меньше, чем покрытых кокколитами. Относительное их содержание на полной среде к концу эксперимента достигло 95% (рис. 2а), а эффективность работы ФС II, измеренная в это время, свидетельствовала о достаточно высокой степени их функциональной активности ($F_v/F_m = 0.41$). На морской воде доля “голых” клеток через 264 ч была равна 10%, а в условиях дефицита азота или фосфора она снижалась до 1–2%. В это время общая численность культуры в присутствии вирусной инфекции составляла на полной среде 14% от максимального значения. На среде

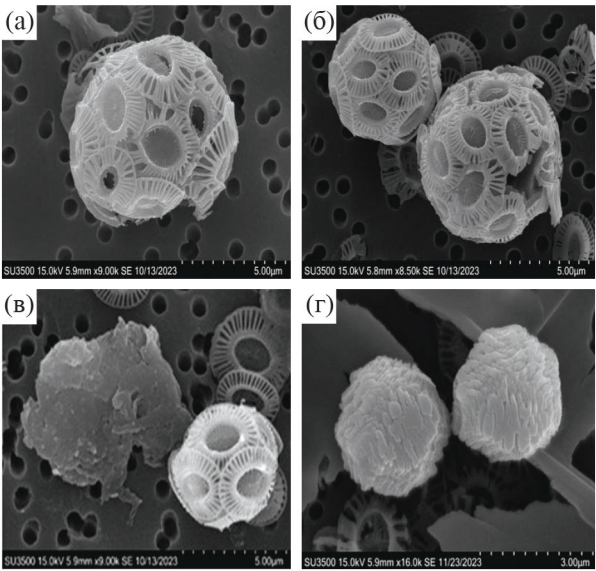


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия клеток *Emiliana huxleyi* на различной стадии поражения вирусной инфекцией: а, б – ранняя стадия; в – поздняя стадия; г – “голые” клетки.

без азота или фосфора она достигла 70%, а на морской воде без минерального питания – 44%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Описанные в литературе штаммы альговируса, поражающего клетки *E. huxleyi* (EhV), имеют форму икосаэдра диаметром от 140 до 200 нм [25–27]. Диаметр вирусных частиц выделенного нами штамма альговируса, обозначенного как EhV-SS2, был близок к этим размерам. Для него, как и для других штаммов, инфицирующих *E. huxleyi*, характерно наличие суперкапсида – дополнительной липидной оболочки, окружающей вирус [25, 28]. Ранее было показано, что разные штаммы EhV имеют большие геномы двухцепочечной ДНК размером примерно 410 кб. Филогенетический анализ генов ДНК-

Таблица 1. Удельная скорость роста и отмирания *E. huxleyi* в присутствии вирусной инфекции (О) и в контроле (К)

Среда	Среднесуточная удельная скорость роста (сут. ⁻¹) за период с 53 по 101 ч		Среднесуточная удельная скорость отмирания (сут. ⁻¹) за период с 168 по 264 ч	
	К	О	К	О
f/2	0.24 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.95 ± 0.09
f/2-N	0.20 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.19 ± 0.02
f/2-P	0.25 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.02
Без f/2	0.24 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.38 ± 0.05*	0.44 ± 0.04*

Примечание. Представлены средние значения и стандартное отклонение
* – достоверные отличия между опытом и контролем отсутствовали.

полимеразы этих вирусов позволил заключить, что они принадлежат к семейству альговировусов *Phycodnaviridae* [25].

Одним из факторов, влияющих на успех контакта альговировусов с водорослями, является исходная численность вирионов в среде. Низкий титр последних вызывает существенное увеличение продолжительности латентного периода, т.е. времени начала выхода вирусных частиц из клеток хозяина при их разрушении. По нашим данным, при оптимальных условиях начало гибели клеток *E. huxleyi* под действием литического вируса с исходным титром в экспериментах 2.5×10^4 вирусных частиц/мл наблюдалось лишь через 101 ч от начала исследования. При этом опубликованные нами ранее результаты [14] показали, что при более высоком исходном титре вируса ($\geq 10^7$ вирионов/мл), поражающего зеленую микроводоросль *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara, этот процесс начинался через 40 ч. Подобные результаты получены и в экспериментах по исследованию контакта литического вируса EhV1 с клетками *E. huxleyi* [29]. В рамках наших исследований латентный период, составивший 101 ч, условно можно разделить на два интервала. В течение первого временного интервала (0–53 ч) прирост численности клеток *E. huxleyi* в опыте и контроле был одинаков. В течение второго интервала (с 53 по 101 ч) наблюдалось замедление прироста водорослей. Величина F_v/F_m к концу этого интервала на полной среде была на 37% меньше контроля, на среде без азота – на 26%, на среде без фосфора – на 19% и на морской воде без биогенных элементов – на 14%. Это позволило нам заключить, что вирусная инфекция проявляет наибольшую активность в клетках водорослей в условиях достаточного содержания биогенных элементов. Следует отметить, что в целом влияние инфицирования вирусом культуры исследуемой кокколитофориды на параметр F_v/F_m было слабым. Вероятно, это связано с тем, что переменная флуоресценция хлорофилла свойственна только неинфицированным клеткам, а также клеткам на самых ранних стадиях поражения вирусом, тогда как лизированные клетки неспособны к этому и не вносят вклад в сигналы, на основании которых рассчитывается величина F_v/F_m . Как отмечено в работе [29], успешное инфицирование культуры *E. huxleyi* литическим вирусом приводит не только к снижению величины F_v/F_m , но и к быстрой деградации клеточных компонентов, а также к повышению экспрессии белка метакаспазы, что способствует, по мнению авторов, облегчению процесса лизиса клеток хозяина.

Даже при высокой исходной численности вирусов в среде успех их контакта с микроводорослями зависит от ряда биотических и абиоти-

ческих факторов. Среди биотических факторов следует отметить численность клеток хозяев альговировусов. По мере увеличения этого параметра происходит сокращение латентного периода патогена и усиление его репликации в водорослевых клетках [30, 31]. Важную роль играет физиологическое состояние водорослей, от которого зависит их чувствительность к вирусу. В экспоненциальной фазе роста они в большей мере подвержены инфицированию, чем в стационарной фазе [32]. В наших экспериментах по исследованию влияния альговировуса EhV-SS2 на культуру кокколитофориды *E. huxleyi* начальная численность клеток водорослей была высокой (1×10^6 кл/мл) и при этом соответствовала экспоненциальной фазе роста для заданных условий. Структура вирионов также влияет на скорость процесса инфицирования их хозяев. Латентный период для альговировусов, образованных на основе двухцепочечной ДНК, более короткий по сравнению с вирусами, содержащими одноцепочечную РНК [33].

Установлено, что такие макроэлементы как фосфор и азот, а также микроэлементы, например железо, влияют на репликацию вирусных частиц. Когда концентрация железа ограничена, выработка водорослевых вирусов замедляется [34]. В нашем исследовании показано, что на полной среде f/2 лизис клеток водорослей под действием вируса происходит с наибольшей скоростью, а при дефиците азота или фосфора замедляется примерно в пять раз. Однако в ряде работ обнаружено, что роль азота и фосфора в регуляции вирусного инфицирования водорослей неодинакова. Некоторые авторы полагают, что фосфор играет основную роль в этих процессах. Они отмечают, что в условиях низкого его содержания в воде продукция вирусов в клетках *E. huxleyi* снижалась на 70% относительно контроля [9], в клетках *Micromonas pusilla* это значение было меньше на 80%, а латентный период увеличился на 150% [19]. Однако по данным других авторов, проводившим эксперименты по контакту водорослевых вирусов с культурой *Phaeocystis globosa*, дефицит азота тормозил процессы вирусного заражения ее клеток в большей степени, чем дефицит фосфора [20]. Подобные результаты получены нами при исследовании влияния вирусного патогена на культуру зеленой водоросли *T. viridis* [14]. Показано, что отсутствие азота в среде приводило к снижению скорости гибели клеток, пораженных вирусом в 3.2 раза относительно контроля, тогда как в случае дефицита фосфора этот процесс замедлялся в 2.4 раза. Такие различия можно объяснить тем, что для воспроизводства вирусных частиц требуется в 6 раз больше азота, чем фосфора. Выявлено, что стехиометрия C : N : P у вирусов составляет примерно 17 : 6 : 1

[35]. Это также означает, что потребности в азоте и фосфоре у них существенно больше, чем у микроводорослей, у которых подобное соотношение при оптимальных условиях равно 106 : 16 : 1 [36]. Можно предположить, что в зависимости от содержания азота и фосфора в морской воде активность альговирuses будет меняться, что в разной степени повлияет на клетки хозяина, а значит и на структуру фитопланктонного сообщества.

Установлено, что ФС II микроводорослей чувствительна к дефициту как фосфора, так и азота. Причем недостаток последнего, как правило, в большей мере влияет на эффективность ее работы. Однако у некоторых видов водорослей флуоресцентные параметры, отражающие функционирование фотосистемы, при недостатке фосфора ниже, чем при дефиците азота [14, 37], что показано и в данной работе. Кроме того, по нашим данным, в контроле при отсутствии в среде обоих элементов значения F_v/F_m исследуемой кокколитофориды к концу эксперимента были ниже, чем при наличии одного из них. Это может означать, что ее физиологическое состояние на морской воде, лишенной азота и фосфора, ухудшается в наибольшей степени. Вероятно, по этой причине вирусный лизис клеток *E. huxleyi*, содержащейся на морской воде без биогенных элементов, происходил гораздо быстрее, чем при дефиците азота или фосфора.

К концу нашего эксперимента в опытных склянках, несмотря на присутствие литического вируса, были отмечены живые клетки водорослей. На полной среде, где выявлен наиболее интенсивный лизис культуры, их относительное содержание было минимальным, тогда как на среде без азота или фосфора — максимальным. Промежуточная величина получена на морской воде, лишенной биогенных веществ. Среди них наблюдались так называемые “голые” клетки, лишенные кокколита. Их наибольшее относительное количество, достигшее 95%, отмечено на полной питательной среде, тогда как на морской воде без биогенных веществ оно было почти в 10 раз меньше, а в условиях дефицита азота или фосфора составляло 1–2%. Эти клетки были неподвижны и обладали достаточно высокой функциональной активностью. Как отмечено ранее [38], неподвижные “голые” клетки культуры *E. huxleyi*, находившейся в контакте с литическим вирусом, были диплоидными и, по мнению авторов, являлись устойчивыми к действию данного патогена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изолированный из прибрежных вод Черного моря альговирс, условно обозначенный как EhV-SS2, является одним из крупнейших

известных науке водорослевых вирусов. Его продолжительный латентный период (101 ч), зарегистрированный нами во всех вариантах эксперимента по появлению в культуре *E. huxleyi* первых лизированных клеток, обусловлен относительно низким исходным титром. Он был на четыре порядка ниже максимально возможного титра вирусов, поражающих данную кокколитофорику. Самая высокая скорость вирусного лизиса наблюдалась на полной среде f/2. Дефицит фосфора или азота приводил к снижению скорости гибели инфицированных клеток. Это, вероятно, связано с ослаблением репликации вирусных частиц в них в условиях дефицита одного из питательных веществ. Скорость вирусного лизиса как при отсутствии азота, так и фосфора была практически одинакова. В то же время максимальная эффективность работы ФС II лизированных клеток водорослей была более чувствительна к дефициту фосфора, чем азота. На морской воде без обоих биогенных элементов гибель инфицированных вирусом клеток происходила быстрее, чем при дефиците одного из них. Это связано, вероятно, с наибольшим ухудшением функционального состояния водорослей и устойчивости к патогену в заданных условиях. Полный лизис культуры *E. huxleyi* к концу эксперимента не наблюдался даже на среде f/2, а 95% ее клеток были лишены кокколита, что можно рассматривать как защитную реакцию водорослей на действие вирусной инфекции. Можно предположить, что в море в зависимости от содержания биогенных веществ в воде активность альговирuses, поражающих *E. huxleyi*, будет меняться, что в разной степени повлияет на клетки хозяина, а значит и на структуру фитопланктонного сообщества, важной частью которого является эта мелкая кокколитофориды.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 24-27-20014 и города Севастополя “Трансформация структуры и функциональных характеристик черноморского фитопланктона у берегов Крыма в современных экологических условиях. Фундаментальная роль и прикладное значение”.

Авторы выражают искреннюю благодарность ведущему инженеру ИнБЮМ Бабич И.И. за помощь при выполнении данной работы.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо экспериментов с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tyrrell T., Merico A. *Emiliania huxleyi*: bloom observations and the conditions that induce them // Coccolithophores: from molecular processes to global

- impact / Eds. H.R. Thierstein, J.R. Young. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2004. P. 75. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4_4
2. Mikaelyan A.S., Silkin V.A., Pautova L.A. Coccolithophorids in the Black Sea: their interannual and long-term changes // Russ. Acad. Sci. Oceanol. 2011. V. 51. P. 39. <https://doi.org/10.1134/S0001437011010127>
 3. Broecker W., Clark E. Ratio of coccolith CaCO_3 to foraminifera CaCO_3 in late Holocene deep sea sediments // Paleooceanography. 2009. V. 24. P. PA3205. <https://doi.org/10.1029/2009PA001731>
 4. Brown C.W., Yoder J.A. Coccolithophorid blooms in the global ocean // J. Geophys. Res. Oceans. 1994. V. 99. P. 7467. <https://doi.org/10.1029/93JC02156>
 5. Taylor A.R., Brownlee C., Wheeler G. Coccolithophore cell biology: chalking up progress // Ann. Rev. Mar. Sci. 2017. V. 9. P. 283. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-034032>
 6. Mikaelyan A.S., Pautova L.A., Pogosyan S.I., Sukhanova I.N. Summer bloom of coccolithophorids in the northeastern Black Sea // Oceanology. 2005. V. 45. P. 127.
 7. Stelmakh L., Gorbunova T. *Emiliania huxleyi* blooms in the Black Sea: influence of abiotic and biotic factors // Botanica. 2018. V. 24. P. 172. <https://doi.org/10.2478/botlit-2018-0017>
 8. Silkin V., Pautova L., Podymov O., Chasovnikov V., Lifanchuk A., Fedorov A., Kluchantseva A. Phytoplankton dynamics and biogeochemistry of the Black Sea // J. Mar. Sci. Eng. 2023. V. 11. P. 1196. <https://doi.org/10.3390/jmse11061196>
 9. Bratbak G., Egge J.K., Heldal M. Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1993. V. 93. P. 39. <https://doi.org/10.3354/meps093039>
 10. Brussaard C.P., Kempers R.S., Kop A.J., Riegman R., Heldal M. Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliania huxleyi* in the North Sea // Aquat. Microb. Ecol. 1996. V. 10. P. 105. <https://doi.org/10.3354/ame010105>
 11. Brussaard C.P. Viral Control of phytoplankton populations - a review // J. Eukaryot. Microbiol. 2004. V. 51. P. 125. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00537.x>
 12. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000. V. 64. P. 69. <https://doi.org/10.1126/MMBR.64.1.69-114.2000>
 13. Mojica K.D., Brussaard C.P. Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 89. P. 495. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12343>
 14. Stelmakh L.V., Sagadatova R.R., Alartartseva O.S. The effect of viral infection on the Black Sea microalgae *Tetraselmis viridis*: the role of nutrients and copper ions // Funct. Plant Biol. 2024. V. 51. P. FP23114. <https://doi.org/10.1071/FP23114>
 15. Evans C., Brussaard C.P. Regional variation in lytic and lysogenic viral infection in the Southern Ocean and its contribution to biogeochemical cycling // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 6741. <https://doi.org/10.1128/AEM.01388-12>
 16. Clerissi C., Grimsley N., Subirana L., Maria E., Oriol L., Ogata H., Moreau H., Desdevises Y. Prasinovirus distribution in the Northwest Mediterranean Sea is affected by the environment and particularly by phosphate availability // Virology. 2014. V. 466. P. 146. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.016>
 17. Mojica K.D., Huisman J., Wilhelm S.W., Brussaard C.P. Latitudinal variation in virus-induced mortality of phytoplankton across the North Atlantic Ocean // ISME J. 2016. V. 10. P. 500. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.130>
 18. Slagter H.A., Gerringa L.J., Brussaard C.P. Phytoplankton virus production negatively affected by iron limitation // Front. Environ. Sci. 2016. V. 3. P. 156. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00156>
 19. Maat D.S., Crawford K.J., Timmermans K.R., Brussaard C.P. Elevated CO_2 and phosphate limitation favor *Micromonas pusilla* through stimulated growth and reduced viral impact // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 3119. <https://doi.org/10.1128/AEM.03639-13>
 20. Maat D.S., Brussaard C.P. Both phosphorus-and nitrogen limitation constrain viral proliferation in marine phytoplankton // Aquat. Microb. Ecol. 2016. V. 77. P. 87. <https://doi.org/10.3354/ame01791>
 21. Guillard R., Ryther J. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella Nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (CLEVE) Gran // J. Can. Microbiol. 1962. V. 8. P. 229. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
 22. Jarvis B., Wilrich C., Wilrich P-T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 109. P. 1660. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x>
 23. Arsenieff L., Simon N., Rigaut-Jalabert F., Le Gall F., Chaffron S., Corre E., Com E., Bigeard E., Baudoux A-C. First viruses infecting the marine diatom *Guinardia delicatula* // Front. Microbiol. 2019. V. 9. P. 3235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03235>
 24. Bratbak G. Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy // Handbook of methods in aquatic microbial ecology / Eds. P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole. Boca Raton: CRC Press. 1993. P. 309.
 25. Schroeder D.C., Oke J., Malin G., Wilson W. Coccolithovirus (Phycodnaviridae): characterization of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliania huxleyi* // Arch Virol. 2002. V. 147. P. 1685. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0841-3>
 26. Castberg T., Thyraug R., Larsen A., Sandaa R-A., Heldal M., Van Etten J.L., Bratbak G. Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliania huxleyi* (Haptophyta) // J. Phycol. 2002. V. 38. P. 767. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.02015.x>
 27. Vaughn J.M., Balch W.M., Novotny J.F., Vining C.L., Palmer C.D., Drapeau D.T., Booth E., Vaughn Jr. J.M.,

- Kneifel D.M., Bell A.L.* Isolation of *Emiliana huxleyi* viruses from the Gulf of Maine // *Aquat. Microb. Ecol.* 2010. V. 58. P. 109. <https://doi.org/10.3354/ame01375>
28. *Mackinder L.C.M., Worthy C.A., Biggi G., Hall M., Ryan K.R., Varsani A., Harper G.M., Wilson W.H., Brownlee C., Schroeder D.C.* A unicellular algal virus, *Emiliana huxleyi* virus 86, exploits an animal-like infection strategy // *J. Gen. Virol.* 2009. V. 90. P. 2306. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011635-0>
 29. *Bidle K. D., Haramaty L., Barcelos e Ramos J., Falkowski P.* Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore *Emiliana huxleyi* // *PNAS.* 2007. V. 104. P. 6049. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701240104>
 30. *Clasen J.L., Elser J.J.* The effect of host *Chlorella* NC64A carbon: phosphorus ratio on the production of *Paramecium bursaria* *Chlorella* Virus-1 // *Freshw. Biol.* 1995. V. 52. P. 112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01677.x>
 31. *Wilhelm S.W., Matteson A.R.* Freshwater and marine viroplankton: a brief overview of commonalities and differences // *Freshw. Biol.* 2008. V. 53. P. 1076. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01980.x>
 32. *Nagasaki K., Tomaru Y., Tarutani K., Katanozaka N., Yamanaka S., Tanabe H., Yamaguchi M.* Growth characteristics and intraspecies host specificity of a large virus infecting the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 2580. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2580-2586.2003>
 33. *Lawrence J.E., Brussaard C.P.D., Suttle C.A.* Virus-specific responses of *Heterosigma akashiwo* to infection // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 7829. <https://doi.org/10.1128/AEM.01207-06>
 34. *Slagter H.A., Gerringa L.J.A., Brussaard C.P.D.* Phytoplankton virus production negatively affected by iron limitation // *Front. Environ. Sci.* 2016. V. 3. P. 156. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00156>
 35. *Jover L.F., Effler T.C., Buchan A., Wilhelm S.W., Weitz J.S.* The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. P. 519. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3289>
 36. *Redfield A.C., Ketchum B.H., Richards F.A.* The composition of seawater: comparative and descriptive oceanography // *The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas* / Ed. N.M Hill. New York, USA: Interscience. 1963. P. 26.
 37. *Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., Grossman A.R.* The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiol.* 1998. V. 117. P. 129. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.129>
 38. *Frada M.J., Rosenwasser S., Ben-Dor S., Shemi A., Sabanay H., Vardi A.* Morphological switch to a resistant subpopulation in response to viral infection in the bloom-forming coccolithophore *Emiliana huxleyi* // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. P. e1006775. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006775>

УДК 581.1

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИЧНОСТИ ЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *LARIX SIBIRICA*

© 2024 г. И. Н. Третьякова^{a, *}, Н. В. Орешкова^{a, b, c}, М. Э. Пак^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра

“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр

“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

^cФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

*e-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024 г.

После доработки 04.07.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

В статье излагаются результаты исследования по генетической идентичности генотипов по 21 микросателлитному локусу дерева-донора, полученной от него эмбриогенной клеточной линии (КЛ6), клонов, выращенных из КЛ6 и эмбриогенной КЛ22.27.1, эксплант (зиготический зародыш) для которой был получен в результате контролируемого опыления клона пыльцой материнского дерева-донора. Проведенное генотипирование по ядерным микросателлитным локусам дерева-донора и КЛ6 показало частичную идентичность выявленных аллелей по большинству исследованных локусов. Изменчивость отдельных локусов в образцах свидетельствует о проявлении отцовского генотипа привнесённой пыльцой, которое неизбежно возникает при свободном опылении. Генотипы образцов хвои клонов полностью соответствовали КЛ6. У КЛ22.27.1 по большинству локусов были выявлены аллели, не встречающиеся в родительских генотипах. Только 2 локуса были идентичны родительским генотипам. Высокая частота мутаций в полученной клеточной линии свидетельствует о ее геномной нестабильности.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, дерево-клон, клеточные линии, микросателлитные маркеры, соматический эмбриогенез

DOI: 10.31857/S0015330324060123, EDN: LWBDSR

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проводятся активные исследования по соматическому эмбриогенезу хвойных в культуре *in vitro* [1–4]. Применение соматического эмбриогенеза в сочетании с криоконсервацией и геномной селекцией послужило основой для получения хозяйственно ценных генетически тестированных клонов и элитных генотипов. На основе биотехнологии соматического эмбриогенеза было создано новое перспективное направление — сортовое плантационное лесовыращивание (Международная программа Multi-Varietal Forestry (MVF)) [5].

Для успешного сортового лесовыращивания необходимо проведение оценки генетической идентичности эмбриогенных клеточных линий и клонированных из них растений. Высокие концентрации регуляторов роста в среде и длительность культивирования могут оказать влияние на качество эмбриогенных культур и полученное

потомство. В ряде работ было показано, что эмбриогенные культуры растений могут характеризоваться соматической изменчивостью [6, 7].

Молекулярные маркеры, в частности микросателлиты (SSR-маркеры), долгое время являются признанным инструментом для оценки популяционной изменчивости, анализа генетической структуры популяций, определения родства, ДНК-идентификации. Ввиду высокой скорости мутирования, кодоминантного характера наследования, равномерного распределения по геному и высокой воспроизводимости они получили широкое применение в изучении генетического разнообразия растений, в том числе хвойных видов [8, 9].

Соматический эмбриогенез — уникальное явление в развитии растений. Этот процесс является наглядным примером тотипотентности растительных клеток, и с помощью него можно изучать молекулярные основы эмбриогенной

дифференцировки и регуляции развития растительных клеток *in vitro*. Применение клеточной и генной инженерии в бесполой репродукции через соматический эмбриогенез позволит контролировать этот процесс фундаментально, эффективно и точно.

Показано, что соматический эмбриогенез идет под строгим генетическим контролем. Только отдельные деревья доноры способны формировать эмбриогенные культуры и соматические зародыши *in vitro* [10–12].

Изучение генетической идентичности эмбриогенных культур и соответствие их родительским генотипам имеет большое значение не только для анализа соматической изменчивости, но и для исследования генома хвойных в целом.

В связи с этим, целью данной работы была оценка генетической идентичности, путем генотипирования микросателлитных (SSR) локусов, у некоторых эмбриогенных клеточных линий и деревьев-клонов лиственницы сибирской.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования послужила хвоя материнского дерева-донора А4 и восьмилетних клонов № 8 и № 10, полученных из клеточной линии 6, а также эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) КЛ6 (возраст культуры 12 лет, свободное опыление дерева-донора А4) и КЛ22.27.1 (возраст культуры 1 год, контролируемое опыление дерева-клона 8 пыльцой дерева-донора А4, рис. 1).

Биотехнология соматического эмбриогенеза

Биотехнология соматического эмбриогенеза для *Larix sibirica* излагалась нами ранее [13].

Она включала 5 этапов: инициация ЭСМ, пролиферация эмбриогенных культур (регулярное субкультивирование), созревание соматических зародышей, прорастание и акклиматизация клонированных семян [14].

Микросателлитный анализ

Препараты тотальной ДНК для микросателлитного анализа были выделены из хвои деревьев, клонов и эмбриональной суспензорной массы. Клеточные линии выделялись модифицированным методом с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) [15]. Всего было проанализировано 4 образца в двух повторностях.

Оценку качества выделенной ДНК проводили при помощи спектрофотометра NanoPhotometer P 330 IMPLN. Для оценки чистоты и качества нуклеиновых кислот при спектрофотометрическом измерении, чистоту образца определяли, исходя из соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Оптимальные значения соотношения A_{260}/A_{280} в наших образцах ДНК составляли 1.8–2.0. Значения менее 1.8 могут указывать на загрязнение образца полипептидами, более 2 – на возможную деградацию и наличие свободных нуклеотидов.

Оценка количества выделенной ДНК проводили с использованием настольного флуориметра Qubit (“Invitrogen”, США) (http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/Qubit-all-file-types.Par.0519.File.dat/Qubit-2-Fluorometer-User-Manual.pdf) и буферных растворов, необходимых для работы Qubit dsDNA BR Assay Kit (“Invitrogen”, США). Для дальнейшей работы отбирали образцы высококачественной ДНК с концентрацией не менее 20–30 нг/мкл.

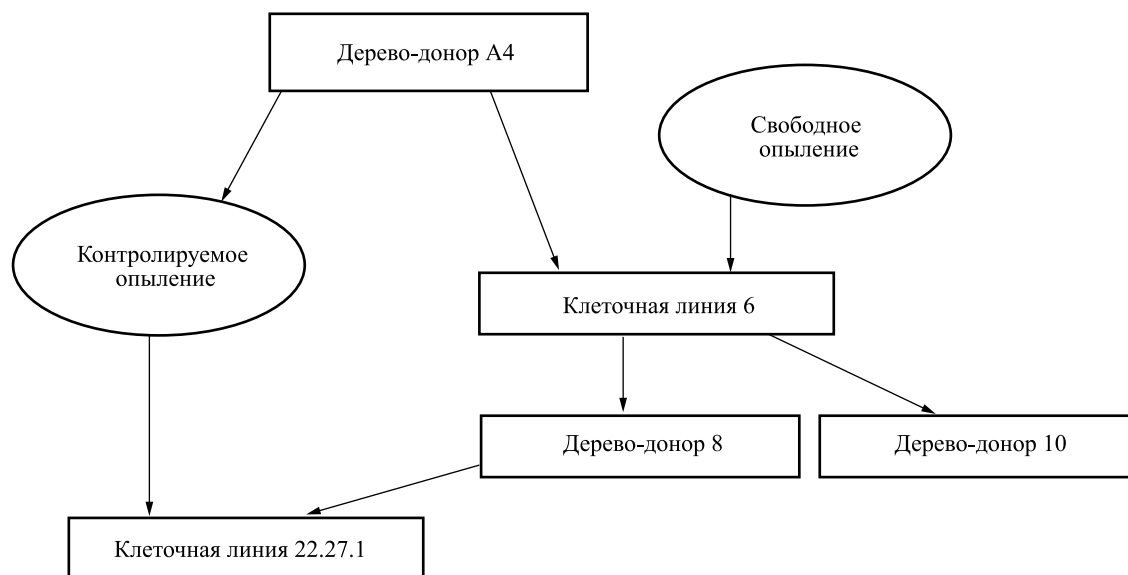


Рис. 1. Схема принадлежности исследуемых образцов.

Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с 21 парой олигонуклеотидов-праймеров, разработанных ранее для микросателлитных последовательностей лиственницы японской (*L. kaempferi*) [16], лиственницы западной (*L. occidentalis*) [17] и лиственницы сибирской (*L. sibirica*) [18]. Описание отобранных для исследований микросателлитных локусов и условия ПЦР-амплификации приведены в табл. 1.

Для проведения ПЦР использовали готовые реакционные смеси для амплификации ДНК “GenePak PCR Core” (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия), содержащие ингибированную для “горячего старта” Taq-ДНК-полимеразу, дидеоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния. ПЦР-амплификацию проводили на приборе ДНК-амплификатор T100 ThermalCycler

(“Bio-Rad”, США). Программа амплификации включала первичную денатурацию в течение 1 мин при 94°C, затем 9 циклов “touchdown” с понижением на 1°C каждый цикл: 30 с при 94°C, 30 с при 63°C, 1 мин при 72°C, далее 24 цикла без “touchdown”: 30 с при 94°C, 30 с при 53°C, 30 с при 72°C; финальная элонгация составляла 10 мин при 72°C.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6% полиакриламидном геле с использованием трис-EDTA-боратного электродного буфера в камерах для вертикального электрофореза. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали с помощью системы гельдокументирования Gel Imager-2 (“Хеликон”, Россия). Молекулярный вес фрагментов определяли путем сопоставления со стандартным маркером в программе

Таблица 1. Ядерные микросателлитные локусы, отобранные для генотипирования образцов лиственницы сибирской.

Локус	Мотив и число его повторов в референсном геноме	Размер фрагмента, №	t°C отжига	Источник литературы
<i>bcLK 056</i>	AG ₍₂₀₎	174–200	Touchdown 63°–53°C	[16]
<i>bcLK 066</i>	TG ₍₁₂₎	155–172		
<i>bcLK 189</i>	AG ₍₁₇₎ AT(AG) ₍₇₎	162–196		
<i>bcLK 224</i>	AG ₍₁₇₎	152–168		
<i>bcLK 225</i>	GA ₍₂₀₎	180–213		
<i>bcLK 232</i>	AG ₍₁₉₎	142–178		
<i>bcLK 260</i>	TG ₍₁₄₎ AG ₍₉₎	115–126		[17]
<i>UBCLXtet_1–22</i>	TATC ₍₉₎ TA ₍₁₂₎	175–250		
<i>Ls_417667</i>	AAT ₍₁₆₎	207–243		[18]
<i>Ls_840190</i>	TAC ₍₁₅₎	216–249		
<i>Ls_954234</i>	ATT ₍₁₅₎	171–204		
<i>Ls_611965</i>	CAG ₍₁₈₎	222–276		
<i>Ls_752897</i>	AAG ₍₁₅₎	216–264		
<i>Ls_1247092(2)</i>	CTT ₍₁₉₎	201–228		
<i>Ls_3765334</i>	GAG ₍₁₇₎	174–213		
<i>Ls_1008427</i>	ATAG ₍₁₃₎	152–174		
<i>Ls_2672894</i>	TTTG ₍₁₁₎	152–164		
<i>Ls_2552367</i>	CTAT ₍₁₀₎	184–196		
<i>Ls_980491</i>	CTAT ₍₁₂₎	204–240		
<i>Ls_3952800</i>	TATG ₍₁₀₎	200–264		
<i>Ls_305132</i>	GTCGGA ₍₇₎	210–240		

Photo-Capt. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанной рестриктазой *HpaII*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коллекция пролиферирующих эмбриогенных культур (ЭК) лиственницы сибирской Института леса им. В.Н. Сукачева (ФИЦ КНЦ СО РАН) состоит из 54 клеточных линии (КЛ), полученных в разные годы (2008–2023 гг.) от шести генотипов в результате свободного и контролируемого опыления. Из них 22 клеточные линии в течение 8–14 и более лет продуцируют массовые соматические зародыши. Из КЛ6, инициированной в 2011 г., получены клоны деревьев лиственницы, которые отличались быстрым ростом и сверххранним развитием генеративных органов [4].

Проллиферирующая КЛ6, сохраняла жизнеспособность до 12 лет. У этой КЛ происходило образование глобулярных соматических зародышей и их размножение через кливаж (при регулярном субкультивировании). При переводе фрагментов эмбриогенной ткани этой клеточной линии на среду АИ для созревания с АБК (32 мг/л) зародыши в течение 45–60 дней созревали (13 ± 3 шт/г ЭСМ), а затем прорастали. Таким образом, способность к регенерации у КЛ6 сохранялась около 12 лет. КЛ 22.27.1 была получена в 2022 г. в результате контролируемого опыления дерева-клона № 8 пыльцой материнского дерева А4. КЛ22.27.1 успешно пролиферировала. Эмбриональная масса ее состояла из глобулярных зародышей (рис. 2а). На среде АИ с АБК шла дифференцировка соматических зародышей до их полного созревания (рис. 2б) и прорастания (рис. 2в). Число зрелых семядольных зародышей у КЛ22.27.1 составило – 26 ± 4.6 шт/г ЭСМ.

Микросателлитный анализ

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа дерева-донора (А4), деревьев-клонов (№ 8 и № 10) и клеточных линий (КЛ6, КЛ22.27.1) лиственницы сибирской выяснилось, что 9 (*bcLK 066*, *bcLK 224*, *bcLK 232*, *bcLK 260*, *UBCLXtet 1–22*, *Ls 417667*, *Ls 3765334*, *Ls 2672894*, *Ls 980491*) из 21 локусов оказались мономорфными во всех исследованных образцах.

Остальные 12 локусов проявили себя как полиморфные (табл. 2). Причем по 8 локусам (*bcLK 056*, *bcLK 225*, *Ls 840190*, *Ls 752897*, *Ls 1247092*, *Ls 1008427*, *Ls 2552364* и *Ls 305132*) КЛ6 была гомозиготной. У локусов *bcLK 189*, *Ls 2552364*, *Ls 3952800* в КЛ6 только один аллель соответствовал материнскому дереву А4. По локусам *Ls 954234*, *Ls 611965* КЛ6 оказалась гетерозиготной с двумя аллелями идентичными мате-

ринскому генотипу. А по локусу *bcLK 225* у этой клеточной линии выявлены 2 аллеля, отличные от материнского дерева.

В целом, проведенное генотипирование по микросателлитным локусам КЛ6 показало, что выявленные аллели по большинству локусов соответствовали материнскому дереву-донору. Измененные аллели КЛ6, наблюдаемые у отдельных локусов, скорее всего, свидетельствуют о проявлении отцовского генотипа, которое неизбежно возникало при свободном опылении.

Анализ генотипов по тем же самым локусам у КЛ22.27.1 показал несколько иную картину. Стоит отметить, что КЛ22.27.1 была получена от дерева-клона № 8 при контролируемом опылении пыльцой дерева-донора А4. При генотипировании у КЛ22.27.1 только по локусу *Ls 611965* был выявлен генотип (222/213) полностью идентичный родительским деревьям. По локусам *bcLK 056*, *Ls 752897*, *Ls 1008427*, *Ls 305132* у клеточной линии был выявлен один аллель не встречающийся в родительских генотипах. В локусах *bcLK 189*, *Ls 840190*, *Ls 2552364*, *Ls 3952800* в гомозиготном генотипе КЛ22.27.1 сходство выявлено по одному из аллелей родительских деревьев. У локуса *Ls 954234* в гетерозиготном генотипе выявлен один аллель сходный с родительскими, а второй совершенно отличный. А в локусах *bcLK 225* и *Ls 1247092* были выявлены генотипы, отличающиеся от родительских образцов. В данном случае измененные аллели у КЛ22.27.1, наблюдаемые по ряду локусов скорее всего, свидетельствуют о высоком уровне геномной нестабильности и высокой частоте мутаций в полученной клеточной линии. Подобные результаты по изучению культиви-

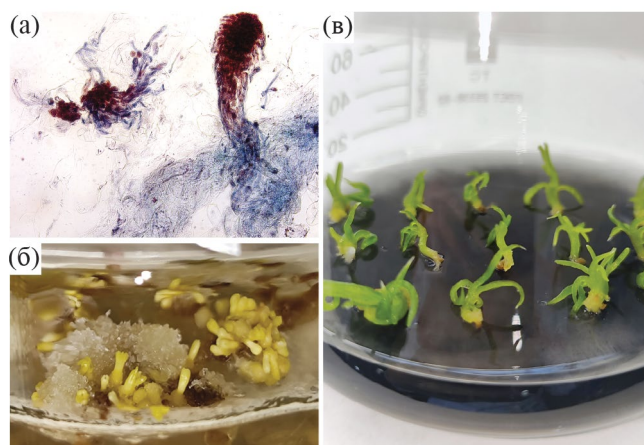


Рис. 2. Соматические зародыши (СЗ) лиственницы сибирской (КЛ22.27.1) на разных стадиях онтогенеза: (а) – глобулярные СЗ на среде для пролиферации, (б) – дифференцированные семядольные СЗ на среде для созревания, (в) – 14-дневные регенеранты на среде для прорастивания.

Таблица 2. Полиморфные микросателлитные локусы и их генотипы при изучении дерева-донор, эмбриональных клеточных линий и деревьев-клонов.

Образцы	<i>bcLK 056</i>	<i>bcLK 189</i>	<i>bcLK 225</i>	<i>Ls₋840190</i>	<i>Ls₋954234</i>	<i>Ls₋611965</i>	<i>Ls₋752897</i>	<i>Ls₋1247092</i>	<i>Ls₋1008427</i>	<i>Ls₋2552364</i>	<i>Ls₋3952800</i>	<i>Ls₋305132</i>
Дерево-донор А4	147/147	168/168	206/206	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/267	222/222
Дерево-донор А4	147/147	168/168	206/206	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/267	222/222
КЛ6	147/147	168/164	182/182	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/182	295/295	222/222
КЛ6	147/147	168/164	182/182	240/240	207/183	222/213	249/249	217/217	152/152	182/182	295/295	222/222
Дерево-клон 8	147/147	168/164	182/182	240/237	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
Дерево-клон 8	147/147	168/164	182/182	240/237	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
Дерево-клон 10	147/147	168/164	182/182	240/240	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
Дерево-клон 10	147/147	168/164	182/182	240/240	207/207	222/213	249/249	217/217	152/152	182/214	295/295	222/222
КЛ 22.27.1	167/147	164/164	164/164	240/240	207/192	222/213	249/240	229/229	152/176	182/182	295/295	222/210
КЛ 22.27.1	167/147	164/164	164/164	240/240	207/192	222/213	249/240	229/229	152/176	182/182	295/295	222/210

рования *in vitro* мегагаметофитов лиственницы сибирской ранее были описаны в работе Крутовского К. В. с соавт. [19].

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка генетической идентичности эмбрионных клеточных линий очень важна для успешного создания клонированных растений [4, 6, 7]. В ряде работ было показано, что эмбрионные культуры видов хвойных могут характеризоваться генотипической нестабильностью [10, 20].

Высокая частота мутаций и генетическая нестабильность по ядерным микросателлитным локусам была ранее отмечена в эмбрионных клеточных линиях некоторых древесных — сосны приморской (*Pinus pinaster* Aiton) [21], сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) [20], пихты кефалинийской (*Abies cephalonica* Loudon) [22], дубов пробкового (*Quercus subres* L.) и чересчатого (*Quercus robur* L.) [23, 24].

У эмбрионных культур лиственницы Маршлинса (*Larix marschlinii* Grot) [25], лиственницы европейской (*L. decidua* Mill.) [26, 27], лиственницы японской (*L. leptolepis* Gonf.) [28], ели обыкновенной (*Picea abies* L.) [29], сосны черной (*Pinus nigra* J.F.Arnold) [30], сосны лучистой (*Pinus radiata* D.Don) [31] была обнаружена полиплоидия. Появление полиплоидных клеток при соматическом эмбриогенезе также было отмечено в культуре мегагаметофитов лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill.) [32].

В проведенных нами ранее исследованиях по соматической изменчивости гаплоидной культуры тканей *in vitro*, полученной из мегагаметофитов лиственницы сибирской была выявлена высокая частота соматического мутагенеза и генетическая гетерогенность после двух месяцев культивирования. Из шести клеточных линий, только четыре линии оказались гаплоидными [19]. Однако при изучении гаплоидных культур хвойных видов следует принять во внимание тот факт, что мегагаметофиты этого класса растений представлены не только гаплоидными клетками. На стадии образования целлюлярного (клеточного) гаметофита, наряду с гаплоидными клетками, происходит образование диплоидных и даже полиплоидных клеток [33].

Вместе с тем, в других работах в некоторых эмбрионных культурах елей (*P. abies*, *P. glauca*, *P. mariana* × *P. glauca*, *P. orientalis*) и сосны приморской (*Pinus pinaster*) соматическая изменчивость не была обнаружена [34–37]. У ели обыкновенной генетических вариаций не было замечено на всех стадиях соматического эмбриогенеза — от ЭСМ до растений регенерантов [34]. Генетическая стабильность была так же обнаружена у регенерирующих растений сосны Эл-

лиота (*Pinus elliotii* Engelm.) [38]. У большинства регенерантов *Pinus massoiana* мутаций в тестируемых локусах SSR не наблюдалось [12].

Проведенный нами ранее цитогенетический анализ эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* показал, что молодые КЛ в возрасте до 1 г. могут сохранять цитогенетическую стабильность и содержать в кариотипе нормальное для данного вида диплоидное число хромосом ($2n = 24$). В длительно пролиферирующих КЛ накапливаются мутации и происходит изменение числа хромосом ($2n = 25$; $2n = 26$). У таких КЛ сохраняется способность формировать соматические зародыши. В наших коллекционных клеточных линиях выделяется КЛ6, которая в возрасте 6–12 лет являлась цитогенетически стабильной с диплоидным числом хромосом $2n = 24$ [39, 40]. Генетическая стабильность КЛ6 была подтверждена микросателлитным анализом. Не соответствия материнскому генотипу данной КЛ наблюдалось только по двум аллелям из одиннадцати локусов [16]. Относительная генетическая стабильность КЛ6 была показана и в настоящем исследовании. Именно из этой клеточной линии были получены клоны деревьев № 8 и № 10, которые по данным микросателлитного анализа, полностью идентичны данной КЛ. Следовательно, такие клеточные линии можно использовать для получения посадочного материала в плантационном лесовыращивании при постоянном генетическом контроле.

Однако, проведенное контролируемое опыление клонов пыльцой дерева-донора и получение КЛ показало генетическую нестабильность у КЛ22.27.1, в которой наблюдалась высокая частота мутаций. С этой клеточной линией требуется дополнительная цитогенетическая работа.

Следовательно, проведение регулярного цитогенетического и микросателлитного контроля очень важно при клонировании растений через соматический эмбриогенез. При этом необходимо выявлять генетическую стабильность или нестабильность клеточных культур. Выявление клеточных линий с измененным хромосомным набором представляет большой интерес для генетики хвойных растений, а также вносит вклад в развитие теоретических аспектов репродуктивной биологии и в целом биологии развития растений.

Таким образом, соматический эмбриогенез является важной биотехнологией в размножении хвойных видов, в том числе для разработки и производства сортов деревьев с желательными селекционными признаками. Данная технология может быть успешно реализована в крупномасштабном коммерческом производстве. Наиболее важным преимуществом производства хвойных деревьев методом соматического эмбриогенеза является то, что эмбрионные

клеточные линии могут быть криогенно сохранены в ювенильном состоянии неограниченно долго, что было невозможно при других методах размножения деревьев.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта (№ 22-14-20008).

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M.A., Trontin J.F. Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 // In vitro embryogenesis in higher plants. Humana Press, New York, NY. 2016. P. 131. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_7
2. Chen T.T., Wu X.Q., Ye J.R., Shen L.Y., Zhu L.H. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of disease-resistant *Pinus massoniana* Lamb. // J. Nanjing For Univ. 2019. V. 43. P. 1.
3. Peng Ch., Gao F., Wang H., Tretyakova I.N., Nosov A.N., Shen H., Yang L. Morphological and physiological indicators for screening cell lines with high potential for somatic embryo maturation at an early stage of somatic embryogenesis in *Pinus koraiensis* // Plants. 2022. V. 11. P. 1867. <https://doi.org/10.3390/plants11141867>
4. Tretyakova I.N., Park M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forest. 2023. V. 14. P. 1920. <https://doi.org/10.3390/f14091920>
5. Park Y.-S. Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry. In: Fenning T. (ed) Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century // Forestry Sciences, Springer, Dordrecht. 2014. V. 81. P. 425. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7076-8_17
6. Bordallo P.N., Silva D.H., Maria J., Cruz C.D., Fontes E.P. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars // Hort Bras. 2004. V. 22. P. 300. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362004000200027>
7. Iakshmanan V., Venkataramareddy S.R., Neelwarne B. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers // Electron J. Biotech. 2007. V. 10. P. 106. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue1-fulltext-12>
8. Krutovsky K.V., St.Clair J.B., Saich R., Hipkins V.D., Neale D.B. Estimation of population structure in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*) using allozyme and microsatellite markers // Tree Gen. Gen. 2009. V. 5. P. 641. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0216-y>
9. Echt C.S., Saha S., Krutovsky K.V., Wimalanathan K., Erpelding J.E., Liang Ch., Nelson C.D. An annotated genetic map of loblolly pine based on microsatellite and cDNA markers // BMC Genetics. 2011. V. 12. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-12-1>
10. MacKay J.J., Becwar M.R., Park Y.-S., Corderro J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding // Tree Gen. Gen. 2006. V. 2. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2>
11. Carneros E., Celestino C., Klimasewska K., Park Y.S., Toribio M., Bonga J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2009. V. 98. P. 165. <https://doi.org/10.1007/s11240-0-009-9549-3>
12. Xia X.R., Yang F., Ke X., Chen Y.M., Ye J.R., Zhu L.H. Somatic embryogenesis of masson pine (*Pinus massoniana*): initiation, maturation and genetic stability analysis at SSR loci // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2021. V. 145. P. 667. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02036-z>
13. Третьякова И.Н. РФ Патент 2456344. 2012.
14. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Орешкова Н.В., Падутов В.Е. Регенерационная способность клеточных линий лиственницы сибирской в культуре *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. 2022. N. 6. P. 585. <https://doi.org/10.31857/S1026347022050195>
15. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. V. 12. P. 12.
16. Isoda K., Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // Mol. Ecol. 2006. V. 6. P. 664. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01291.x>
17. Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T., Kenawy A., Newton C.H., El-Kassaby Y.A. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) // Mol. Ecol. Resources. 2009. V. 9. P. 843. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02289.x>
18. Орешкова Н.В., Бондар Е.И., Путинцева Ю.А., Шаров В.В., Кузьмин Д.А., Крутовский К.В. Разработка ядерных микросателлитных маркеров с длинными (трех-, четырех-, пяти- и шестину-клеотидными) мотивами для трех видов лиственницы на основе полногеномного *de novo* секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // Генетика. 2019. Т. 55. С. 418. <https://doi.org/10.1134/S1022795419040094>
19. Krutovsky K.V., Tretyakova I.N., Oreshkova N.V., Pak M.E., Kvitzko O.V., Vaganov E.A. Somaclonal variation of haploid *in vitro* tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome *de novo* sequencing // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2014. V. 50. P. 655. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9619-z>
20. Burg K., Helmersson A., Bozhkov P., Von Arnold S. Developmental and genetic variation in nuclear microsatellite stability during somatic embryogenesis in pine // Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 687. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl241>

21. Marum L., Rocheta M., Maroco J., Oliveira M., Miguel C. Analysis of genetic stability at SSR loci during somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 673. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0668-9>
22. Aronen T.S., Krajnakova J., Haggman H., Ryynanen L.A. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica* // Plant Sci. 1999. V. 142. P. 163.
23. Endemann M., Hristoforoglu K., Stauber T., Wilhelm E. Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry // Biol. Plant. 2001. V. 44. P. 339. <https://doi.org/10.1023/A:1012426306493>
24. Lopes T., Pinto G., Loureiro J., Costa A., Santos C. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers // Tree Physiol. 2006. V. 26. P. 1145. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.9.1145>
25. Fourre J.L., Berger P., Niquet L., André P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 94. P. 159. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>
26. Von Aderkas P., Bonga J.M. Formation of haploidembryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis // Amer. J. Bot. 1988. V. 75. P. 690. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb13491.x>
27. Von Aderkas P., Anderson P. Aneuploidy and polyploidization in haploid tissue cultures of *Larix decidua* // Physiol. Plant. 1993. V. 88. P. 73. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01762.x>
28. Von Aderkas P., Klimaszewska K., Bonga J.M. Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua* and their reciprocal hybrids // Can. J. For. Res. 1990. V. 20. P. 9.
29. Lelu M.A. Variations morphologiques et génétiques chez *Picea abies* obtenues après embryogenèse somatique // Annales de Recherches Sylvicoles. Association Forêt-Cellulose. 1987. P. 35.
30. Salajova T., Salaj J. Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.) // Biol. Plant. 1992. V. 4. P. 213.
31. O'Brien E.W., Smith D.R., Gardner R.C., Murray B.G. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus* // Plant Sci. 1996. V. 115. P. 91.
32. Von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2003. V. 74. P. 27. <https://doi.org/10.1023/A:1024614209524>
33. Третьякова И.Н. Эмбриология хвойных Новосибирск: Наука Сибирское отделение. 1990. 283 с.
34. Mo L.M., von Arnold S., Lagererantz U. Morphogenic and genetic stability in long-term embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. P. 375. <https://doi.org/10.1007/BF00270072>
35. Eastman P., Webster F.B., Pitel J.A., Roberts D.R. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis // Plant Cell Rep. 1991. V. 10. P. 425. <https://doi.org/10.1007/BF00232617>
36. Tremblay L., Levasseur C., Tremblay F.M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana* Pinaceae) and white spruce (*P. glauca* Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability // Am. J. Bot. 1999. V. 86. P. 1373. <https://doi.org/10.2307/2656920>
37. Harvenge L., Trontin J. F., Reymond I., Canlet F., Pâques M. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis // Planta. 2001. V. 213. P. 8. <https://doi.org/10.1007/s004250100628>
38. Yang F., Xia X.R., Ke X., Ye J., Zhu L.H. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Engelm): improving initiation of embryogenic tissues and maturation of somatic embryos // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2020. V. 143. P. 159. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01905-315>
39. Пак М.Э., Горячкина О.В., Третьякова И.Н., Муратова Е.Н. Цитогенетическая характеристика разновозрастных эмбриогенных клеточных линий, полученных через соматический эмбриогенез у *Larix sibirica* Ldeb. // Сибирский экологический журнал. 2023. Т. 5. С. 715. <https://doi.org/10.15372/SEJ20230512>
40. Третьякова И.Н., Парк М.Е., Иванитская А.С., Орешкова Н.В. Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* in vitro // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 800. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050137>

УДК 581.1

РАЗЛИЧИЯ ВО ВЛИЯНИИ ЛЕГКИХ (La) И ТЯЖЕЛЫХ (Yb) ЛАНТАНОИДОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА И НАКОПЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОДУВАНЧИКОМ КРЫМ-САГЫЗ (*Taraxacum hybernum*)

© 2024 г. В. Н. Воробьев^{a, b*}, В. Ю. Горшков^{a, b}, В. В. Терентьев^c, Б. Р. Исламов^b, С. Ф. Котов^d, В. В. Николенко^d, Т. П. Якушенкова^a, О. А. Тимофеева^a

^aФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

^bКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

^cФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук — обособленное подразделение, Пушкино, Россия

^dФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

*e-mail: vnvorobev.vladimir@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.06.2024 г.

После доработки 27.06.2024 г.

Принята к публикации 29.06.2024 г.

Продemonстрирован стимулирующий эффект нитрата иттербия на прорастание семян, фотосинтез и накопление углеводов в корнях одуванчика Крым-сагыз (*Taraxacum hybernum*). Выявлены различия между лантаном и иттербием по влиянию на эффективность ФС II (Y(II)). В концентрации 100 мкмоль лантан снижал Y(II) за счет увеличения вклада квантового выхода регулируемой диссипации части энергии (Y(NPQ)), а иттербий — за счет вклада необратимой диссипации энергии (Y(NO)). При снижении концентрации лантаноидов в 10 раз стимулирующий эффект Y(II) наблюдался только в варианте с иттербием. В полевых экспериментах у растений, обработанных раствором нитрата иттербия в концентрации 10 мкмоль, интенсивность фотосинтеза была выше на 31%, что, вероятно, повлияло на накопление в корнях одуванчика каучука и углеводов, которое было большим по сравнению с необработанными растениями на 13 и 26%, соответственно.

Ключевые слова: *Taraxacum hybernum*, лантаноиды, накопление углеводов, прорастание семян, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330324060139, EDN: LWAIBS

ВВЕДЕНИЕ

Лантаноиды (Ln^{+3}) могут повышать всхожесть семян, благоприятно влиять на фотосинтез, накопление биомассы, усвоение микро- и макроэлементов растениями, что в конечном итоге повышает их урожайность [1, 2]. Как правило, эффект влияния легких лантаноидов (лантана и церия) объясняется замещением в металлоорганических соединениях кальция на Ln^{+3} с сохранением функций (или даже с некоторой активацией) последних. Считается, что замещение возможно потому, что ионные радиусы (в особенности лантана) близки к радиусу иона кальция, а следовательно, влияют на кальций-зависимые процессы в растительных клетках как

в направлении их стимуляции при малых концентрациях, так и угнетения при больших. При дефиците кальция и магния их замена на церий в концентрациях от 1.14 до 5.74 мкмоль приводила к стимуляции роста и активности фотосинтеза микроводоросли *Desmodesmus quadricauda* [3]. В таких же условиях у шпината активизировались процессы фотосинтеза и работа антиоксидантной системы [4–6]. При дефиците магния легкие Ln^{+3} способны восстанавливать биосинтез хлорофилла, что положительно сказывается на эффективности ФС II (Y(II)) и скорости электронного транспорта у кукурузы [7, 8]. Использование удобрений, содержащих оксид церия, приводило к росту биомассы редиса за счет повышения содержания хлорофилла, а не за счет

скорости фотосинтеза листьев. При этом церий накапливался в области плазмалеммы клеток корня редиса, что негативно влияло на пищевую ценность корнеплодов [9].

Тяжелые Ln^{+3} (Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu), имея меньший ионный радиус, более токсичны [10], а потому не находят применения в сельскохозяйственной практике, что упускает возможность гормезисных эффектов [11], когда низкие дозы токсических веществ способны активировать физиологические процессы. Особое место в ряду тяжелых лантаноидов занимает иттербий (Yb^{3+}). Низкие концентрации Yb^{3+} увеличивают экспрессию генов некоторых аквапоринов, что приводит к увеличению водной проницаемости мембран клеток корней кукурузы [12]. Ионный радиус Yb^{3+} наиболее близок к ионному радиусу Mg^{2+} поэтому можно ожидать, что использование этого лантаноида в определенных концентрациях может стимулировать некоторые процессы, в которых Mg^{2+} выполняет роль кофактора, например, в синтезе каучука у одуванчика Крым-сагыз.

Цель работы — оценка влияния лантаноидов, отличающихся ионным радиусом, на эффективность ФС II, скорость фотосинтеза, накопление углеводов и каучука в корнях одуванчика Крым-сагыз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Семена одуванчика Крым-сагыз (*Taraxacum hybernnum* Steven) были собраны в окрестностях Никитского ботанического сада (Крымский полуостров). Собранные семена хранили в бумажных пакетах при комнатной температуре в сухом месте. Проращивание семян осуществляли в четырех повторностях (по 50 семян каждая) в чашках Петри на водопроводной воде [13] в следующих вариантах: до стратификации; после 30-суточной стратификации при температуре -20°C ; после стратификации и инфильтрации. Инфильтрацию проводили при давлении 10 Па в течение 60 мин в дистиллированной воде, в растворах 100 мкмоль $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и 100 мкмоль $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich Chemical Co., США). Известно, что стимулирующий эффект от нитрата лантана происходит при концентрации 5–10 мкмоль, а негативное влияние наблюдается с 20 мкмоль [14]. Энергию прорастания определяли на четвертые сутки проращивания, затем проростки высаживали в 0.5-литровые емкости с коммерческим грунтом “Тerra vita” (Россия). Выращивание растений для экспериментов по влиянию лантаноидов на эффективность ФС II проводили в климатической камере при температуре 22°C с фотопериодом 16/8 и интенсивности светового потока

150 мкмоль фотонов $\text{м}^2/\text{с}$. В экспериментах по флуоресценции листья 3-недельных растений однократно опрыскивали с помощью пульверизатора растворами лантаноидов в концентрациях 100 или 10 мкмоль в объеме 3 мл.

Полевые эксперименты проводили на опытном участке ботанического сада Казанского федерального университета. Стратифицированные и инфильтрированные в воде и растворах лантаноидов семена высаживали в открытый грунт. Через месяц после высадки листья каждого растения с помощью пульверизатора однократно опрыскивали раствором лантаноидов в концентрации 10 мкмоль в объеме 3 мл. Через четыре месяца после обработки снимали показания интенсивности ассимиляции CO_2 , после чего растения использовали для биохимических анализов.

Флуоресценция хлорофилла

Переменную флуоресценцию хлорофилла измеряли на флуориметре PAM 2500 (Heinz Walz GmbH, Германия) при температуре 22°C . Флуоресценцию регистрировали в ответ на импульс насыщающего света ($\lambda = 625 \text{ нм}$, 12000 мкмоль фотона $\text{м}^2/\text{с}$, продолжительность 500 мс). Действующая интенсивность света составляла 194 мкмоль фотона $\text{м}^2/\text{с}$ ($\lambda = 625 \text{ нм}$). Эффективный квантовый выход ФС II ($Y(\text{II})$), квантовый выход вызванного светом нефотохимического гашения ($Y(\text{NPQ})$) и квантовый выход нерегулируемого рассеяния тепла и флуоресцентного излучения ($Y(\text{NO})$) измеряли в адаптированных к свету (150 мкмоль фотонов $\text{м}^2/\text{с}$) образцах в соответствии с руководством PAM 2500 (Heinz Walz GmbH, Германия) и рассчитывали по формуле:

$$Y(\text{II}) = (F'm - F_s)/F'm; Y(\text{NPQ}) = F_s/F'm - F/F'm; Y(\text{NO}) = F_s/F'm,$$

где F_s — стационарный уровень флуоресценции хлорофилла;

$F'm$ — индуцированный светом максимальный уровень флуоресценции хлорофилла в адаптированных к свету листьях [15];

$$Y(\text{II}) + Y(\text{NPQ}) + Y(\text{NO}) = 1.$$

Скорость фотосинтеза

Характеристики газообмена были проанализированы перед сбором корней с использованием инфракрасного анализатора Li-6800 (LI-COR, США). Скорость фотосинтеза измеряли в четырех повторностях каждой обработки у трех полностью распустившихся листьев при естественном освещении, которое в среднем составляло 100 мкмоль/ $(\text{м}^2 \text{ с})$.

Количественное определение углеводов

Количество углеводов определяли фенольным методом по Dubois с соавт. [16]. В стеклянные пробирки добавляли по 250 мкл 5% фенола и 250 мкл измельченных и сублимированных корней. После тщательного перемешивания к смеси добавляли 1.25 мл концентрированной серной кислоты. Полученную смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре и затем термостатировали на водяной бане в течение 15 мин при 100°C. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре (Carl Zeiss Jena type MK 6/6, Германия) при 490 нм. Содержание углеводов определяли относительно калибровочной кривой.

Гравиметрическое определение каучука

Инкубировали 1 г измельченных и сублимированных корней в 25 мл гексана в течение 24 ч при 20°C с мягким перемешиванием. Остатки клеток удаляли центрифугированием (1160 g, 5 мин) и фильтрацией. Супернатант осаждали путем инкубации с двумя объемами метанола в течение 30 мин, затем промывали ацетоном и водой в течение 40 мин для удаления смол и сушили в течение 16 ч при комнатной температуре перед взвешиванием.

Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проведены в четырех или шести биологических повторностях. Статистический анализ полученных результатов осуществляли с использованием программы OriginPro 9.0. Для множественного сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Тьюки. Статистически значимым считалось значение $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Естественная всхожесть семян одуванчика была низкой, всего 3.25%, тогда как стратификация повысила ее до 39% (табл. 1). Инфильтрация стратифицированных семян в воде и в растворах нитратов лантана и иттербия в концентрации 100 мкмоль привела к увеличению энергии прорастания на 65% (табл. 1).

На рис. 1 представлены гистограммы показателей эффективности ФС II в ответ на действие лантана и иттербия. В листьях контрольных растений во всех вариантах величина эффективного квантового выхода флуоресценции хлорофилла (Y(II)) была на уровне 0.6 ± 0.01 , а значения (Y(NPQ) и (Y(NO))), соответственно, равнялись 0.1 ± 0.03 и 0.3 ± 0.02 . Через 24 ч после обработки листьев $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ в концентрации 100 мкмоль отмечалось снижение величины Y(II) до 0.41, в то время как вклад Y(NPQ) увеличился с 0.1 до 0.31. Вклад Y(NO) незначительно снизился с 0.30 до 0.28 (рис. 1а). Восстановление уровня Y(II) до начального (контрольного) значения отмечалось только на четвертые сутки после обработки. При уменьшении дозы $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ в 10 раз отмечалась схожая картина, однако значение Y(II) на следующий день после обработки снизилось до 0.5 ± 0.04 , значение Y(NPQ) выросло на 0.13, а восстановление уровня Y(II) до начального (контрольного) значения произошло уже на второй день (рис. 1б).

При обработке растений $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ в концентрации 100 мкмоль снижение Y(II) на следующие сутки было менее значительным (на 0.07), чем под влиянием $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ при той же концентрации, а восстановление Y(II) до уровня необработанных растений отмечалось только на восьмые сутки (рис. 1в). При этом вклад Y(NPQ) менялся незначительно. Основное изменение эффективности ФС II было обусловлено увеличением Y(NO) (на 0.09), которое не восстанавливалось до уровня контрольных значений на восьмые сутки. Снижение концентрации $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ в 10 раз до 10 мкмоль не оказывало негативного действия на активность ФС II. Напротив, эффективный квантовый выход флуоресценции хлорофилла был даже несколько выше, чем у необработанных растений при одинаковом уровне Y(NO). На восьмые сутки Y(II) был выше значений необработанных растений на 7% ($P = 0.03$), при этом вклад процессов Y(NPQ) снижался до минимума и составлял всего лишь 0.04 ± 0.01 (рис. 1г).

Проведенные исследования позволили определить концентрацию лантаноидов, которая

Таблица 1. Энергия прорастания семян одуванчика Крым-сагыз

Без стратификации	Стратификация	Стратификация и инфильтрация в H_2O	Стратификация и инфильтрация в 100 мкмоль $\text{La}(\text{NO}_3)_3$	Стратификация и инфильтрация в 100 мкмоль $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$
3.2 ± 3.6^a	39 ± 9.1^b	40 ± 1.7^b	66 ± 1.2^c	66 ± 1.3^c

Примечание. Семена подвергали стратификации и инфильтрации при давлении 10 Па в течение 60 мин. Одинаковыми буквами обозначено отсутствие статистически значимых различий между вариантами при $P < 0.05$.

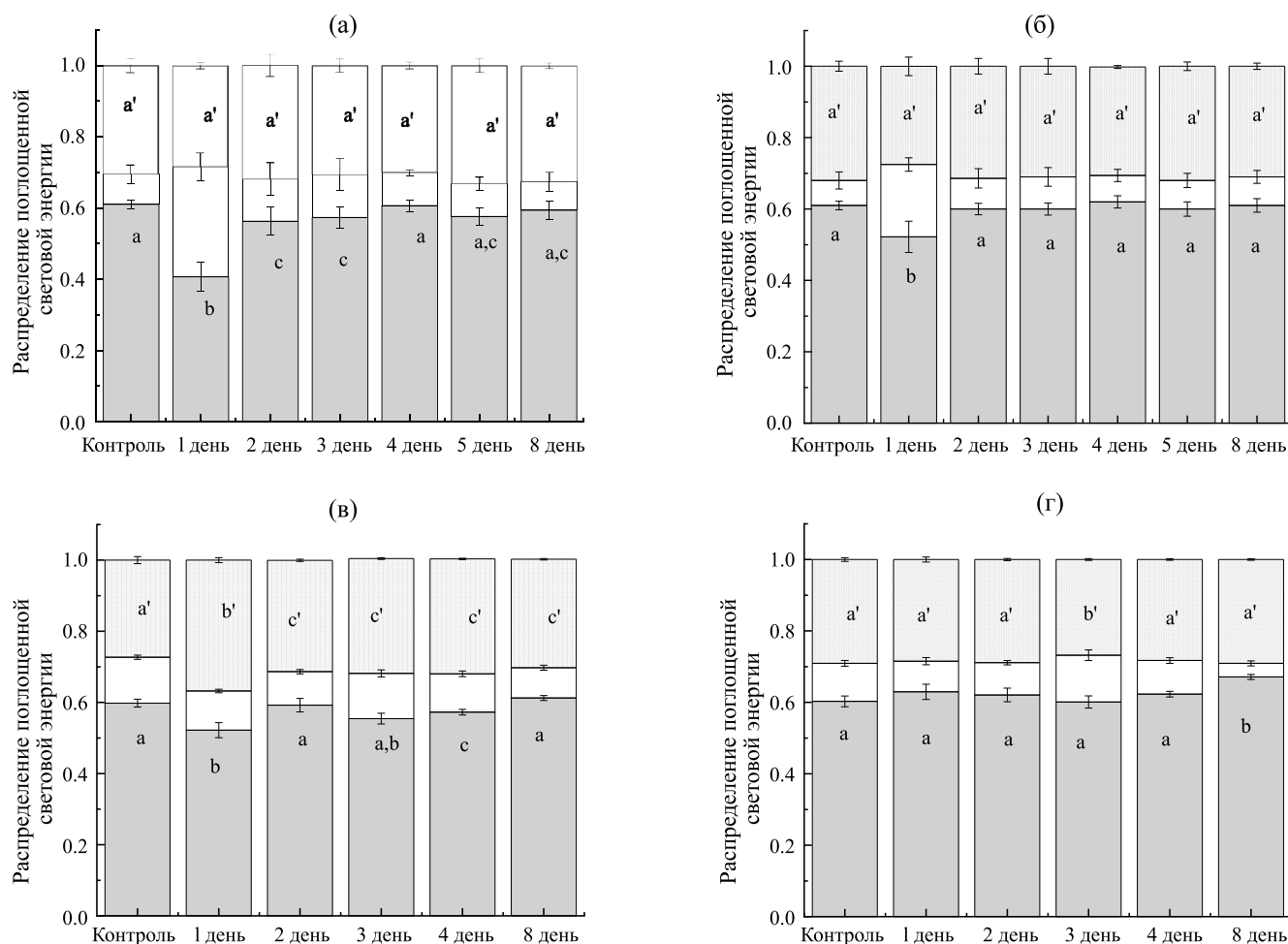


Рис. 1. Динамика эффективности ФС II после обработки листьев 3-недельных растений тремя мл растворов $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (а – 100 мкмоль; б – 10 мкмоль) и $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ (в – 100 мкмоль; г – 10 мкмоль). Точечная заливка – $\text{Y}(\text{NO})$, без заливки – $\text{Y}(\text{NPQ})$, серая заливка – $\text{Y}(\text{II})$. Средние значения и стандартные отклонения получены от нижних листьев шести растений. Одинаковыми буквами обозначено отсутствие статистически значимых различий между вариантами при $P < 0.05$.

не должна оказывать негативного влияния на фотосинтетический аппарат при внекорневой обработке растений в полевом эксперименте. На рис. 2 показано, что скорость фотосинтеза у растений, обработанных лантаноидами, была выше, чем у необработанных растений: в варианте с лантаном на 20%, в варианте с иттербием на 31%. В этих условиях повышенный уровень накопления углеводов в пересчете на сухую массу корней был только у варианта с иттербием (рис. 3).

Установлено, что содержание каучука в корнях одуванчика Крым-сагыз, выращенного в условиях Республики Татарстан без применения лантаноидов, на 21% ниже, чем у растений аналогичного онтогенетического состояния, произраставших в условиях Крымского полуострова (табл. 2). Обработка $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ повышала содержание каучука у растений, выращенных в условиях Республики Татарстан, на 13%.

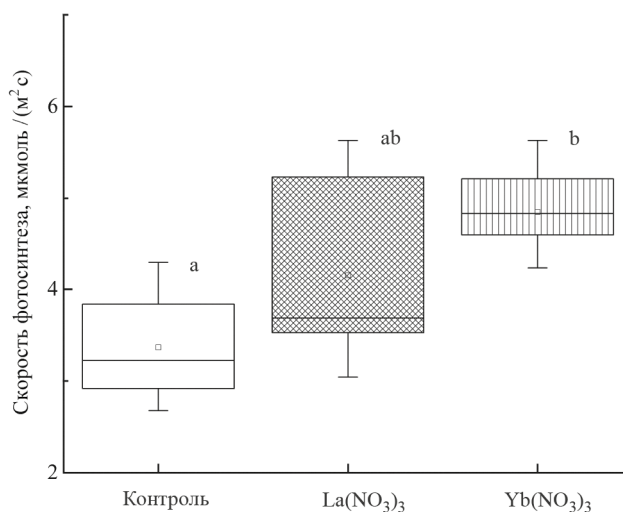


Рис. 2. Скорость фотосинтеза в листьях одуванчика Крым-сагыз. Измерения проводили на зрелых листьях у четырех растений каждого варианта (возраст растений – 5 месяцев). Одинаковыми буквами обозначено отсутствие статистически значимых различий между вариантами при $P < 0.05$.

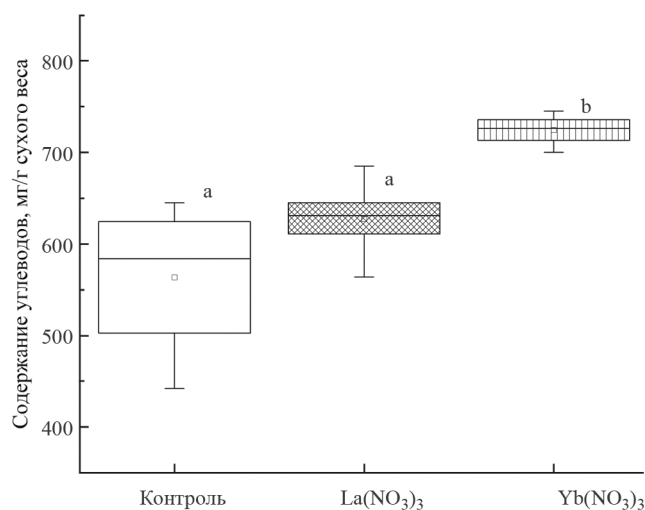


Рис. 3. Накопление углеводов в корнях одуванчика Крым-сагыз. В каждом варианте данные получены от растительного материала четырех растений (возраст растений — 5 месяцев). Одинаковыми буквами обозначено отсутствие статистически значимых различий между вариантами при $P < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одуванчик осенний, или Крым-сагыз, относится к каучуконосам, активно выращивавшимся наряду с одуванчиком Кок-сагыз в первой половине XX в. в СССР для получения резины. В настоящее время, исходя из соображений импортозамещения и ресурсной безопасности, представляется интересным влияние лантаноидов на фотосинтетические процессы и накопление каучука у этого растения.

Имеющиеся данные по влиянию лантаноидов на прорастание семян различных культур не однозначны. Обнаружены как ингибирующие, так и стимулирующие эффекты [1], которые зависят от вида растений, самого лантаноида, его концентрации и дозы [17]. Несмотря на различия в токсичности легких и тяжелых лантаноидов [10], часовая инфильтрация семян Крым-сагыз в растворах $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ и $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$ в концентрации 100 мкмоль в равной степени увеличивала их энергию прорастания (табл. 1).

Отличия во влиянии лантана и иттербия проявлялись в эффективности ФС II при обработке листьев одуванчика растворами этих солей. Известно, что при обработке листьев растворами, содержащими ионы лантаноида, инициируются процессы эндоцитоза и лантаноид проникает в клетку [18]. В первые сутки после обработки растворами в концентрации 100 мкмоль лантан инициировал активацию $\text{Y}(\text{NPQ})$, а иттербий — $\text{Y}(\text{NO})$, что в обоих случаях приводило к снижению $\text{Y}(\text{II})$ (рис. 1а, в). Если в варианте с лантаном вклад $\text{Y}(\text{NO})$ в $\text{Y}(\text{II})$ был на уровне необработанных листьев, то после обработки иттербием $\text{Y}(\text{NO})$ он был больше. Таким образом, нами выявлено различие во влиянии легкого и тяжелого лантаноида на процессы нефотохимического преобразования энергии в ФС II. Известно, что $\text{Y}(\text{II})$ соответствует доле энергии, которая фотохимически преобразуется в ФС II [19]. Оставшаяся доля $\text{Y}(\text{II})$ представляет собой общий квантовый выход всех потерь, которые разделяют на два отдельных компонента: $\text{Y}(\text{NO})$ и $\text{Y}(\text{NPQ})$. $\text{Y}(\text{NPQ})$ соответствует доле энергии, рассеиваемой в форме тепла посредством регулируемого фотозащитного механизма NPQ. $\text{Y}(\text{NO})$ представляет собой конститутивную потерю энергии, которая пассивно рассеивается в форме тепла и флуоресценции в основном за счет закрытых реакционных центров [19–22]. Уменьшение концентрации в 10 раз не меняло характера действия лантана за исключением того, что $\text{Y}(\text{II})$ восстанавливался уже на второй день после обработки (рис. 1б). Влияние иттербия стало заметным только на восьмые сутки после обработки, когда $\text{Y}(\text{II})$ стал выше, чем у необработанных растений (рис. 1г). Используемые лантаноиды La^{3+} и Yb^{3+} имеют отличия по ионному радиусу. У La^{3+} радиус иона сравним с радиусом Ca^{2+} . Ионный радиус иттербия ближе к магнию, чем, возможно, объясняются различия в действии La^{3+} и Yb^{3+} на эффективность ФС II.

В большинстве исследований лантаноиды вносят в почву и фиксируют эффекты постоянного влияния поллютанта. В наших экспериментах обработка была в начале вегетационного

Таблица 2. Накопление каучука в корнях 5-месячных растений одуванчика Крым-сагыз

Вариант	Растения, выросшие в Крыму	Контроль (растения, выросшие в Татарстане)	Растения, выросшие в Татарстане и обработанные $\text{La}(\text{NO}_3)_3$	Растения, выросшие в Татарстане и обработанные $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$
Содержание каучука, мг/г сухой массы корней	78.5 ± 5.4^a	61 ± 4.2^b	62 ± 3.1^b	70 ± 4.3^c

Примечание. Средние значения и стандартные отклонения получены из растительного материала четырех растений каждого варианта. Одинаковыми буквами обозначено отсутствие статистически значимых различий между вариантами при $P < 0.05$.

периода, а скорость фотосинтеза оценивалась в конце. В варианте с лантаном скорость фотосинтеза была увеличена на 20% от контроля (рис. 2). Статистически значимые различия были получены между вариантом с применением иттербия и контролем (31%). Ранее было получено сравнимое увеличение скорости фотосинтеза (на 23%) у растений сои при концентрации лантана 5–10 мкмоль [14]. Такой долговременный эффект сложно объяснить. Обработанные лантаноидами листья к моменту измерения уже были отмершими. Можно осторожно предположить, что при биоразложении опавших листьев микродозы лантаноидов были возвращены в растения и вызвали активацию фотосинтеза. Повышенный уровень фотосинтеза мог привести к большему накоплению углеводов в запасающем органе. Известно, что накопление инулина и сахаров коррелирует с накоплением каучука у одуванчика Кок-сагыз [23]. Как продемонстрировано в наших экспериментах, стимулирующий эффект иттербия проявился и в накоплении каучука (табл. 2).

Полученные отличия во влиянии лантаноидов на фотосинтез и накопление каучука можно объяснить с позиции ионных радиусов. Ионный радиус La^{3+} (1.032) сопоставим с Ca^{2+} (1.06), а Yb^{3+} (0.868) с Mg^{2+} (0.78). С Mg^{2+} связаны не только фотосинтетические процессы. Он является кофактором как в реакциях синтеза изопентенилпирофосфата из мевалоновой кислоты в цитозоле, так и в реакциях полимеризации в каучуковых частицах, где Mg^{2+} регулирует работу цис-пренилтрансферазы [23–26]. Обработка растений низкими концентрациями нитрата иттербия приводит к увеличению эффективности ФС II и скорости фотосинтеза, накоплению углеводов и каучука в корнях одуванчика Крым-сагыз.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо экспериментов с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ramirez-Olvera S.M., Trejo-Tellez L.I., Garcia-Morales S., Perez-Sato J.A., Gomez-Merino F.C. Cerium enhances germination and shoot growth, and alters mineral nutrient concentration in rice // PLoS ONE. 2018. V. 13 P. e0194691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194691>
- Vilela L. A. F., Ramos S. J., Carneiro M. A. C., Faquin V., Guilherme L. R. G., Siqueira J. O. Cerium (Ce) and lanthanum (La) promoted plant growth and mycorrhizal colonization of maize in tropical soil // Aust. J. Crop Sci. 2018. V. 12. P. 704. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.05.PNE610>
- Goecke F., Jerez C.G., Zachleder V., Figueroa F.L., Bisova K., Rezanka T., Vítova M. Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodium quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta) // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1.
- Chao L., Weigian C., Yun L., Hao H., Liang C., Xiaoqing L., Fashui Y. Cerium under calcium deficiency-influence on the antioxidative defense system in spinach plants // Plant Soil. 2009. V. 323. P. 285.
- Yin S., Ze Y., Liu C., Li N., Zhou M., Duan Y., Hong F. Cerium relieves the inhibition of nitrogen metabolism of spinach caused by magnesium deficiency // Biol. Trace. Elem. Res. 2009. V. 132. P. 247.
- Ze Y., Yin S., Ji Z., Luo L., Liu C., Hong F. Influences of magnesium deficiency and cerium on antioxidant system of spinach chloroplasts // Biometals. 2009. V. 22. P. 941.
- Zhou M., Gong X., Ying W., Chao L., Hong M., Wang L., Fashui, Y. Cerium relieves the inhibition of chlorophyll biosynthesis of maize caused by magnesium deficiency // Biol. Trace. Elem. Res. 2011. V. 143. P. 468.
- Zhao H., Zhou Q., Zhou M., Li C., Gong X., Liu Chao., Qu C., Wang L., Si W., Hong F. Magnesium deficiency results in damage of nitrogen and carbon cross-talk of maize and improvement by cerium addition // Biol. Trace. Elem. Res. 2012. V. 148. P. 102.
- Gui X., Rui M., Song Y., Ma Y., Rui Y., Zhang P., Ye X., Li Y., Zhang Z., Liu L. Phytotoxicity of CeO_2 nanoparticles on radish plant (*Raphanus sativus*) // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. V. 24. P. 13775. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8880-1>
- Gonzalez V., Vignati D. A. L., Leyval C., Giamberini L. Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: are they a uniform group beyond chemistry? // Environ. Int. 2014. V. 71. P. 148.
- Calabrese E.J., Blain R.B. Hormesis and plant biology // Environ. Pollut. 2009. V. 157. P. 42.
- Vorob'ev V.N., Sibgatullin T.A., Sterkhova K.A., Alexandrov E.A., Gogolev Yu. V., Timofeeva O.A., Gorshkov V.Y., Chevela V.V. Ytterbium increases transmembrane water transport in *Zea mays* roots via aquaporin modulation // Biometals. 2019. V.32. P. 901.
- Martinkova Z., Honek A., Lukas J. Viability of *Taraxacum officinale* seeds after anthesis // Weed Research. 2011. V. 51. P. 508.
- Oliveira C., Ramos S.J., Siqueira J.O., Faquin V., Castro E.M., Amaral D.C., Techio V.H., Coelho L.C., Silva P.H., Schnug E., Guilherme L.R. Bioaccumulation and effects of lanthanum on growth and mitotic index in soybean plants // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2015. V. 122. P. 136.
- Genty B., Harbinson J., Cailly A.L., Rizza F. Fate of excitation at PS II in leaves: the non-photochemical side // The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis (March 31 to April 3, 1996, Sheffield). UK. P. 28.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350.

17. *Hu Z., Richter H., Sparovek G., Schnug E.* Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: a review // *J. Plant. Nutr.* 2004. V. 27. P. 183.
18. *Wang L., Li J., Zhou Q., Yang G., Ding X.L., Li X., Chen X.C., Zhao Z., Hai Y.W., Tian H.L., Xing W.D., Xiao H.H.* Rare earth elements activate endocytosis in plant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 12936.
19. *Klughammer C., Schreiber U.* Complementary FSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method // *J. PAM Appl. Notes.* 2008. V. 1. P. 27.
20. *Hendrickson L., Furbank R.T., Chow W.S.* A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence // *Photosynth Res.* 2004. V. 82. P. 73.
21. *Ikeuchi M., Uebayashi N., Sato F., Endo T.* Physiological functions of PsbS-dependent and PsbS-independent NPQ under naturally fluctuating light conditions // *Plant Cell Physiol.* 2014. V. 55. P. 1286.
22. *Samson G., Bonin L., Maire V.* Dynamics of regulated YNPQ and non-regulated YNO energy dissipation in sunflower leaves exposed to sinusoidal lights // *Photosynth Res.* 2019. V. 141. P. 315.
23. *Мартиросян Л.Ю., Мартиросян Ю.Ц., Кособрюхов А.А., В.М. Гольдберг, Гачок И.В., Мартиросян В.В., Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Америк А.Ю., Миних А.А., Варфоломеев С.Д.* Биосинтез каучука и инулина в зависимости от спектрального состава света и активности фотосинтетического аппарата при аэропонтном культивировании *Taraxacum kok-saghyz E. Rodin* // *Сельскохозяй. биол.* 2023. Т. 58. С. 100.
24. *Scott D.J., Da Costa B.M.T., Espy S.C., Keasling J.D., Cornish K.* Activation and inhibition of rubber transferases by metal cofactors and pyrophosphate substrates // *Phytochemistry.* 2003. V. 64. P. 123.
25. *Cornish K.* Biosynthesis of natural rubber (NR) in different rubber-producing species // *Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber* / Eds. Kohjiya S., Ikeda Y. Cambridge, Woodhead Publishing Limited. 2014. P. 3.
26. *da Costa B.M.T., Keasling J.D., McMahan C.M., Cornish K.* Magnesium ion regulation of in vitro rubber biosynthesis by *Parthenium argentatum Gray* // *Phytochemistry.* 2006. V. 67. P. 1621.

УДК 581.162.41

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК ЕЛИ (*Picea abies* (L.) Karst. × *P. obovata* Ledeb.) *in vitro*

© 2024 г. М. В. Сурсо^{а,*}^аФедеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова
Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

*e-mail: surso@fciarctic.ru

Поступила в редакцию 18.04.2024 г.

После доработки 06.05.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Изучено влияние состава сахаров и pH питательной среды на рост и развитие пыльцевых трубок у интрогрессивного гибрида ели европейской и сибирской (*Picea abies* (L.) Karst. × *P. obovata* Ledeb.) *in vitro*. Показана динамика роста пыльцевых трубок ели. Установлено, что относительно высокая скорость роста пыльцевых трубок во многом обуславливает особенности физиологии их развития. Описана картина быстрого синтеза целлюлозы в процессе гидратации пыльцевых зерен ели. Выявлены различия компонентного состава пыльцы и пыльцевых трубок. Содержание белков, аминокислот, РНК, ДНК, липидов и полисахаридов по градиенту длины пыльцевых трубок у ели возрастали скачкообразно по направлению к растущему кончику и стабилизировались по достижении примерно половины их максимальной длины. При этом общее содержание углеводов в пыльцевых трубках по градиенту длины практически не изменялось. Описаны процессы формирования на поверхности пыльцевых трубок внешних колец, состоящих в основном из целлюлозы и каллозы. Высказано предположение, что такие кольца могут участвовать в регулировании тургора и в частичной компартментализации протопласта в пыльцевых трубках ели. Каллозу в пыльцевых трубках у ели следует рассматривать как ситуативный антистрессовый полисахарид, который не является постоянным компонентом стенки трубки.

Ключевые слова: *Picea abies* × *P. obovata*, амилопласты, ель, каллоза, пыльцевые трубки, тургор, целлюлоза

DOI: 10.31857/S0015330324060146, EDN: LVXCJL

ВВЕДЕНИЕ

Цитологическим и физиолого-биохимическим аспектам роста и развития пыльцевых трубок голосеменных растений в последнее время стало уделяться все большее внимание. Результаты этих исследований обобщены в ряде обзоров [1, 2]. Цитоплазматическая организация пыльцевых трубок голосеменных существенно отличается от организации пыльцевых трубок покрытосеменных, за исключением распределения секреторных пузырьков и гладкого эндоплазматического ретикулума, что связано с различиями в скорости их роста и обусловлено особенностями строения стенок пыльцевых трубок голосеменных растений [3].

Пыльцевые трубки голосеменных четко разделяются на две зоны. Одна (тело трубки) занимает почти весь объем трубки от ее проксимальной части и почти до самого кончика, и включает в себя функциональные ядра развивающегося мужского гаметофита, микротрубочки и микрофиламенты актинового цитоскелета, вакуоли, амилопласты и другие органеллы цитоплазмы.

Другая зона — прозрачная (“чистая”) удлиняющегося (растущего) кончика трубки лишена амилопластов, но включает многочисленные пузырьки Гольджи, которые мигрируют к внутренней поверхности мембраны, где накапливаются в форме полукольца или полумесяца, и сливаются с плазматической мембраной, обеспечивая рост кончика пыльцевой трубки [4].

Прорастание пыльцы и, особенно рост пыльцевых трубок, у голосеменных сильно зависят от интактного актинового цитоскелета, обеспечивающего направленное струящееся движение цитоплазмы [5, 6], представляющее собой регулярный фонтанообразный рисунок, при этом органеллы в теле трубки движутся в сторону кончика по ее центру, а обратно — вдоль кортекса клетки [7].

У покрытосеменных стенка кончика почти полностью состоит из этерифицированного пектина. В субапикальной области пектиновая матрица подвергается деэтерификации, становясь более жесткой, в нее также встраивается небольшое количество микрофибрилл целлюлозы.

Непосредственно за этой областью происходит укрепление первичной стенки за счет синтеза каллозы [8, 9]. Каллозный слой составляет основную часть объема стенки у большинства покрытосеменных растений [10]. Тонкая, наружная затвердевшая первичная пекто-целлюлозная и толстая, внутренняя вторичная каллозная стенки поддерживают тургор, предотвращая выпячивание трубки и направляя ее рост [11, 12]. Отложение каллозы в цитоплазме в виде отдельных зерен приводит к образованию каллозных пробок в пыльцевых трубках покрытосеменных растений. Количество и форма таких пробок зависят от способа их образования, присущего каждому виду [13]. Каллозные пробки блокируют цитоплазматическую связь между кончиком и дистальной областью трубки. В результате такого разделения весь энергетический потенциал роста сосредоточен в кончике трубки [14]. Каллозные пробки препятствуют обратному оттоку содержимого пыльцевой трубки, способствуя поддержанию постоянного тургорного давления и, тем самым, предотвращая разрывы стенки трубки [15, 16]. Каллозные пробки образуются в пыльцевых трубках только у покрытосеменных растений с более высокой энергией роста трубок. У голосеменных растений таких отложений в пыльцевых трубках не выявлено [17].

У голосеменных стенка трубки сохраняет первичное строение в течение всего ее роста. Исследования компонентного состава стенок пыльцевых трубок у 14 видов голосеменных из 8 родов и 6 семейств общеизвестными цитохимическими и иммунохимическими методами с использованием моноклональных антител к полисахаридам и арабиногалактановым белкам (AGPs) показало, что у всех изученных видов интина пыльцевых зерен и стенки трубок содержали AGPs и целлюлозу. В стенках пыльцевых трубок видов из сем. Podocarpaceae, Pinaceae, Taxodiaceae и Cupressaceae пектины присутствовали лишь в малом количестве [18]. У ели (*Picea meyerii*) и сосны (*Pinus sylvestris*) этерифицированные пектины локализованы в области кончика пыльцевых трубок. Деэтерифицированные пектины локализованы вдоль всей стенки пыльцевой трубки ели, за исключением кончика. Целлюлоза распределена по всей стенке трубки, включая кончик, однако плотность целлюлозных микрофибрилл в кончике трубки у *Pinus sylvestris* была значительно меньше по сравнению с остальной частью трубки, что указывает на постепенную трансформацию стенки трубки [3, 19]. Целлюлоза является, по-видимому, основным компонентом стенок пыльцевых трубок у голосеменных растений.

У большинства голосеменных растений каллоза не выявляется, или выявляется слабо при

окрашивании пыльцевых трубок анилиновым синим [1]. Однако у *Pinus sylvestris* каллоза была обнаружена в кончиках и дистальной области пыльцевых трубок, но утрачивалась при дальнейшем росте трубок [3]. Каллоза была обнаружена на стенках пыльцевых трубок у *Podocarpus nagi* и *Chamaecyparis obtusa* [18], а также у *Cupressus arizonica* [20]. Принято считать, что в пыльцевых трубках голосеменных растений каллоза является резервным антистрессовым полисахаридом [21]. Однако недавние исследования показали, что каллоза — это многофункциональный полимер, участвующий во многих фундаментальных биологических процессах развития растений [22].

Пыльцевые трубки у ели характеризуются довольно высокой энергией роста и относительно короткой продолжительностью жизни. Это накладывает отпечаток на особенности их физиологического развития, касающихся, прежде всего, синтеза полисахаридов и локализации их в стенке трубки. Изучение ряда этих особенностей и явилось основной целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проращивание пыльцы. Для исследований использовали свежесобранную пыльцу интрогрессивного гибрида ели европейской и сибирской (*Picea abies* (L.) Karst. × *P. obovata* Ledeb.), естественно произрастающего на северо-западе европейского континента [23]. Пыльцу проращивали в водной суспензии, содержащей 1.0 mM KNO₃, 2.0 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM KH₂PO₄, 0.5 mM H₃BO₃, 5.0 mM CaCl₂, 2.0 mM MgCl₂. Суспензию культивировали в пробирках Eppendorf объемом 2.0 мл на мульти-ротаторе Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия) при скорости вращения 5 об./мин в течение 12–96 ч (в зависимости от цели исследования) при комнатной температуре. Для проращивания пыльцы на агаризованной среде использовали агар бактериологического класса (VWR International LLC, США). Пыльцу проращивали в чашках Петри на 1% агаре с добавлением 5% сахарозы (w/v) в течение 12–124 ч в термостате при температуре 26.5°C. Пророщенную пыльцу смывали с поверхности субстрата водой и для удаления сахарозы трижды промывали в дистиллированной воде. Полученные водные суспензии проросшей пыльцы, отмытые от излишков сахарозы, сразу же использовали для дальнейшей работы. Каждый раз для исследований готовили свежие образцы.

Световая микроскопия (проходящий свет). Для выявления различных цитологических структур в пыльцевых трубках ели использовали водные растворы бромкрезолового пурпурного, эриохрома черного, метилового зеленого — пиронина G, сафранина, Кумасси R-250. Концен-

трации красящих растворов и время окрашивания подбирали эмпирически. Амилопласты в пыльцевых трубках у ели контрастировали в 1% водном растворе йода с йодистым калием (реактив J₂KJ). Результаты окрашивания визуализировали на прямом микроскопе Axio Scope A1 (Zeiss, Германия). Для изучения динамики роста пыльцевых трубок ели *in vitro* через каждые 4 ч с момента посева пыльцы на агаровый субстрат и до окончания эксперимента проводили измерения длины пыльцевых трубок. В каждой повторности измеряли длину у 20 случайно взятых пыльцевых трубок. Измерения длины пыльцевых трубок и редактирование изображений во всех случаях проводили на прямом микроскопе Axio Scope A1 с помощью программы AxioVision Rel. 4.8. Для изучения влияния кислотности среды на прорастание пыльцы и энергию роста пыльцевых трубок ели было использовано четыре индивидуальных образца пыльцы с высокими исходными показателями жизнеспособности. Показатель pH среды регулировали введением в ее состав 1.0 N HCl (увеличение кислотности), или 0.1 M Трис (снижение кислотности). При изучении состава сахаров на прорастание пыльцы и энергию роста пыльцевых трубок ели концентрация каждого из сахаров (сахарозы, глюкозы, раффинозы, фруктозы, мальтозы, маннозы, галактозы или целлобиозы) в агаровой среде составляла 5%. Во всех случаях для этих опытов использовали одни и те же индивидуальные образцы пыльцы (всего 10 образцов). Проросшей считали пыльцу, если длина пыльцевой трубки более чем в два раза превышала высоту тела пыльцевого зерна. Процент проросшей пыльцы в каждом образце определяли по 400 случайно взятым пыльцевым зернам. Среднюю длину пыльцевых трубок в каждом образце рассчитывали на основе измерений длины у 20 случайно взятых трубок.

Флуоресцентная микроскопия. Для выявления целлюлозы в пыльце и пыльцевых трубках их водные препараты окрашивали калькофлуором (Calcofluor White Stain, Biotium, США) в темноте. К водной суспензии исследуемого образца добавляли равный объем 5 мМ водного раствора красителя. Продолжительность окрашивания составляла 10–15 минут. Окрашенные препараты (без промывки) просматривали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1 Led (Альтами, Россия) и фотографировали в УФ-режиме (светофильтр UV 330–400 нм).

Для выявления каллозы в пыльцевых трубках препараты проросшей пыльцы окрашивали водными растворами анилинового синего. Конечная концентрация красителя в водной суспензии исследуемого образца составляла 0.1%. Окрашенные препараты (без промывки) просматривали и фотографировали на флуорес-

центном микроскопе Altami Lum 1 Led в УФ-режиме (светофильтр UV 330–400 нм).

Гидролитическое расщепление каллозы на поверхности пыльцевых трубок проводили с использованием ламинариназы (1,3-β-D-глюконаза, КФ 3.2.1.39) – полиспецифического фермента, который катализирует реакцию гидролиза [24]. К суспензионной культуре проросшей пыльцы добавляли небольшое количество водного раствора ламинариназы и равный объем 0.2% водного раствора анилинового синего. Каплю полученной смеси наносили на предметное стекло, сверху накрывали покровным стеклом. Процесс гидролитического расщепления каллозы на поверхности пыльцевых трубок контролировали визуально через каждые 10 мин.

Для контрастирования ядерных структур использовали флуоресцентные красители DAPI [25] и SYPRO Rubi Protein Gel Stain (Sigma-Aldrich). Пыльцевые трубки инкубировали в растворе 300 нМ DAPI в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 30 мин в темноте и после 3-кратной промывки в фосфатном буфере просматривали и фотографировали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1LED (светофильтр UV, 330–400 нм). Окрашивание SYPRO Rubi Protein Gel Stain проводили путем добавления к водной суспензии проросшей пыльцы равного объема продажного красителя, окрашивание производили в темноте в течение 1.5–2 ч. Окрашенные препараты (без промывки) просматривали и фотографировали на флуоресцентном микроскопе Altami Lum 1 LED (светофильтр B, 420–485 нм).

FT-IR-спектроскопия. Сканирование лиофильно высушенных пыльцевых трубок ели, отмытых от сахарозы, в инфракрасной области спектра по градиенту длины трубки проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре Vertex 70v (Bruker, Германия) с помощью инфракрасного микроскопа Hyperion 3000 (Bruker, Германия). Использовали точечный МСТ детектор, позволяющий снимать инфракрасные спектры в точке размером 1 мкм. Условия записи спектров: фон – алюминиевая фольга (без напыления), режим записи спектров – отражение, объектив 36 × IR. В каждой трубке сканировали по 40 равноудаленных точек: первая точка – максимально близко к дистальной апертуре пыльцевого зерна, не входя в тело зерна, последняя – максимально близко к кончику трубки, не выходя из него. Число сканирований в каждой точке позиционирования – 1024, разрешение – 0.0004 мкм. В качестве внутреннего стандарта выбрана полоса поглощения 2920 см.

Пиролизная газовая хроматография – масс-спектрометрия. Анализ проводили на системе газовой хроматографии – масс-спектрометре QP-2010 Plus (Shimadzu, Япония), оснащенном

пиролизером EGA/PY-3030D (Frontier Lab, Япония) и криоуловителем с жидким азотом. Образцы проросшей пыльцы были приготовлены аналогично методу ИК-спектроскопии. Образцы пыльцы использовали для анализа без дополнительной пробоподготовки. Образцы проросшей пыльцы или пыльцевых зерен (1.8–2.7 мг) помещали в микротигли из нержавеющей стали и подвергали термическому разложению в атмосфере гелия путем нагревания от 50 до 600°C со скоростью 50°C/мин. Хроматографическое разделение продуктов пиролиза проводили на капиллярной колонке HP-5ms (Agilent, США) размером 30 × 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа-носителя использовался гелий высокой чистоты со скоростью потока 1 мл/мин. Температурный режим колонки был запрограммирован следующим образом: 40°C выдерживали в течение 2 мин; затем линейный подъем на 3°C/мин до 320°C в течение 5 мин. Масс-спектрометрическое детектирование проводили с электронной ионизацией (70 эВ) в режиме сканирования в диапазоне 35–600 кДа при скорости сканирования 2 кДа/с. Обнаруженные соединения идентифицировали с использованием библиотеки NIST/Wiley 2011.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У ели, как и у большинства других видов сем. Pinaceae, прорастание микроспоры в микрогаметофит начинается еще внутри микроспорангия. В результате трех последовательных делений, сначала ядра микроспоры, а затем антеридиальной клетки образуется 4-клеточный (реже 5-клеточный) мужской гаметофит, включающий обычно две рудиментарные проталлиальные, генеративную и сифоногенную (вегетативную) клетки. Первая проталлиальная клетка довольно быстро дегенерирует, превращаясь в пикноту, вторая приобретает линзовидную форму и может сохраняться еще некоторое время. Дальнейшее развитие мужского гаметофита у ели происходит уже после раскрытия микроспорангия и попадания пыльцевого зерна на нуцеллус семязачатка, где пыльца прорастает в пыльцевую трубку. Ядро сифоногенной клетки перемещается в пыльцевую трубку, постоянно двигаясь в сторону ее растущего кончика. В результате деления генеративной клетки образуются сперматогенная (базальная, спермиогенная) и стерильная (стебельковая) клетки. Сперматогенная клетка делится, образуя два спермия, один из которых оплодотворяет яйцеклетку. Оплодотворение у ели происходит спустя приблизительно месяц после опыления [26, 27].

Источником углеводов, необходимых для построения тела пыльцевой трубки, главным об-

разом ее стенок, служат водорастворимые сахара. Традиционно для проращивания пыльцы на искусственных средах используют сахарозу [28, 29]. Пыльца у ели может прорасти и на дистиллированной воде, используя собственные запасы сахаров, но пыльцевые трубки в этом случае растут гораздо медленнее и в них образуется значительно меньше амилопластов. Показатели жизнеспособности пыльцы, пророщенной на средах, содержащих сахарозу и глюкозу, были достоверно выше по критерию t_{st} по сравнению с другими вариантами опыта. На средах, содержащих целлобиозу, процент проросшей пыльцы был относительно невысок, но при этом формировались довольно длинные пыльцевые трубки. В целом, пыльцевые трубки у ели лучше росли на средах, содержащих глюкозу (табл. 1).

Таблица 1. Влияние состава сахаров на прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок ели *in vitro*

Углеводный компонент среды	Жизнеспособность пыльцы ($X \pm m_x$), %	Длина пыльцевой трубки ($X \pm m_x$), мкм
Сахароза	75.5 ± 11.7	283.4 ± 30.5
Глюкоза	93.4 ± 9.5	416.7 ± 34.7
Раффиноза	1.1 ± 0.8	122.4 ± 25.4
Фруктоза	33.4 ± 15.5	254.5 ± 29.6
Мальтоза	13.5 ± 7.0	244.0 ± 28.0
Манноза	0	—
Галактоза	6.0 ± 3.2	105.3 ± 15.5
Целлобиоза	18.4 ± 7.3	410.5 ± 33.3

Однако лучшие результаты были получены при проращивании пыльцы ели на средах, содержащих сахарозу с добавлением небольшого количества (не более 0.001 мг/мл) борной кислоты. Добавление бора в среду в столь малых концентрациях не влияло на pH среды. Стимулирующее влияние бора на прорастание пыльцы впервые обнаружил Т. Schmucher [30]. Позднее это было подтверждено многими исследованиями [31–34].

Для проращивания пыльцы ели наиболее подходят слабо кислые или близкие к нейтральным питательные среды. Пыльца ели почти одинаково хорошо проросла на агаровых средах в диапазоне pH 5.8–8.2. Показатель энергии роста пыльцевых трубок, о котором косвенно можно судить по их длине, был более чувствителен к изменению pH среды, по сравнению со способностью пыльцы к прорастанию (рис. 1).

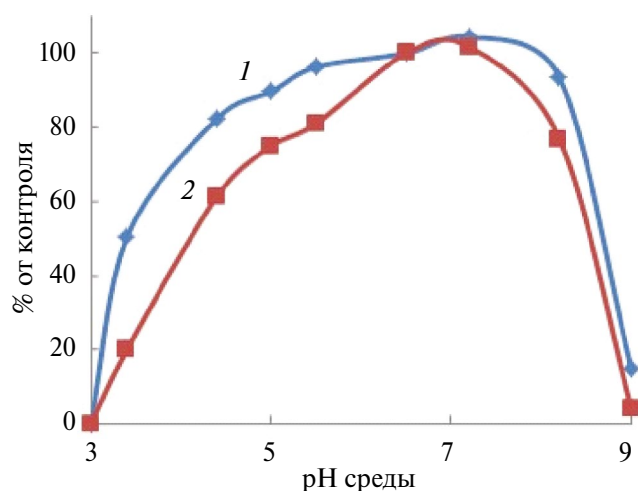


Рис. 1. Влияние pH среды на прорастание пыльцы и рост пылевых трубок ели *in vitro*: 1 – жизнеспособность пыльцы; 2 – средняя длина пылевой трубки.

В течение первых 12–14 ч после посева пыльцы ели на питательную среду происходила гидратация пылевых зерен. В это время пылевые зерна выделяют АТФ, необходимую для инициации прорастания пыльцы и роста пылевых трубок во внеклеточный матрикс [35, 36]. В это же время в пылевых зернах происходит интенсивный синтез целлюлозы. При окрашивании калькофлуором пыльцы ели, гидратированной в течение 2–3 ч в водной суспензии, проявлялась яркая флуоресценция в виде узкой полосы в меридиональной плоскости по обе стороны внутренней поверхности оболочки пылевого зерна (в интине), перпендикулярно дистальной борозде прорастания. Это полузамкнутое кольцо имело разрыв в проксимальной зоне пылевого зерна (рис. 2а, б). В наших опытах при окрашивании гидратированных пылевых зерен ели анилиновым синим флуорес-

ценция в них отсутствовала. При окрашивании калькофлуором не гидратированной пыльцы флуоресценция также не наблюдалась (рис. 2г).

После прорастания пылевого зерна в трубку флуоресцирующая полоска быстро исчезала. Вновь синтезированная в процессе гидратации целлюлоза перед прорастанием пыльцы скапливалась вблизи дистальной борозды, а затем, вероятно, перемещалась в пылевую трубку, участвуя в построении ее стенки. В самом кончике трубки целлюлоза, по-видимому, отсутствовала, или ее количество было очень мало (рис. 3а).

При окрашивании калькофлуором на поверхности пылевых трубок ели в УФ свете проявлялось замкнутое поперечное кольцо целлюлозы (рис. 3а, в, д).

Максимальная скорость роста (примерно 12 мкм/ч) пылевой трубки у ели наблюдалась в течение 10–15 ч (спустя 30–45 ч после посева пыльцы). Затем скорость роста трубок начинала постепенно замедляться. Примерно через 110–112 ч после посева рост трубок визуально не наблюдался. Относительно высокая скорость роста обуславливает некоторые физиологические особенности развития пылевых трубок у ели.

Начало прорастания пылевого зерна ели в пылевую трубку показано на рис. 4а. При проращивании пыльцы ели на средах, содержащих сахарозу, формировались длинные массивные трубки, часто с булавовидным или шаровидным утолщением (вздутием) кончика (рис. 4б). Длина пылевых трубок составляла 430–480 мкм, иногда она могла достигать 1000–1200 мкм и более (рис. 4в, г).

При проращивании пыльцы ели *in vitro* наблюдались случаи как простого дихотомического ветвления, так и биполярный рост пылевых трубок [37, 38]. Примеры ветвления, биполярного роста и тератологии пылевых трубок у ели показаны на рис. 4д, е, ж, з, и. При проращивании пыльцы на сахаросодержащей среде

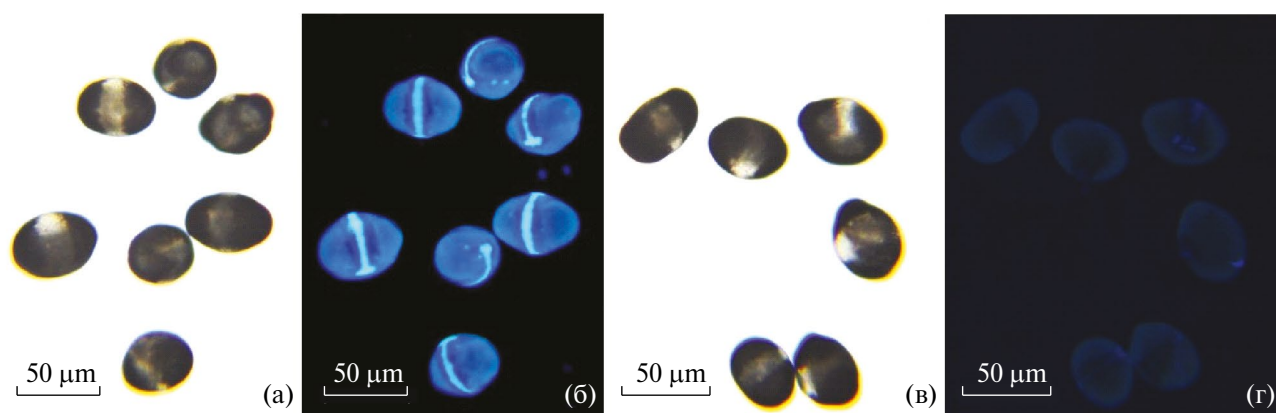


Рис. 2. Характер флуоресценции пылевых зерен ели при окрашивании калькофлуором: а, б – пыльца после 3-часовой гидратации в водной суспензии; в, г – не гидратированная пыльца; а, в – проходящий белый свет; б, г – флуоресценция в УФ-свете.

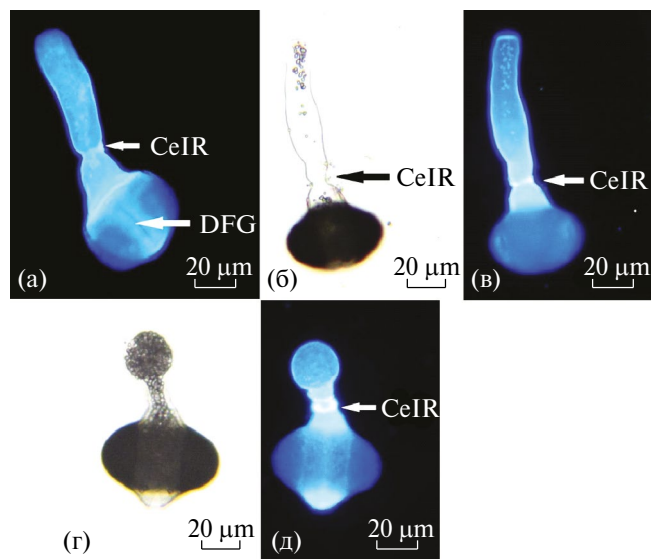


Рис. 3. Пыльцевые трубки ели после прорастивания в течение 24 ч на агаровой среде с 5% сахарозы, окрашенные калькофлуором: б-в, г-д – парные рисунки; б, г – проходящий белый свет, а, в, д – флуоресценция в УФ свете. DFG – дистальная борозда прорастания, CeIR – кольцо целлюлозы.

избыток гидролизованной глюкозы депонируется в форме крахмала в амилопластах, которые могут занимать значительный объем пыльцевой трубки (кроме самого кончика).

Пыльцевые зерна у ели *in vivo* прорастают в трубки на 2–3 день после попадания на нуцеллус семязачатка. Период между опылением и оплодотворением у нее составляет около 30 дней. Образование спермиев происходит непосредственно перед оплодотворением. При культивировании *in vitro* пыльцевые трубки развиваются относительно автономно и растут значительно быстрее, поэтому у ели можно наблюдать заключительные стадии развития мужского гаметофита, включая образование спермиев [39].

В растущих пыльцевых трубках происходит активный синтез и накопление крахмала, являющегося источником глюкозы, необходимой для последующего биосинтеза полисахаридов, в основном и формирующих стенку пыльцевой трубки у голосеменных. В образцах проросшей пыльцы ели значительно больше, по сравнению

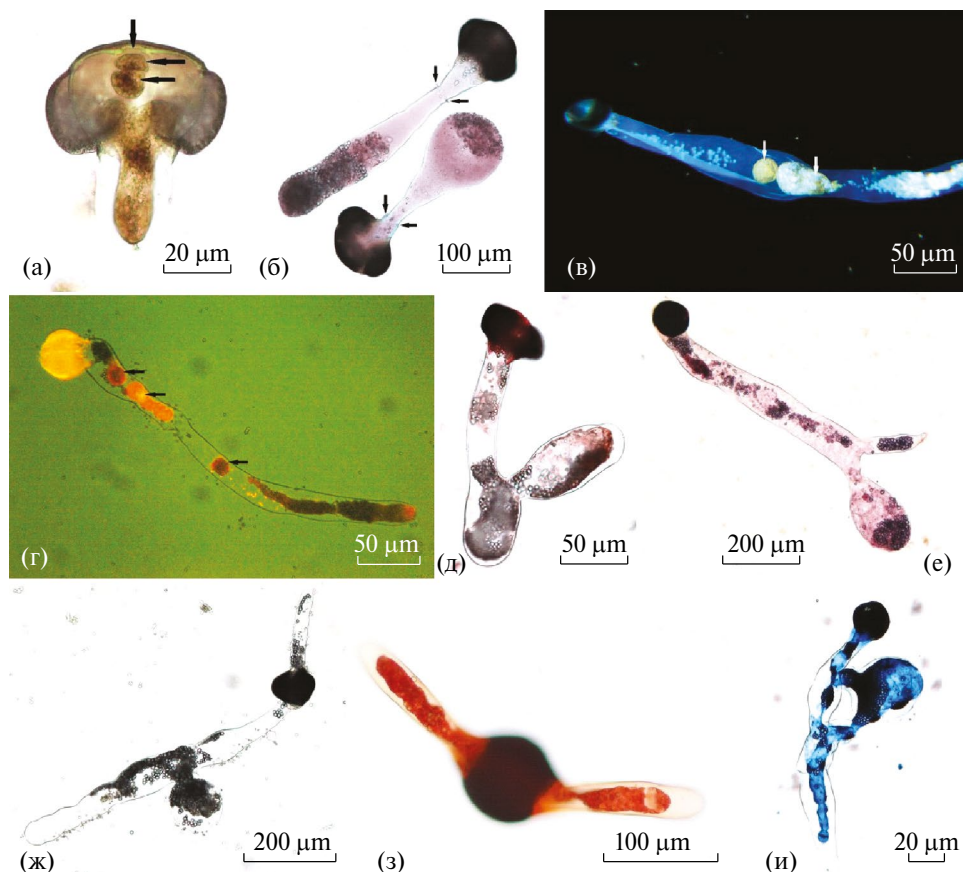


Рис. 4. Пыльцевые трубки ели: а – прорастивание в течение 24 ч; б, д, е, ж, з, и – прорастивание в течение 72 ч; в, г – прорастивание в течение 96 ч. Окрашивание: а – бромкрезоловым пурпуром; б – эриохромом черным (стрелками показаны границы внешнего кольца целлюлозы); в – DAPI; г – SYPRO Rubi Protein Gel Stain; д, е – метиловым зеленым – пиронином G; ж – не окрашенные; з – окрашивание сафранином; и – Кумасси R-250); д-ж – ветвление; ж, з – биполярный рост; ж, и – тератология. 2-nd PC – вторая проталлиальная клетка, GCN – ядро генеративной клетки, VCN – ядро вегетативной клетки, TCN – ядро клетки трубки, SpCN – ядро спермиогенной клетки, StCN – стебельковая клетка с ядром и цитоплазмой.

с не проросшей пылью, содержалось полисахаридов, ароматических углеводов, танинов, а также несколько увеличивалось содержание нуклеиновых кислот и белков. В проросшей пыльце ели значительно меньше, по сравнению с не проросшей, содержалось алифатических углеводов, лигнина, фенолов, жиров и восков. Все перечисленные во втором случае компоненты входят в состав экины пыльцевых зерен, которые сохраняются в образцах с проросшей пылью. Следует отметить значительное уменьшение содержания стероидов (кампестерина и ситостерина) в пыльцевых трубках по сравнению с не проросшей пылью (табл. 2).

Содержание белков, аминокислот, РНК, ДНК, липидов и полисахаридов по градиенту длины пыльцевых трубок у ели довольно лабильно, постепенно возрастало по направлению к растущему кончику, и стабилизировалось по достижении примерно половины их максимальной длины. Общее содержание углеводов в пыльцевых трубках у ели по градиенту длины почти не менялось (рис. 5).

У ели уже на начальной стадии роста пыльцевой трубки вновь синтезированная каллоза начинала скапливаться сначала в дистальной части, а затем и в самом кончике трубки (рис. 6а, б, в).

Во время роста трубки часть каллозы перемещалась на внешнюю поверхность стенки трубки, вероятнее всего, через ее кончик, но, возможно,

также из проксимальной зоны трубки или из наружного слоя интины пыльцевого зерна. Не исключено, что донором каллозы в последнем случае могли служить тельца Убиша, которые содержат значительное количество полисахаридов и, вероятно, контактируют с поверхностью интины пыльцевых зерен, и активно участвуют в их быстрой гидратации [40]. Скорее всего, барьером, вокруг которого скапливалась каллоза, служили сформировавшиеся ранее на поверхности пыльцевых трубок кольца целлюлозы (рис. 3). Не исключено, что микрофибриллы целлюлозы в этих локациях дезориентированы (рис. 4б). В результате на внешней поверхности трубки формировалось узкое замкнутое кольцо, состоящее, по-видимому, в основном из каллозы. Этот процесс мог повторяться несколько раз, и на поверхности трубки могло образовываться до 2–3, редко более, таких колец. По мере роста трубки эти кольца сохраняли свое исходное положение, а ее растущий кончик все более отдалялся от них (рис. 6б, в, г, е). Следует отметить, что кольца каллозы формировались на поверхности пыльцевых трубок, выращенных как на средах, содержащих сахарозу, так и без нее.

Когда к суспензионной культуре проросшей пыльцы добавляли водный раствор ламинариназы, которая катализирует гидролитическое расщепление каллозы, эти кольца довольно быстро элиминировали (рис. 7).

Таблица 2. Компонентный состав пыльцевых зерен и проросшей пыльцы ели (% от общего количества идентифицированных веществ)

Компоненты	Пыльцевые зерна	Проросшая пыльца
Углеводы	15.7	68.1
Алифатические углеводороды	15.5	6.3
Ароматические углеводороды	0	2.0
Лигнин	8.0	1.0
Танины	1.6	7.5
Фенолы	26.5	5.2
Жиры и жирные кислоты	5.0	1.2
Воска	16.0	4.7
ДНК и белки	1.5	2.2
Стероиды	10.2	1.8

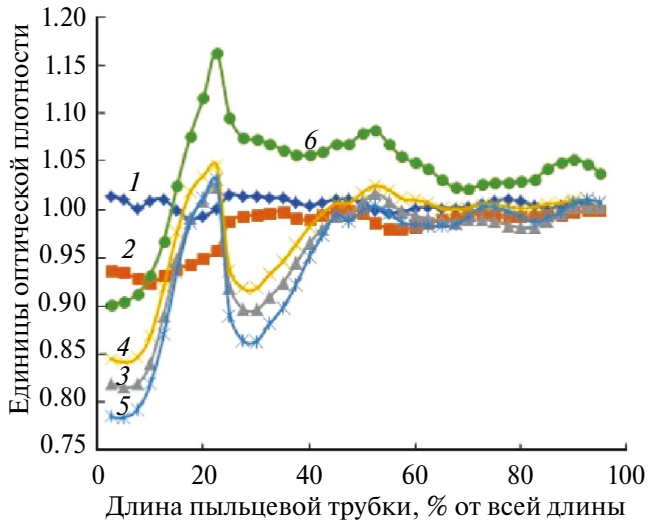


Рис. 5. Компонентный состав пыльцевой трубки ели по градиенту длины по результатам FT-IR спектроскопии (пример). 1 — длина волны 3358 — О-Н группы: углеводы; 2 — 3030 — С-Н связи: ароматические кольца; 3 — 1700 — С=О связи: карбонильные и карбоксильные группы (белки, РНК, ДНК, липиды); 4 — 1632 — пик связанной воды; 5 — 1512 — аминокислоты (тирозин, фенилаланин, триптофан) и соответствующие белки и, возможно, ароматические углеводороды (фенол); 6 — 1020 — С-О-С связи: полисахариды.

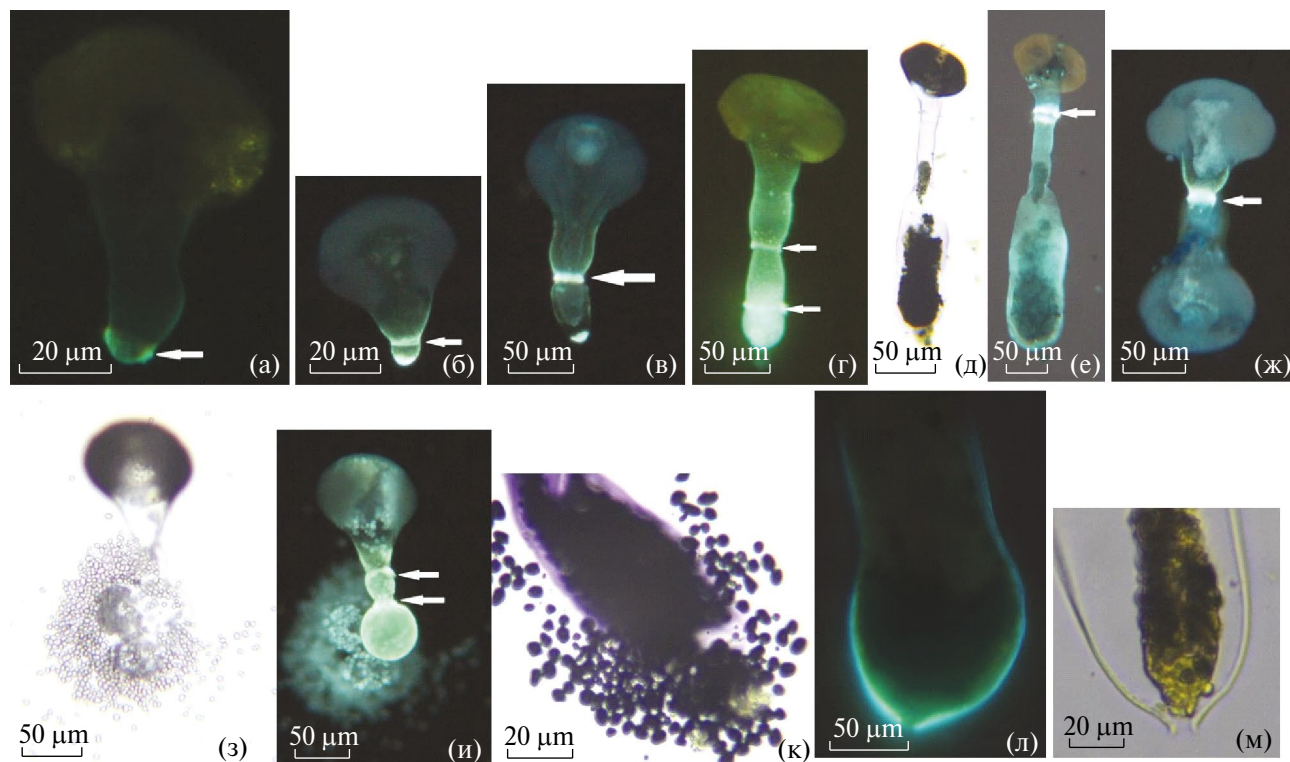


Рис. 6. Локализация каллозы в растущих пыльцевых трубках ели (а, б, в, г, д, е), характер разрушения наружных мембран, стенок и кончиков трубок при избыточном тургорном давлении (ж, з, и, к), расхождение боковых стенок на кончиках трубок (л, м). Окрашивание: а, б, в, г, ж, з, и, л – анилиновым синим; д, е, к – анилиновым синим – J₂KJ; м – J₂KJ. Флуоресценция в ультрафиолетовом (а, б, в, г, е, ж, и, л) и проходящем белом свете (д, з, к, м), д-е, з-и – парные рисунки (левые – проходящий белый свет, правые – флуоресценция). Стрелками показана локализация колец каллозы.

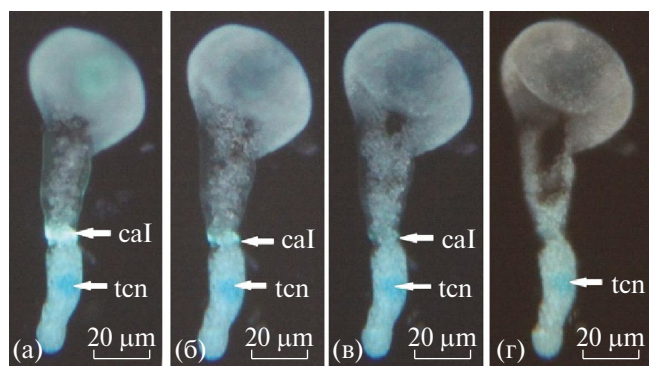


Рис. 7. Разрушение наружного кольца каллозы под воздействием ламинариназы в течение: а – 0 мин; б – 10 мин; в – 20 мин; г – 30 мин. cal – каллоза, tcn – ядро клетки трубки.

Показанные на рис. 6 кольца на внешней поверхности пыльцевых трубок ели, по-видимому, обладают довольно высокой механической прочностью и, плотно сдавливая тело трубки, создают избыточное тургорное давление. Сама по себе каллоза, имея гелеобразную консистенцию, не обладает этими свойствами. По-видимому, такая жесткость обеспечивается за счет целлюлозных микрофибрилл, встроенных в эти кольца.

Кольца на поверхности пыльцевых трубок у ели можно рассматривать как своеобразные клапаны, которые повышают тургор, снижая скорость всасывания воды через растущий кончик. Кроме того, они, в определенной степени, способствуют компартментализации цитоплазмы, затрудняя связь дистальной части протопласта, ассоциированного с ядром клетки трубки, с его проксимальной частью (рис. бд, е). Повышенный тургор в дистальной зоне трубки способствовал разрывам плазмалеммы в этой зоне (рис. бж), кончиков и стенок трубок у ели (рис. бз, и), сопровождающихся взрывным высвобождением избыточного количества накопленных амилопластов (рис. бз, и, к). Такие разрывы являются распространенным явлением, но они редко приводят к фатальному исходу и, в большинстве случаев, легко устраняются как с помощью уже накопленной, так и вновь синтезируемой каллозы. Следует отметить, что тургор в пыльцевых трубках у ели может, по-видимому, регулироваться и иными путями (рис. бл, м). Кольца каллозы на поверхности пыльцевых трубок ели недолговечны, и к концу прорастивания они обычно исчезали.

Локализация каллозы в пыльцевых трубках у ели сильно варьировала. Следовательно, кал-

лозу в пыльцевых трубках у этого вида следует рассматривать как ситуативный антистрессовый полисахарид, который не является постоянным компонентом стенки трубки.

Исследования проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федеральному исследовательскому центру комплексного изучения Арктики Уральского отделения Российской академии наук (шифр: FUUW-2022-0057, № гос. регистрации: 122011400384-2).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernando D.D., Quinn Ch.R., Brenner E.D., Owens J.N. Male gametophyte development and evolution in extant Gymnosperms // Int. J. Plant Dev. Biol. 2010. V. 4. P. 47.
2. Breygina M., Klimenko E., Schekaleva O. Pollen germination and pollen tube growth in Gymnosperms // Plants. 2021. V. 10. P. 1301.
<https://doi.org/10.3390/plants10071301>
3. Derksen J., Li Y.-Q., Knuiman B., Geurts H. The wall of *Pinus sylvestris* L. pollen tubes // Protoplasma. 1999. V. 208. P. 26.
<https://doi.org/10.1007/BF01279072>
4. Mollet J.-C., Leroux C., Dardelle F., Lehner A. Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth // Plants. 2013. V. 2. P. 107.
<https://doi.org/10.3390/plants2010107>
5. Justus C.D., Anderhag P., Goins J.L., Lazzaro M.D. Microtubules and microfilaments coordinate to direct a fountain streaming pattern in elongating conifer pollen tube tips // Planta. 2004. V. 219. P. 103.
<https://doi.org/10.1007/s00425-003-1193-2>
6. Chebli Y., Kroeger J., Geitmann A. Transport logistics in pollen tubes // Mol. Plant. 2013. V. 6. P. 1037.
<https://doi.org/10.1093/mp/sst073>
7. Li G.-P., Huang Q.-C., Yang L.-S., Qin G.-Y. In vitro pollen germination and pollen tube growth of *Pinus thunbergii* // Forest Research. 2007. V. 20. P. 224.
8. Krichevsky A., Kozlovsky S.V., Tian G.W., Chen M.H., Zaltsman A., Citovsky V. How pollen tubes grow // Dev. Biol. 2007. V. 303. P. 405.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.003>
9. Williams J.H., Edwards J.A., Ramsey A.J. Economy, efficiency, and the evolution of pollen tube growth rates // Am. J. Bot. 2016. V. 103. P. 471.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1500264>
10. Schlüpmann H., Bacic A., Read S.M. Uridine-diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto // Plant Physiol. 1994. V. 105. P. 659.
<https://doi.org/10.1104/pp.105.2.659>
11. Ferguson C., Teeri T.T., Siika-aho M., Read S.M., Bacic A. Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum* // Planta. 1998. V. 206. P. 452.
<https://doi.org/10.1007/s004250050421>
12. Chebli Y., Kaneda M., Zerkour R., Geitmann A. The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube – spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides // Plant Physiol. 2012. V. 160. P. 1940.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.199729>
13. Mogami N., Miyamoto M., Onozuka M., Nakamura N. Comparison of callose plug structure between dicotyledon and monocotyledon pollen germinated in vitro // Grana. 2006. V. 45. P. 249.
<https://doi.org/10.1080/00173130600726687>
14. Nishikawa S., Zinkl G.M., Swanson R.J., Maruyama D., Preuss D. Callose (β -1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth // BMC Plant Biol. 2005. V. 5. P. 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-22>
15. Li Y.-Q., Moscatelli A., Cai G., Cresti M. Functional interactions among cytoskeleton, membranes, and cell wall in the pollen tube of flowering plants // Int. Rev. Cyt. 1997. P. 133.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61610-1](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61610-1)
16. Parre E., Geitmann A. More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 274.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.050773>
17. Williams J.H. Novelty of the flowering plant pollen tube underlie diversification of a key life history stage // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. V. 105. P. 11259.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0800036105>
18. Yatomi R., Nakamura S., Nakamura N. Immunohistochemical and cytochemical detection of wall components of germinated pollen of Gymnosperms // Grana. 2002. V. 41. P. 21.
<https://doi.org/10.1080/00173130260045468>
19. Chen T., Wu X., Chen Y., Li X., Huang M., Zheng M., Baluška F., Šamaj J., Lin J. Combined proteomic and cytological analysis of Ca^{2+} -calmodulin regulation in *Picea meyeri* pollen tube growth // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 1111.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.127514>
20. Chichiricò G., Spanò L., Torraca G., Tartarini A. Hydration, sporoderm breaking and germination of *Cupressus arizonica* pollen // Plant Biol. 2009. V. 11. P. 359.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00134.x>
21. Pacini E., Franchi G.G., Ripaccioli M. Ripe pollen structure and histochemistry of some Gymnosperms // Plant Syst. Evol. 1999. V. 217. P. 81.
<https://doi.org/10.1007/BF00984923>

22. Parrotta L., Faleri C., Del Casino C., Mareri L., Aloisi I., Guerriero G. Biochemical and cytological interactions between callose synthase and microtubules in the tobacco pollen tube // *Plant Cell Rep.* 2022. V. 41. P. 1301. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02860-3>
23. Правдин Л.Ф. Ель европейская и ель сибирская в СССР. М.: Наука, 1975. 200 с.
24. Белик А.А., Зуева А.О. Выделение, свойства и аминокислотные последовательности двух 1,3-β-D-глюконаз брюхоногого моллюска *Lambis* sp. // Вестник ДВО РАН. 2018. № 2. С. 159.
25. Cao Y., Hao R.-Z., Liu M.-Q., An X.-M., Jing Y.-P. Distribution of nuclei and microfilaments during pollen germination in *Populus tomentosa* Carr. // *Afr. J. Agric. Res.* 2012. V. 7. P. 2679.
26. Singh H. Embryology of Gymnosperms. Berl.-Stuttg.: Gerb. Borntraeger, 1978. 304 p.
27. Козубов Г.М., Тренин В.В., Тихова М.А., Кондратьева В.П. Репродуктивные структуры голосеменных (сравнительное описание). Ленинград: Наука, 1982. 104 с.
28. Tushabe D., Rosbakh S. A compendium of *in vitro* germination media for pollen research // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12: 709945.
29. Sede A.R., Wengier D.L., Borassi C., Estevez J.M., Muschietti J.P. Imaging and analysis of the content of callose, pectin, and cellulose in the cell wall of *Arabidopsis* pollen tubes grown *in vitro* // *Pollen and pollen tube biology: methods and protocols* / Ed. A. Geitmann. Publisher: Humana. 2020. P. 242. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0672-8>
30. Schmucher T. Bor als physiologisch entscheidendes element // *Naturwiss.* 1932. № 20. S. 839. <https://doi.org/10.1007/BF01494925>
31. Stanley R.G., Linskens H.F. Pollen (biology, biochemistry, management). Berlin, Heidenberg, N.Y.: Springer-Verlag. 1974. 307 p.
32. Wang Q.L., Lu L.D., Wu X.Q., Li Y.Q., Lin J.X. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri* // *Tree Physiol.* 2003. V. 23. P. 345. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.5.345>
33. Korkmaz N., Guneri M. Effect of different boron levels on pollen germination of hicaznar pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivar // *Int. J. Agric. Life Sci.* 2019. V. 3. P. 151.
34. Castillo S.E., Tovar J.C., Shamin A., Gutierrez J., Pearson P., Gehan M.A. A protocol for *Chenopodium quinoa* pollen germination // *Plant Methods.* 2022. V. 18: 65. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00900-3>
35. Zhou J., Fan C., Liu K., Jing Y. Extracellular ATP is involved in the initiation of pollen germination and tube growth in *Picea meyeri* // *Trees.* 2015. V. 29. P. 563. <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1135-6>
36. Dutta R., Sahai P., Kenneth R., Robinson K.R. Mechanisms involved in pollen tube growth: a review // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 2021. V. 22. P. 191. <https://ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/7216>
37. Горячкина О.В., Седаева М.И. Морфология и качество пыльцы у видов рода *Picea* (Pinaceae) из коллекции дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН // *Растительный мир Азиатской России.* 2012. № 2(10). С. 27.
38. Breygina M., Maksimov N., Polevova S., Evmenyeva A. Bipolar pollen germination in blue spruce (*Picea pungens*) // *Protoplasma.* 2019. V. 256. P. 941. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01333-3>
39. Dawkins M.D., Owens J.N. *In vitro* and *in vivo* pollen hydration, germination, and pollen-tube growth in white spruce, *Picea glauca* (Moench) Voss. // *Int. J. Plant Sci.* 1993. V. 154. P. 506.
40. Surso M.V., Chuhchinb D.G., Khviyuzov S.S., Pokryishkin S.A. Mechanism of pollen germination and pollen tubes growth in common juniper (*Juniperus communis* L.) *in vitro* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. P. 294. <https://doi.org/10.1134/S1062360420050070>

УДК 581.1

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САРЦИНОИДНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Chlorosarcinopsis eremi* (Chlorophyceae, Chlorophyta)¹

© 2024 г. Н. В. Данцюк^{a,*}, И. Н. Чубчикова^a, А. Д. Темралеева^b,
Г. С. Минюк^a, И. В. Дробецкая^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

^bВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

*e-mail: nterent@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

Исследован штамм VKM AI-132 зеленой сарциноидной микроводоросли, изолированный из каштановой почвы зоны сухих степей (Волгоградская область, Россия). По результатам световой и сканирующей электронной микроскопии, а также молекулярно-филогенетического анализа гена 18S рРНК и спейсера ITS2 штамм был идентифицирован как *Chlorosarcinopsis eremi*. Изучены особенности его роста и вторичного каротиногенеза в условиях двухстадийной питательной культуры. Средняя продуктивность по сухой биомассе за 21 сут. эксперимента составляла 0.12 г/л·сут., а по суммарным каротиноидам — 0.2 мг/л·сут. В конце стадии вторичного каротиногенеза при доле суммарных каротиноидов в сухой биомассе около 0.25% доминирующими фракциями были кантаксантин и диэфиры астаксантина, причем сумма эфиров астаксантина достигала 36% от суммарных каротиноидов. Показано, что штамм VKM AI-132 может служить потенциально перспективным объектом дальнейших экспериментальных работ, направленных на оптимизацию условий для интенсификации процесса биосинтеза кетокаротиноидов.

Ключевые слова: кетокаротиноиды, морфология, молекулярно-генетический анализ, продуктивность, хлорофитовые водоросли

DOI: 10.31857/S0015330324060159, EDN: LVWNNM

ВВЕДЕНИЕ

Зеленые сарциноидные водоросли повсеместно распространены в наземных, пресноводных и морских экосистемах и характеризуются способностью к особому типу вегетативного деления — десмосхизису, которое происходит в различных плоскостях, в результате чего образуются двух- и трехмерные комплексы клеток. Все три класса зеленых водорослей — Ulvophyceae, Trebouxiophyceae и Chlorophyceae (UTC-клада), которые составляют ядро отдела Chlorophyta, включают роды с сарциноидной организацией таллома. Однако наиболее представлены сарциноидные микроводоросли в классе

Chlorophyceae, которые ранее были объединены по этому признаку в порядок Chlorosarcinales [1]. В порядок были включены водоросли с “жесткими” (*Spongiococcum*, *Tetracystis*, *Fasciculochloris*, *Heterotetracystis*, *Borodinellopsis*, *Axilosphaera*) и “голыми” (*Borodinella*, *Friedmannia*, *Pseudotetracystis*, *Ignatius*, *Chlorosarcina*, *Desmotetra*, *Planophila*, *Neochlorosarcina*, *Chlorosarcinopsis*, *Chlorosphaeropsis*, *Chloroplana*) зооспорами, что и явилось признаком для разделения их на семейства Tetracystidaceae и Chlorosarcinaceae, соответственно [2]. Однако с развитием молекулярно-филогенетического анализа было неоднократно показано, что порядок Chlorosarcinales является искусственным и, согласно последнему таксономическому пересмотру, микроводоросли с “голыми” зооспорами входят в порядок Chlamydomonadales (=Volvocales) [3–5].

Интерес к сарциноидным микроводорослям обусловлен способностью некоторых из них

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324060159

Сокращения: ВКГ — вторичный каротиногенез, ККар — кетокаротиноиды, СБ — сухая биомасса, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ТСХ — тонкослойная хроматография, Хл а — хлорофилл а, Хл b — хлорофилл b.

в неблагоприятных условиях (дефицит влаги и биогенных элементов, высокая освещенность, температура и т.д.) накапливать большое количество специфических вторичных экстрактивных кетокаротиноидов (ККар), структурно и функционально не связанных с фотосинтетическим аппаратом клетки и выполняющих защитную функцию в условиях абиотического стресса [6]. Это астаксантин и близкие ему по структуре и биологической активности метаболитические предшественники (кантаксантин, адониксантин, адонирубин) [7, 8]. В качестве мощных антиоксидантов и иммуномодуляторов ККар представляют ценность для пищевой и косметической промышленности, фармакологии, сельского хозяйства.

Зеленые микроводоросли (Chlorophyta) – самая многочисленная группа микроорганизмов, обладающая способностью синтезировать и накапливать ККар. Процесс вторичного каротиногенеза (ВКГ) характерен преимущественно для представителей порядков Sphaeropleales и Chlamydomonadales, среди которых наиболее изучены роды *Haematococcus*, *Neochloris*, *Chromochloris* и *Coelastrella* [9]. Тем не менее удешевление и активное введение в практику полногеномного секвенирования позволило во многих микроводорослевых геномах обнаружить ортологи β-каротин кетазазы – фермента, обеспечивающего синтез ККар из β-каротина [7]. Это свидетельствует о том, что число видов каротиногенных микроводорослей гораздо больше, чем принято считать.

Род *Chlorosarcinopsis* (Chlamydomonadales), представители которого являются обитателями почвенных и песчаных (часто засушливых) местообитаний и колонии которых в неблагоприятных условиях приобретают ярко-оранжевый цвет за счет аккумуляции ККар [2, 9], изучен недостаточно. По немногочисленным литературным данным во фракционном составе его ККар доминирует кантаксантин [8, 9]. Перспективность изучения рода была подтверждена несколькими исследованиями по секвенированию пластидного и митохондриального геномов [10, 11].

Цель данной работы заключалась в изучении морфологических и молекулярно-генетических характеристик штамма VKM AI-132, исследовании особенностей его роста в условиях двухстадийной накопительной культуры и анализе фракционного состава кетокаротиноидов на стадии вторичного каротиногенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлся штамм сарциноидной зеленой микроводоросли VKM AI-132 (ранее ACSSI 132) из Всероссийской кол-

лекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Штамм был изолирован в 2014 г. из верхнего горизонта каштановой солонцеватой почвы около с. Перегрузное Волгоградской области (47°53'21" с.ш., 44°0'50" в.д.) путем посева почвенной суспензии на твердую питательную среду BG11 с азотом (1% агар, pH = 7.0) и многократного пересева отдельных колоний микроводорослей методом истощающего штриха.

Световая и электронная микроскопия

Изучение морфологии и жизненного цикла штамма проводили методами световой микроскопии с помощью микроскопа Leica DM750 ("Leica", Германия). Результаты наблюдений документированы фотографиями, снятыми с помощью цифровой камеры Leica Flexacam C3 ("Leica", Германия). Сроки наблюдения составляли от 2 нед. до 6 мес. При морфологической идентификации учитывали форму, структуру и размеры пакетов; форму и размеры отдельных вегетативных клеток; тип хлоропласта; наличие, количество пиреноидов и тип крахмальной обкладки; особенности размножения и другие характеристики [2]. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) 0.5 мл культуры фиксировали 2% глутаровым альдегидом в 6.67 mM Na-K-фосфатном буфере (ФБ) с постфиксацией 0.005% раствором Люголя в ФБ и дегидратировали в серии возрастающих концентраций этанола [12]. СЭМ-изображения клеток получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 ("Hitachi", Япония).

Молекулярно-генетический анализ

Тотальную ДНК из штамма выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit ("Qiagen", США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS ("Евроген", Россия).

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) гена 18S рРНК и спейсера ITS2 были использованы праймеры, рекомендованные в статьях Katana [13] и White [14], соответственно (Дополнительные материалы, табл. S1).

Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1% агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini ("Евроген", Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО Синтол, ("Синтол", Россия).

Далее осуществлялась сборка гена 18S рРНК и поиск гомологии по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Реконструкцию

филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. За основу была принята филогенетическая реконструкция из статьи Т. Nakada [15, 16], но с более расширенной кладой *Arenicolinia*. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями гомологичных генов охарактеризовали с помощью генетических дистанций. Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выравненных последовательностей, вычисление которого проводили в программе MEGA 6.0 с использованием двухпараметрической модели Кимуры (K2P). Филогенетические связи визуализировали с помощью программы FigTree v1.3.1. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами KY086471 (18S рРНК) и MG523292 (ITS2).

Условия культивирования

Водоросли выращивали методом двухстадийной накопительной культуры [17], который позволяет в рамках одного эксперимента получить данные, характеризующие рост и метаболизм каротиногенных микроводорослей на стадиях активного роста культуры (“зеленая” стадия) и вторичного каротиногенеза как защитной реакции клеток на абиотический стресс (“красная” стадия). В качестве питательной среды использовали среду BBM [18], в 1 л которой содержится: NaNO_3 – 241 мг; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 75 мг; NaCl – 25 мг; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 75 мг; KH_2PO_4 – 175 мг; (Na_2 -ЭДТА) – 50 мг; KOH – 31 мг; H_3BO_3 – 11 мг; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8.82 мг; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 44 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2.42 мг; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1.57 мг; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.49 мг; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4.98 мг; H_2SO_4 конц. – 1 мкл; CaCl_2 – 18.9 мг.

Инокулят выращивали на среде BBM при одностороннем боковом освещении светодиодными лампами Feron DL 20W T4 6400K (“Feron”, Россия) в течение 7 сут. Плотность потока ФАР составляла 52 мкмоль/(м²·с) с фотопериодом, приближенным к природному и рекомендованным для выращивания каротиногенных микроводорослей – 15 ч свет/9 ч темнота [19], и температуре 24°C.

В эксперименте штамм культивировали в пластиковых флаконах Tissue Culture Flasks (“Falcon”, США) объемом 0.75 л, исходный объем культур с начальным содержанием сухой биомассы (СБ) 0.3 г/л составлял 0.6 л.

На “зеленой” стадии штамм VKM Al-132 рос при естественном освещении на подокон-

нике окна, ориентированного на юго-запад. Культуру барботировали атмосферным воздухом при помощи аквариумного компрессора Resun ACO-9630 при скорости 0.44 л/(мин·л). Продолжительность “зеленой” стадии составляла 9 сут.

При переводе культуры на “красную” стадию, принимая во внимание недостаточность литературных сведений о характере реакции штамма на абиотический стресс, для индукции ВКГ был использован “облегченный” вариант стрессирования. Культура была переведена на двустороннее круглосуточное освещение светодиодными лампами Feron DL 20W T4 6400K (“Feron”, Россия) с плотностью потока ФАР 130 мкмоль/(м²·с) с каждой стороны. Температура в культуре составляла 28–29°C. На протяжении светового периода уровень pH 7.0 ± 0.5 поддерживали путем дозированной подачи углекислого газа (объемная доля CO_2 – 99.8% по ГОСТ 8050–85) при помощи электромагнитного клапана Camozzi A7E (“Camozzi”, Италия) и цифрового pH-контроллера Aqua Medic pH 2001C (“Aqua Medic”, Германия). Для дополнительной стимуляции ВКГ во флаконах 3% объема культуры заменили на 1% раствор NaCl до конечной концентрации в среде 5 мМ. Продолжительность “красной” стадии составляла 12 сут.

Определение сухой биомассы и пигментный анализ

Содержание сухой биомассы (СБ) измеряли гравиметрически [20] на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах с размером пор 3.0 мкм (“Владисарт”, Россия).

Содержание хлорофиллов и суммарных каротиноидов (Кар) в биомассе микроводорослей определяли спектрофотометрически на СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия) в диметилсульфоксидных [21] и в ацетоновых [22] экстрактах. Пигментный состав в конце “красной” стадии исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) ацетоновых экстрактов на пластинах “Silica gel 60” (“Merck”, Германия) с использованием последовательно двух систем растворителей: I – гексан-ацетон 9:1; II – гексан-бензол-ацетон 5:3.75:0.8. Идентификацию доминирующих фракций проводили путем сравнения со стандартами при совместной хроматографии, а также по спектрам поглощения в различных растворителях. Стандарт кантаксантина получали из цист ракообразного *Artemia* sp., эфиров астаксантина – из зрелых апланоспор микроводоросли *Haematococcus pluvialis* [23].

Измерения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. На рисунках и в тексте приведены средние значения ($\bar{x}$) и их стандартная ошибка (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Микроскопический анализ

Результаты наблюдений с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии позволили предположить принадлежность штамма VKM AI-132 к роду *Chlorosarcinopsis*, для которого характерно наличие клеточных пакетов, голых зооспор, пристенного хлоропласта и одного пиреноида с прерывистой крахмальной обкладкой. Молодые вегетативные клетки имели шаровидную форму до 8 мкм в диаметре, далее образовывали диады, тетрады и более сложные комплексы в результате десмосхизиса (рис. 1). Псевдонитчатых скоплений клеток не наблюдали. У стареющих культур (после 6 мес. хранения) отмечалось изменение цвета биомассы с зеленой на красно-коричневую, что может свидетельствовать о синтезе ККар при дефиците азота в истощенной среде. Именно это послужило основой интереса к данному штамму.

Культура была переведена на жидкую минеральную среду ВВМ после 9 лет хранения на твердой агаризованной (1%) среде BG-11 при температуре +15°C с ежегодным пересевом. Возможно, столь продолжительный срок стал причиной длительной адаптации штамма к условиям автотрофного роста: процесс получения генерации вегетативных делящихся клеток занял около 4 мес. с еженедельным пересевом. В начале адаптационного периода вегетативные клетки имели размер 3–5 мкм. Также было отмечено (преимущественно в первой половине дня) наличие подвижных зооспор, которые затем замедляли движение, останавливались и округлялись. Возможно, небольшие размеры в период адаптации объясняются тем, что мы наблюдали

клетки, только вышедшие из клеточных пакетов, либо остановившиеся зооспоры. Заданные стабильные внешние условия (освещенность и температура) и многократные частые пересевы жидкой культуры на подготовительном этапе позволили получить к началу эксперимента синхронизированную культуру.

Молекулярно-генетический анализ

По данным 18S рРНК анализа изучаемый штамм VKM AI-132 со 100% статистической поддержкой вошел в кладу *Arenicolinia* (рис. 2). Однако внутри клады не наблюдалось хорошо поддерживаемых групп из-за консервативности выбранного молекулярного маркера. Генетические различия изучаемого штамма с аутентичным штаммом *C. arenicola* UTEX 1697, штаммом *C. variabilis* UTEX 1600 и аутентичным штаммом *C. eremi* UTEX 1186 составили 0.9, 0.4 и 0.1% соответственно.

Сравнение более варибельного спейсера ITS2 исследуемого штамма VKM AI-132 (MG523292) с единственной последовательностью ITS2 для перечисленных трех видов *Chlorosarcinopsis* – *C. eremi* UTEX 1186 (HQ246438) показало их 100% сходство. Таким образом, штамм VKM AI-132 был идентифицирован как *C. eremi*.

Ростовые характеристики штамма в условиях двухстадийной культуры

При заданных внешних условиях на “зеленой” стадии в первые двое сут. биомасса *C. eremi* увеличилась в два раза (рис. 3). К концу “зеленой” стадии средняя продуктивность штамма VKM AI-132 составила 0.11 ± 0.00 г/л·сут. Сопоставимые результаты были получены нами

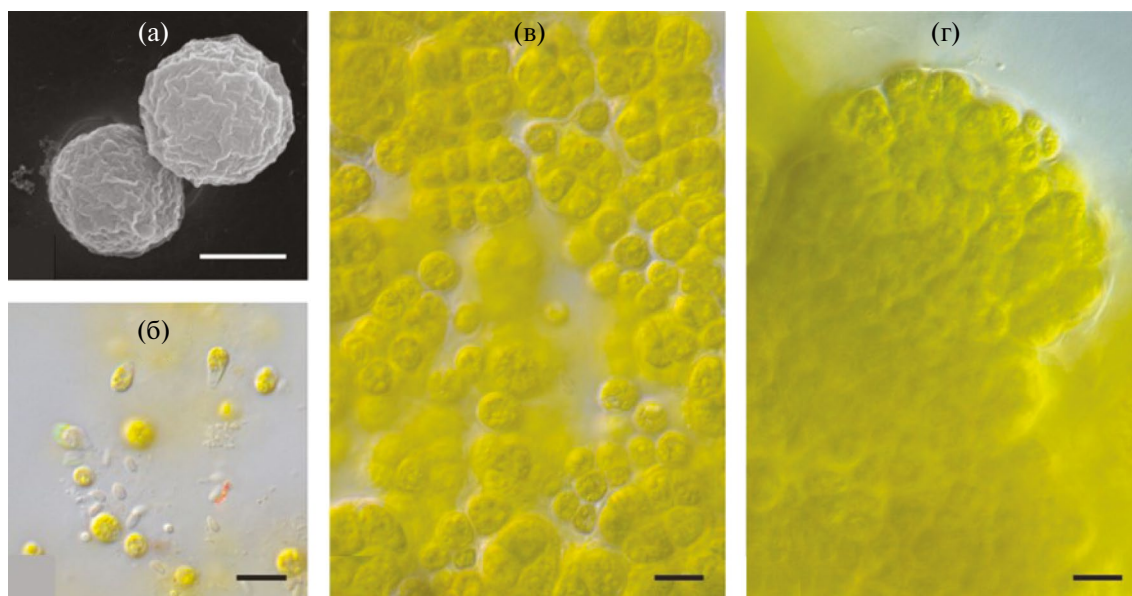


Рис. 1. Штамм *C. eremi* VKM AI-132. а – молодые вегетативные клетки (СЭМ). Световая микроскопия: б – “голые” зооспоры, в – сарциноидные пакеты, г – слизистые сложные комплексы клеток. Шкала: а – 2 мкм, б, в, г – 10 мкм.

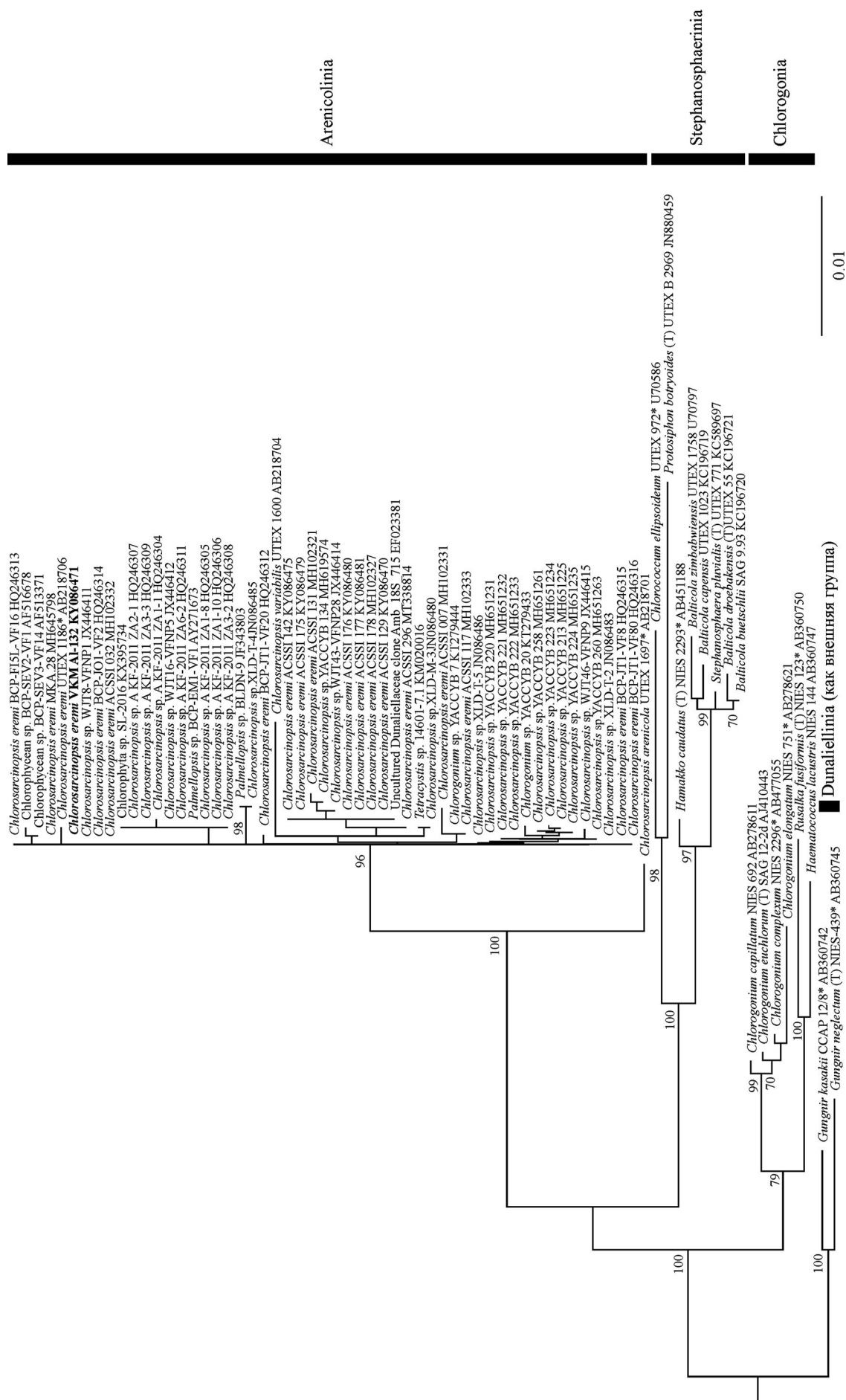


Рис. 2. Филогенетическое положение штамма VKM AI-132 на дереве гена *18S rRNA* (1737 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения (<70% не показаны). Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Обозначения: жирным шрифтом выделен изучаемый штамм, * – аутентичный штамм; (T) – типовой вид.

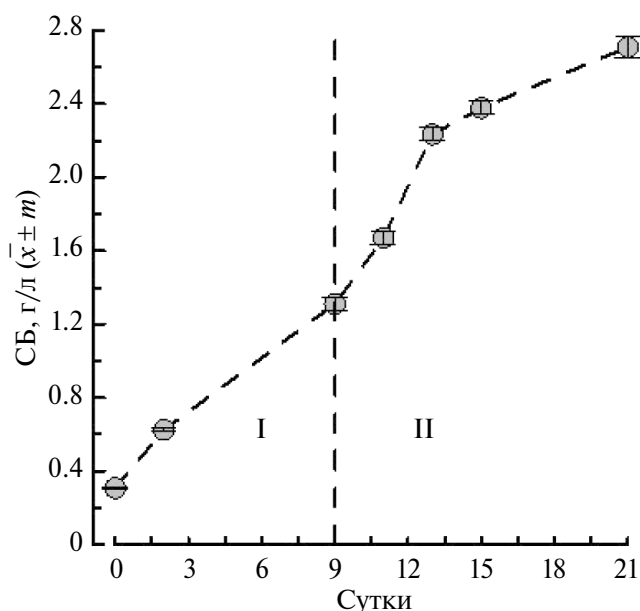


Рис. 3. Динамика биомассы (СБ) штамма *C. eremi* VKM AI-132, на “зеленой” (I) и “красной” (II) стадиях эксперимента ($\bar{X} \pm m$).

ранее для микроводорослей порядка Sphaero-pleales: *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens*, *Chromochloris zofingiensis*, и порядка Chlamydomonadales: *Pseudosporogococcum protococcoides* (0.08–0.09 г/л·сут.) [24].

После стресс-воздействия на “красной” стадии биомасса продолжала увеличиваться за счет активного накопления клетками запасных веществ (рис. 3), что является характерной особенностью каротиногенных микроводорослей [25, 26], и средняя за весь эксперимент продуктивность по СБ составила 0.12 ± 0.00 г/л·сут.

Пигментный состав клеток штамма на разных стадиях культивирования

На “зеленой” стадии содержание хлорофиллов в культуре *C. eremi* резко увеличивалось в первые двое сут. (рис. 4а, б). Далее уровень хлорофиллов возрастал вплоть до перевода культур на стадию ВКГ, тогда как в биомассе снижались в течение всего эксперимента (рис. 4г, д).

Визуально наблюдаемое изменение цвета культур от зеленого до болотно-желтого послужило оценочным критерием готовности культур

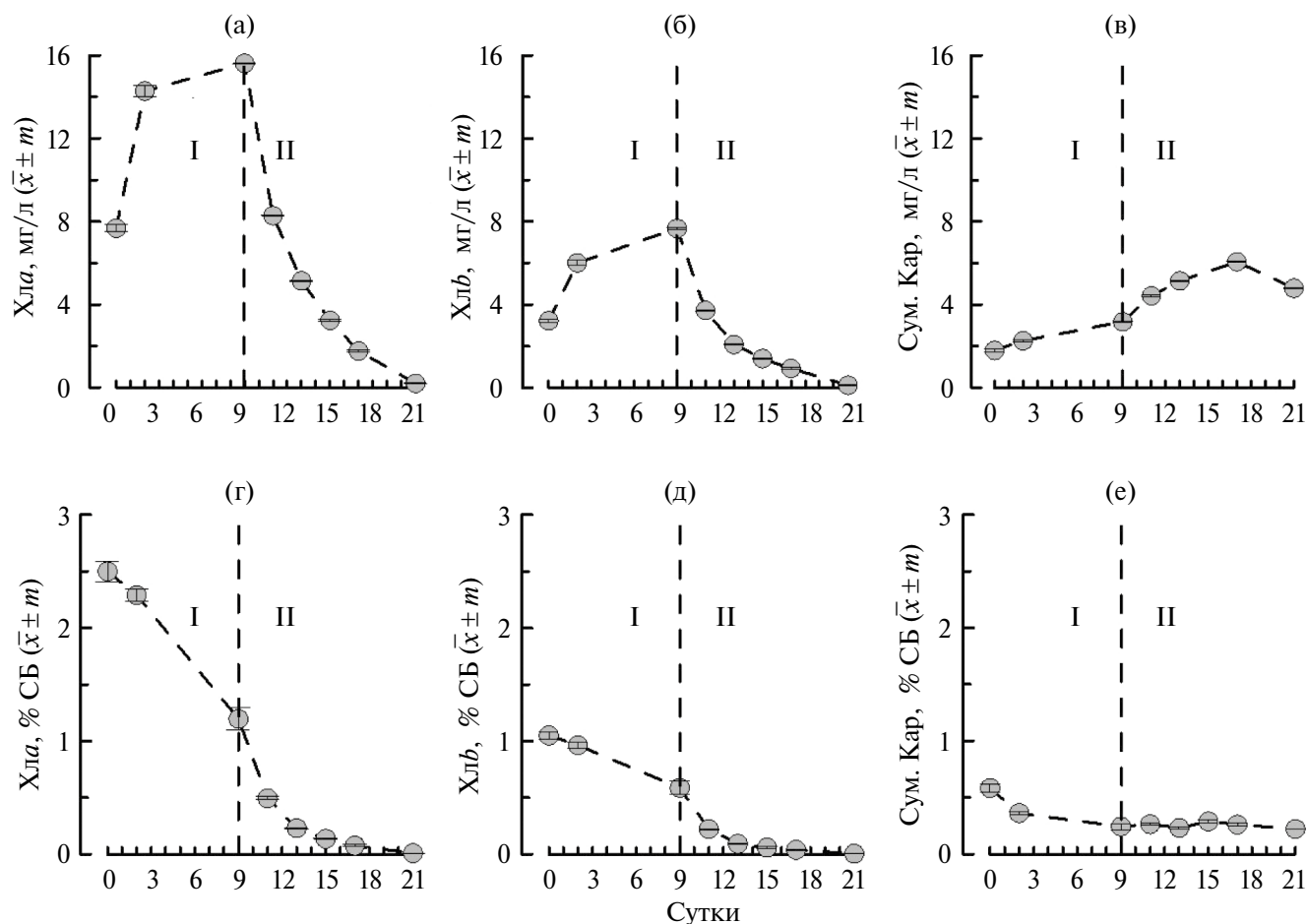


Рис. 4. Динамика пигментного состава в культуре и биомассе штамма *C. eremi* VKM AI-132, на “зеленой” (I) и “красной” (II) стадиях эксперимента: а, г – Хл а, б, д – Хл б, в, е – суммарные Кар ($\bar{X} \pm m$).

к переводу на стадию ВКГ. В течение “красной” стадии содержание Хл *a* и Хл *b* в культуре и биомассе снизилось почти до нуля. Содержание суммарных Кар в культуре на 8 сут. ВКГ увеличилось в 1.9 раза, тогда как их массовая доля в СБ изменялась незначительно на протяжении всей стадии ВКГ и составляла около 0.25% (рис. 4в, е). Это согласуется с опубликованными нами ранее данными для зеленых водорослей *P. protococcoides*, *B. minor*, *C. rubescens* и *C. zofingiensis*: массовая доля Кар в их биомассе составляла 0.23–0.39% [22], а также с работами других авторов: у *Botryococcus braunii* доля Кар в СБ варьирует в пределах

0.25–0.55% [8], у *Chromochloris zofingiensis* составляет 0.31% [27]. Тем не менее подчеркнем, что сравнение данных, приведенных различными авторами для каротиногенных Chlorophyta, часто затруднено из-за несходства условий стрессирования (природа стресс-агента, температурный и световой режимы).

К концу “красной” стадии культура приобрела темно-оранжевый цвет в результате деструкции фотосинтетических пигментов и накопления ККар (рис. 5, 6а). Продуктивность по суммарным Кар (за весь эксперимент) составила 0.19 ± 0.01 мг/л·сут., что сравнимо с этим по-

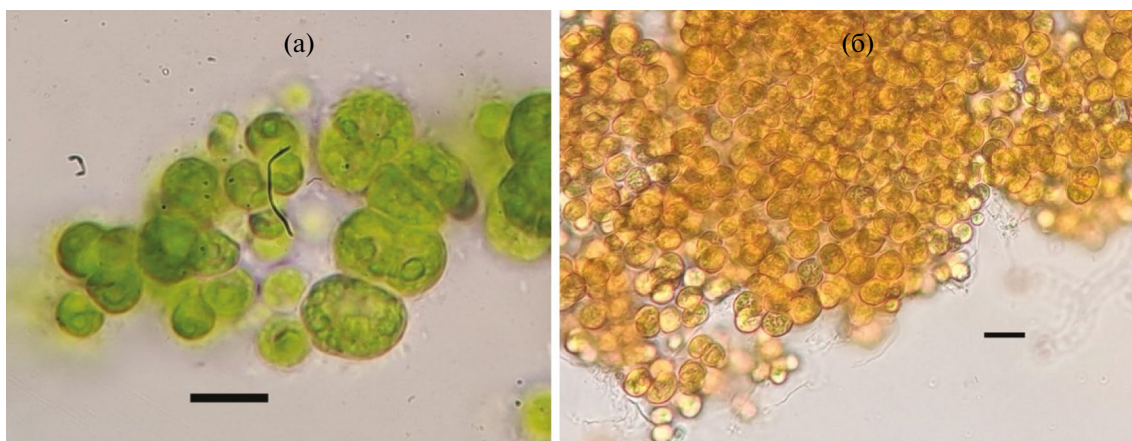


Рис. 5. Штамм VKM Al-132 на разных стадиях эксперимента: (а) – “зеленой”, (б) – “красной”. Шкала 15 мкм.

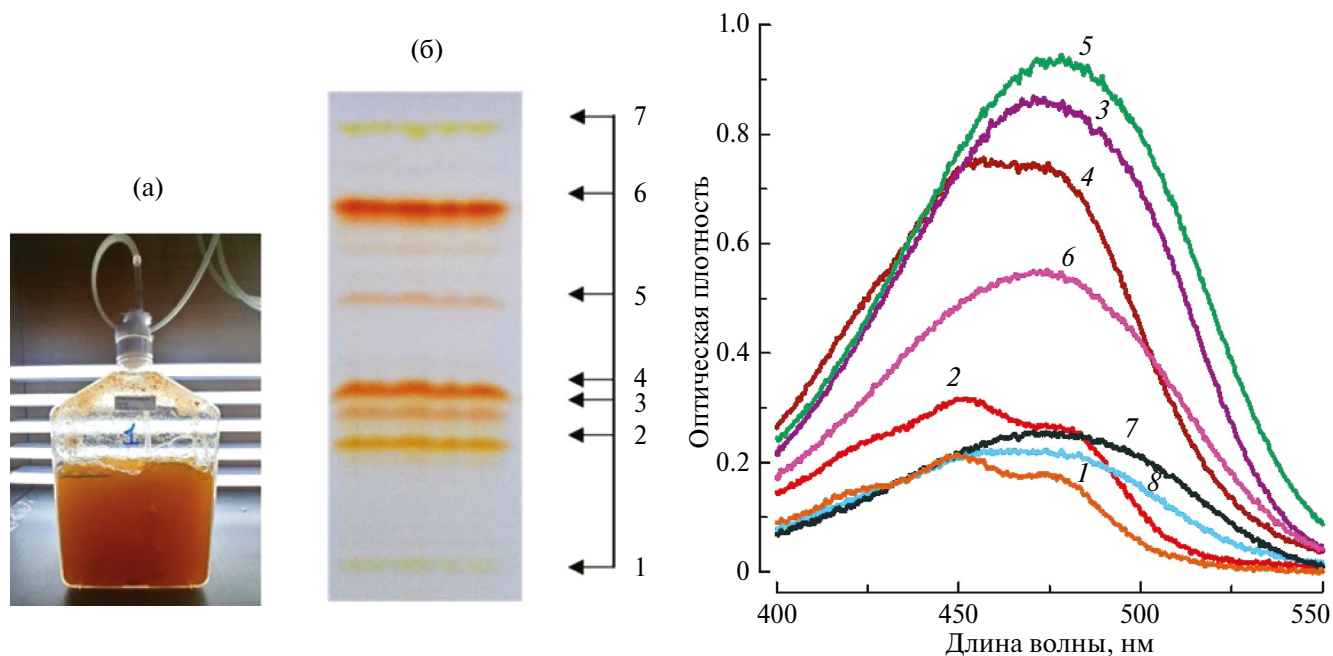


Рис. 6. Культура *C. eremi* VKM Al-132 (а) и хроматограмма каротиноидов (б) в конце “красной” стадии. 1 – лютеин, 2 – адониксантин (моноэфир), 3 – астаксантин (моноэфир), 4 – кантаксантин, 5 – адонирубин (эфир), 6 – астаксантин (диэфир), 7 – β-каротин.

Рис. 7. Спектры ацетоновых экстрактов каротиноидов штамма *C. eremi* VKM Al-132 в конце “красной” стадии эксперимента. 1 – лютеин, 2 – β-каротин, 3 – кантаксантин, 4 – адониксантин (моноэфир), 5 – астаксантин (диэфир), 6 – астаксантин (моноэфир), 7 – адонирубин (моноэфир), 8 – эхиненон.

Таблица 1. Состав каротиноидов штамма *C. eremi* VKM Al-132 в конце “красной” стадии эксперимента ($x \pm m$).

Фракции каротиноидов	Массовая доля фракции в суммарных Кар, %	Содержание фракции в культуре, мг/л
	Окончание “красной” стадии	
Астаксантин (диэфиры)	28.50 ± 3.08	1.70 ± 0.05
Кантаксантин	28.33 ± 2.28	1.69 ± 0.01
Адониксантин (моноэфиры)	15.75 ± 2.05	0.96 ± 0.20
Астаксантин (моноэфиры)	7.88 ± 1.37	0.47 ± 0.04
Адонирубин (моноэфиры)	4.88 ± 0.14	0.29 ± 0.02
Лютеин	2.55 ± 0.28	0.15 ± 0.01
Эхиненон	1.80 ± 0.13	0.11 ± 0.02
β -каротин	1.74 ± 0.11	0.11 ± 0.01

казателем у представителей порядка Sphaeropleales: *C. zofingiensis* и *Neochloris wimmeri* 0.21 и 0.22 мг/л·сут., соответственно [28].

Пигментный состав клеток определяли в конце “красной” стадий. По данным хроматографического анализа в красных культурах *C. eremi* доминировали диэфиры астаксантина и кантаксантин при значительной доле моноэфиров адониксантина (рис. 6б, 7, табл. 1). В совокупности ККар составляли $87.12 \pm 0.36\%$ от суммарных Кар (табл. 1), причем доля эфиров астаксантина в них превышала 36%.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным морфологического анализа изученный штамм был идентифицирован как член рода *Chlorosarcinopsis*. Однако отсутствие в культуре псевдонитчатых скоплений клеток не позволило установить его принадлежность к виду *C. eremi*. Использование консервативного маркера — гена 18S рРНК — выявило филогенетическое родство штамма VKM Al-132 с видами *C. eremi*, *C. arenicola* и *C. variabilis*. И только вариабельный маркер ITS2 однозначно определил штамм как *C. eremi*. Род требует ревизии, т.к. его представители принадлежат как минимум четырем различным филогенетическим группам, относящимся к трем кладам Arenicolinia, Stephanosphaerinia и Dunaliellinia [5, 15]. Однако это выходит за рамки данного исследования.

Продукционные характеристики исследованного штамма VKM Al-132 оказались сопоставимы с полученными нами ранее для других видов порядка Sphaeropleales: у *C. rubescens* и *C. zofingiensis* доля ККар в суммарных Кар достигала 42–68% и 92–95% соответственно. Доля эфиров астаксантина в суммарных Кар

достигала 19–28% у *C. rubescens* и 43–47% у *C. zofingiensis*, а кантаксантина — 8–19% и 25–31% соответственно [26, 29]. Отличительной чертой *C. eremi* оказалось значительное содержание лютеина (около 2.5% от суммарных Кар) в красных клетках, чего не наблюдали у ранее исследованных видов. Характерной оказалась относительно невысокая массовая доля всех форм астаксантина (немногим более 36%), а в каротиноидном спектре явно преобладали кантаксантин и диэфиры астаксантина. Сходство каротиноидного состава *C. eremi* с таковым у микроводорослей порядка Sphaeropleales (представители родов *Chromochloris*, *Bracteacoccus*, *Coelastrella*) и Chlamydomonadales (*Pseudospongiococcum*) может свидетельствовать о сходстве путей биосинтеза астаксантина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам микроскопирования и молекулярно-генетического анализа гена 18S рРНК была установлена таксономическая принадлежность штамма VKM Al-132 к роду *Chlorosarcinopsis* клады Arenicolinia (Chlamydomonadales, Chlorophyta). Использование более вариабельного маркера ITS2 позволило идентифицировать штамм как *C. eremi*. Его физиолого-биохимические показатели в условиях двухстадийной накопительной культуры хорошо сопоставимы с результатами, полученными ранее для каротиногенных зеленых микроводорослей порядка Sphaeropleales. В каротиноидном спектре *C. eremi* преобладали высокоценные ККар (кантаксантин и эфиры адониксантина и астаксантина). Исследуемый штамм может быть потенциально перспективным объектом дальнейших исследований, направленных на подбор оптимальных

условий культивирования на обеих стадиях (температурный и световой режим, обеспеченность культур питательными веществами, характер стресс-воздействия и пр.) для интенсификации процесса биосинтеза кетокаротиноидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-1051) и в рамках государственного задания “Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов” (№ 124022400152-1).

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. Groover R.D., Bold H.C. The taxonomy and comparative physiology of the Chlorosarcinales and certain other edaphic algae // Phycological studies VIII / Austin, Texas, USA. Univ. Texas Publications. 1969. № 6907. P. 1.
2. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales) / СПб.: Наука, 1998. 351 с.
3. Friedl T., O'Kelly C.J. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure // Eur. J. Phycol. 2002. V. 37. P. 373. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003712>
4. Friedl T. Evolution of the polyphyletic genus *Pleurasium* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure // Phycol. 1996. V. 35. P. 456. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-5-456.1>
5. Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 679. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00196.x>
6. Соловченко А.Е. Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 3. <https://doi.org/10.7868/S0015330313010089>
7. Jeffers T.L., Roth M.S. Revealing mechanisms of algal astaxanthin production and bioengineering potential using multiomics // Global Perspectives on Astaxanthin: From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications / Eds. G.A. Ravishanker, R.R. Ambati. 2021. P. 181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00010-6>
8. Chekanov K. Diversity and distribution of carotenogenic algae in Europe: A review // Mar. Drugs. 2023. V. 21. P. 108. <https://doi.org/10.3390/md21020108>
9. Cherdchukeattisak P., Fraser P.D., Purton S., Brocklehurst T.W. Detection and enhancement of ketocarotenoid accumulation in the newly isolated sarcinoid green microalga *Chlorosarcinopsis* PY02 // Biology. 2018. V. 7. P. 1. <http://dx.doi.org/10.3390/biology7010017>
10. Fučíková K., Lewis P.O., Neupane S., Karol K.G., Lewis L.A. Order, please! Uncertainty in the ordinal-level classification of Chlorophyceae // Peer J. 2019. V. 7 e6899. <https://doi.org/10.7717/peerj.6899>
11. Khani-Juyabad F., Mohammadi P., Zarrabi M. Comparative analysis of *Chlorosarcinopsis eremi* mitochondrial genome with some Chlamydomonadales algae // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2019. V. 25. P. 1301. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00696-y>
12. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmaceae, Chlorophyta) для первичной идентификации с использованием сканирующей электронной микроскопии // Вопросы современной альгологии. 2022. № 1. С. 102. [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-102-109](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-102-109)
13. Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakrys B., Szalach E., Szymanska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // J. Phycol. 2001. V. 37. P. 443.
14. White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols, a guide to methods and applications / Eds. M.A. Innis et al. Academic Press. San Diego. 1990. P. 315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
15. Nakada T., Misawa K., Nozaki H. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses // Mol. Phylogenet. Evol. 2008. V. 48. P. 281. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.016>
16. Nakada T., Soga T., Tomita M., Nozaki H. *Chlorogonium complexum* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), and morphological evolution of *Chlorogonium* // Eur. J. Phycol. 2010. V. 45. P. 97. <https://doi.org/10.1080/09670260903383263>
17. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н. Особенности вторичного каротиногенеза у *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) в условиях двухстадийной культуры // Альгология. 2015. Т. 25. С. 21. <http://dx.doi.org/10.15407/alg25.01.02>
18. Bischoff H.W., Bold H.C. Some soil algae from enchanted rock and related algal species // Phycol. Stud. 1963. V. 4. P. 1.

19. Минюк Г.С., Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцук Н.В., Челебиева Э.С. РФ Патент 2661086, 2018.
20. Vonshak A. Microalgae: Laboratory growth techniques and outdoor biomass production // Techniques in Bioproduktivity and Photosynthesis / Eds. J. Coombs et al. Pergamon Press. Oxford. 1985. P. 188.
21. Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in $\Delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light // J. Phycol. 2010. V. 46. P. 763.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x>
22. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // Meth. Enzym. 1987. V. 148. P. 350.
23. Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Чубчикова И.Н., Боровков А.Б. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зеленых микроводорослей методом тонкослойной хроматографии // Экология моря. 2009. Спец. вып. 79. Биотехнология водорослей. С. 50.
24. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В. Оценка антирадикальной активности вторичных каротиноидов у четырех видов зеленых микроводорослей порядка Sphaeropleales в системе in vitro // Труды Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН. 2020. Вып. 2. С. 66.
<https://doi.org/10.21072/eo.2021.14.07>
25. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Данцук Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг одноклеточных зеленых водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) // Морск. экол. журн. 2011. Т. 10. С. 91.
26. Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens*, a producer of value-added keto-carotenoids // Algae. 2017. V. 32. P. 245.
<https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6>
27. Ali H.E.A., Vorisek F., Dowd S.E., Kesner S., Song Y., Qian D., Crocker M. Formation of lutein, β -carotene and astaxanthin in a *Coelastrella* sp. isolate // Molecules. 2022. V. 27. P. 6950.
<https://doi.org/10.3390/molecules27206950>
28. Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae // J. Appl. Phycol. 2000. V. 12. P. 553.
29. Minyuk G., Sidorov R., Solovchenko A. Effect of nitrogen source on the growth, lipid, and valuable carotenoid production in the green microalga *Chromochloris zofingiensis* // J. Appl. Phycol. 2020. V. 32. P. 923.
<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02060-0>