

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК ТАДЖИКИСТАНА**

**Институт ботаники, физиологии и генетики растений**

**УДК:581.137.301(575.3)**

**ББК:28.57(2Т)**

**X-18**

*На правах рукописи*

**Хамроева Холида Мухамадиевна**

**ЭКЗОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ  
РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. В УСЛОВИЯХ СТРЕССА**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

**Научный руководитель:** Давлятназарова  
Зульфия Буриевна – доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник Института ботаники,  
физиологии и генетики растений НАНТ

**Научный консультант:** Джумаев Бахшулло  
Бокиевич – доктор биологических наук, член-  
корреспондент НАНТ, главный научный  
сотрудник Института ботаники, физиологии и  
генетики растений НАНТ

**ДУШАНБЕ – 2024**

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И (ИЛИ) УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТРЕССОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....</b>	<b>16</b>
1.1. Окислительный стресс и адаптация растений в условиях стресса.....	16
1.1.1. Компартиментация АФК в растительной клетке.....	21
1.2. Антиоксидантные системы детоксикации активных форм кислорода в условиях стрессорного воздействия .....	26
1.2.1. Ферменты антиоксидантной системы .....	27
1.2.2. Низкомолекулярные антиоксиданты .....	32
1.3. Экзогенная индукция антиоксидантной системы растений .....	40
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>45</b>
2.1. Объекты исследования .....	45
2.2. Методы исследования .....	48
<b>ГЛАВА III. НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА.....</b>	<b>62</b>
3.1. Морфо-физиологические показатели <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. в условиях солевого стресса .....	62
3.2. Содержание АФК и фотосинтетических пигментов у <i>Arabidopsis thaliana</i> в условиях солевого стресса . .....	72
3.3. Потенциальная интенсивность фотосинтеза и фотосинтетический метаболизм углерода у растений арабидопсиса в условиях стресса. ....	79
<b>ГЛАВА IV. ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АДАПТАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ РАСТЕНИЙ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYNH. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА.....</b>	<b>89</b>

4.1. Воздействие экзогенных антиоксидантов на содержание эндогенной аскорбиновой кислоты в растениях арабидопсиса при контрастных условиях среды.....	89
4.2. Активация процессов перекисного окисления липидов у растений арабидопсиса в условиях засоления .....	93
4.3. Активность антиоксидантных ферментов СОД и каталазы у различных генотипов <i>Arabidopsis thaliana</i> в условиях засоления .....	98
4.4. Влияние экзогенной аскорбиновой кислоты и $\alpha$ -токоферола на содержание свободного пролина у растений арабидопсиса .....	106
<b>ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>110</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ (ВЫВОДЫ).....</b>	<b>120</b>
<b>РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>122</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>123</b>
<b>Список публикаций соискателя учёной степени.....</b>	<b>144</b>

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И (ИЛИ) УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК – аскорбиновая кислота

АО – антиоксиданты

АОС – антиоксидантная система

АПО – аскорбатпероксидаза

АФК – активная форма кислорода

ГР – глутатионредуктаза

ГДФ – галактозофосфорилаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Е –  $\alpha$ -токоферол, витамин Е

ИВПЦ – интермедиаты восстановительного пентозофосфатного цикла

ИГП – интермедиаты гликолатного пути

КАТ – каталаза

МДА – малоновый диальдегид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид

НПН – нитропруссид натрия

П5К – пирролин- 5-карбоксилат

ПДГ – пролиндегидрогеназа

ПИФ – потенциальная интенсивность фотосинтеза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РБФ – рибулозобисфосфат

СОД – супероксиддисмутаза

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФГК – фосфоглицериновая кислота

ФС – фенольные соединения

ФС I/ ФС II – фотосистема I и II

ФМСФ - фенилметилсульфонилфторид

ФЭС – фосфорные эфиры сахаров

ФЭП – фосфоэнолпируват

ЭТЦ - электрон-транспортная цепь

*En* – дикий экотип арабидопсиса

*ass, cla, flavi*– мутантные линии арабидопсиса

GSH – глутатионредуктаза

GSNO–S – нитрозоглутатион

UV – ультрафиолетовые лучи

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В последние годы особое внимание уделяется изучению устойчивости и продуктивности различных культур в условиях воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды и роли антиоксидантов в повышении адаптационного потенциала.

В экстремальных условиях среды индуцируется активация многоуровневой биохимической системы антиоксидантной защиты, так как при воздействии стрессоров любой природы в первую очередь происходит оксидативный стресс, ведущий к разбалансировке гомеостаза. В результате оксидативного стресса наблюдается сверхпродукция активных форм кислорода (АФК) стимулирующих образование малонового диальдегида (МДА) и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Образование АФК происходит во всех компартментах растительной клетки различными путями: при функционировании электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) в структурах мембран, при автоокислении гемм - содержащих соединений, при окислительно-восстановительных реакциях фенолов и флавинов, и др. [111, 109, 48, 30].

В настоящее время имеются данные указывающие на то, что устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям определяется уровнем детоксикации АФК [41, 10, 30]. Более устойчивые генотипы растений имеют более высокую активность антиоксидантных систем, состоящих из антиоксидантных ферментов, таких как СОД, каталаза, глутатионредуктаза, пероксидаза и др., а также низкомолекулярных соединений например пролина или  $\alpha$ -токоферола, которые участвуют в элиминировании свободных радикалов кислорода [50, 30].

Главным свойством, определяющим механизм адаптации растений при стрессе является способность к индукции активности антиоксидантных систем. Это может происходить за счет увеличения активности как отдельных, так и нескольких компонентов системы защиты [10, 161, 112, 30].

В детоксикации АФК участвуют не ферментативные антиоксиданты.

Особая роль в этой группе принадлежит аскорбиновой кислоте (АК) и  $\alpha$ -токоферолу (витамин Е) [196, 31].

Аскорбиновая кислота содержится во всех компартментах клеток растений, но наибольшее её количество локализовано в хлоропластах и цитозоле [47]. Оксидоредуктазы, локализованные во всех органелах клетки участвуют в окислении АК, что приводит к изменению редокс-статуса растений. Антиоксидантные свойства АК связаны с детоксикацией  $H_2O_2$  и других АФК. Помимо этого, АК может выполнять роль кофактора, участвующего в регенерации токоферола – одного из основных протекторов клеточных мембран от окислительного стресса и способствующего сохранению ионного гомеостаза клеток [170].

Роль токоферолов состоит во взаимодействии с перекисными радикалами липидов и торможении процессов перекисного окисления (ПОЛ). В условиях стрессорного воздействия в хлоропластах растений арабидопсиса окисленная форма токоферола – токоферолхинон подвергается восстановлению до  $\alpha$ -токоферола, что способствует поддержанию его пула в клетках [121].

Таким образом, одной из основных функций токоферолов и аскорбиновой кислоты является детоксикация и обезвреживание АФК и других побочных радикальных продуктов окислительного стресса.

Изучение проявления защитных функций антиоксидантной системы в условиях стресса и ее влияние на физиолого-биохимические показатели  $C_3$ -растений представляет особый интерес и имеет теоретическое и практическое значение, однако проблемы, функционирования механизмов устойчивости различных растений под действием факторов среды до конца не изучены.

Успешное функционирование антиоксидантной системы и устойчивость растений к воздействиям факторов окружающей среды подразумевает и поиск методов экзогенной регуляции, т.е. предотвращения окислительного стресса с использованием экзогенных антиоксидантов и их синтетических производных, обладающих протекторными свойствами с целью подавления генерации АФК или уменьшения окислительных повреждений в результате негативного действия

стрессоров. В связи с этим, целью исследования являлось изучение роли экзогенных антиоксидантов в повышении устойчивости растений при воздействии стресса, в частности в условиях повышенных концентраций соли, что имеет как теоретическую, так и практическую значимость.

**Степень изученности научной темы.** Изучение проблем устойчивости и адаптивности различных растений к изменяющимся условиям окружающей среды является актуальным в связи с ухудшением экологической ситуации и возникновением нехватки продовольствия во всем мире. Многие научные центры в различных странах заняты решением этих проблем на физиологическом, биохимическом, генетическом и молекулярном уровнях. В Таджикистане также ведутся исследования в этом направлении, в частности, в работах Алиева К. с сотрудниками, Якубовой М.М. с сотрудниками, Абдуллаева А.А. с сотрудниками и др. показано, что устойчивость растений к различным абиотическим стрессам сопряжена с работой антиоксидантных систем и адаптационный потенциал того или иного генотипа растения зависит от эндогенной регуляции устойчивости и продуктивности.

**Связь работы с научными программами (проектами) и темами.** Диссертационная работа выполнена в рамках научно-исследовательских тем лаборатории биохимии фотосинтеза Института ботаники, физиологии и генетики растений Национальной Академии наук Таджикистана «Изучение действия стрессовых факторов, индуцируемых изменением климата в Таджикистане, на физиолого-биохимические процессы у пшеницы» (№ ГР 0102 ТД 913).

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Цель исследования:** Изучение влияния экзогенных антиоксидантов на физиолого-биохимические показатели и адаптационную способность различных генотипов *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuhb. в условиях солевого стресса.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить некоторые морфо - физиологические показатели растений арабидопсиса в условиях солевого стресса;

2. Изучить влияние экзогенных антиоксидантов на содержание АФК и фотосинтетических пигментов арабидопсиса в условиях NaCl;
3. Изучить влияние экзогенных антиоксидантов на потенциальную интенсивность фотосинтеза и фотосинтетический метаболизм углерода *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в условиях хлоридного засоления;
4. Оценить влияние экзогенных антиоксидантов на содержание эндогенной аскорбиновой кислоты в растениях арабидопсиса в условиях NaCl;
5. Изучить воздействия экзогенных антиоксидантов на процессы перекисного окисления липидов при солевом стрессе;
6. Изучить компоненты антиоксидантной системы защиты растений (СОД, каталаза, пролин) арабидопсиса при стрессорном воздействии NaCl.

**Объектом исследования** было изучение регуляции механизмов устойчивости растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh., относящихся к высшим растениям из семейства крестоцветных, которое обладает относительно коротким жизненным циклом, большой семенной продуктивностью и малым числом хромосом, что позволяет успешно использовать это растение как модельный объект в молекулярно-генетических и физиолого-биохимических исследованиях. Были изучены генотипы арабидопсиса, отличающиеся по морфологическим показателям: дикая форма расы *Enkheim* и ряд мутантов: 58/15 *flavi-1* (*flavoviridis*) – пигментные мутации (жёлтый окрас), мутантные гены локализованы в 5-ой хромосоме; 90 *cla* (*clavatus*) – морфологические мутации (видоизмененный стручок) мутантные гены локализованы в 5-ой хромосоме; 931/1 (*ass 1*) (*asymmetrica*) – морфологические мутации (ассимметричные листья), мутантные гены локализованы 3-ей хромосоме.

**Предмет исследования.** Воздействие экзогенных антиоксидантов на физиолого-биохимические показатели и адаптационные способности модельного объекта *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в условиях хлоридного засоления.

**Научная новизна исследования.** Впервые изучено влияние экзогенных антиоксидантов аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола на регуляцию адаптационной способности растений арабидопсиса. Показано, что устойчивость

генотипически детерминирована и не всегда стимуляция экзогенными антиоксидантами приводит к повышению адаптационного потенциала.

Установлено, что у дикой формы высокая активность СОД наблюдалась у растений, выращенных в условиях хлоридного засоления (0.1 М NaCl), а минимальная – у растений в условиях хлоридного засоления (0.05 М NaCl) при добавлении антиоксиданта Е. Однако, у мутанта *flavi* максимальная активность СОД установлена у растений, выращенных в условиях водной среды при воздействии аскорбиновой кислоты. У мутанта *ass* максимальное значение активности СОД наблюдается у растений в условиях хлоридного засоления при добавлении комплекса АК+Е.

Установлено, что по пределам изменения активности каталазы самым устойчивым оказалась дикая форма *En* и мутант *ass* как в условиях водной среды, так и в условиях хлоридного засоления без и с добавлением экзогенных антиоксидантов.

Показано, что добавление экзогенных антиоксидантов в водную среду выращивания по отдельности и в комплексе приводит к различной степени ингибирования процессов перекисного окисления липидов. У дикой формы *En* и мутантов *ass*, *cla* и *flavi* наблюдается неодинаковый уровень образования малонового диальдегида (МДА) в присутствии NaCl, показано, что аскорбиновая кислота действует как прооксидант, облегчая реакции окисления, а  $\alpha$ -токоферол резко ингибирует ПОЛ, т.е. проявляет антиоксидантные свойства.

Содержание хлорофиллов *a* и *b* у дикой и мутантных форм арабидопсиса при воздействии NaCl несколько уменьшается, также как содержание каротиноидов. Однако, у мутанта *ass* содержание хлорофиллов и каротиноидов повышается, в то время как соотношение *a* / *b* падает.

Установлено, что у дикой формы и мутанта *cla* ПИФ в условиях хлоридного засоления преобладает над растениями контрольного варианта, а у мутантов *ass* и *flavi* обнаружена обратная картина, т.е. ПИФ у этих форм арабидопсиса в контрольном варианте преобладает над растениями опытного варианта, что

указывает на то, что имеет место различие ответной реакции на стресс, которая зависит от генотипа растения.

В ходе исследования был выявлен разнонаправленный характер распределения продуктов фотосинтеза у дикой формы и мутантных линий арабидопсиса. Показано, что у дикой формы *En* количество меченого углерода в условиях хлоридного засоления в составе сахаров, интермедиатов гликолатного пути (ИГП) и ФЭП-продукты преобладают по сравнению с растениями в условиях водной среды.

Изучение фотосинтетического метаболизма углерода у мутантной линии арабидопсиса *ass*, обработанной антиоксидантами, а именно АК и Е, как в отдельности, так и в комплексе показало, что в условиях хлоридного засоления при обработке растений антиоксидантом Е скорость включения  $^{14}\text{C}$  в ИВПЦ по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды и обработанными этим же антиоксидантом повышается, но обнаруживаются количественные изменения.

Показано, что содержание пролина у растений опытного варианта, обработанных экзогенными антиоксидантами АК и Е по отдельности, и в комплексе АК + Е существенно преобладает над растениями контрольного варианта. А у мутанта *ass*, обработанного комплексом АК + Е, наблюдается обратная картина, т.е. содержание пролина существенно преобладает над растениями опытного варианта.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Полученные результаты физиолого-биохимических исследований влияния экзогенных антиоксидантов на антиоксидантную систему растений имеют важное теоретическое и практическое значение для понимания ответных реакций растений на стресс и формирования механизмов устойчивости, а также роли экзогенных антиоксидантов в повышение адаптационной способности различных культур в условиях изменения климата.

Практическая значимость работы заключается в том, что исследованы физиолого- биохимические показатели у дикой формы и разных мутантов

арабидопсиса в условиях хлоридного засоления при воздействии экзогенных антиоксидантов, в частности аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола, которые могут быть использованы при оценке и создании сценариев адаптационных перестроек в растительных клетках в условиях засоления почв и других стрессорных факторов среды. Полученные данные могут быть рекомендованы и при подборе мер смягчения действия неблагоприятных условий среды, инициирующих образование активных форм кислорода (АФК).

Выявленные в ходе исследования закономерности можно использовать в учебном процессе при чтении лекций и спецкурсов по экофизиологии и биохимии растений в ВУЗах биологического и сельскохозяйственного профиля.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Влияние экзогенных антиоксидантов аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола на генотипы *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh имеет разнонаправленный характер и не всегда коррелирует с повышением адаптационной способности растений в условиях солевого стресса;
2. Устойчивость растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh генотипически детерминирована и стимуляция экзогенными антиоксидантами не всегда приводит к повышению степени устойчивости;
3. Данные по специфической реакции различных генотипов арабидопсиса к изменяющимся условиям среды являются теоретической основой для оценки адаптационного потенциала и продуктивности растений в условиях воздействия стрессового фактора.

**Достоверность полученных результатов**, которые получены на базе классических и современных физиологических и биохимических методов исследования с использованием сертифицированного оборудования подтверждена достаточной повторностью и воспроизводимостью, а также корректной статистической обработкой.

**Соответствие паспорту специальности по ВАК РФ.** Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия

растений, утвержденного ВАК при Президенте Республики Таджикистан по следующим пунктам:

11. Физиолого-биохимические основы устойчивости растений к стрессовым условиям внешней среды. Физиология и биохимия адаптации растений к стрессу;
17. Активные формы кислорода в растениях, их структура, синтез и функции. Антиоксидантная система растений;
5. Фотосинтез. Пигменты, исследование состава и функциональной роли. Физиолого-биохимические основы фотосинтеза.

**Личный вклад соискателя.** Личный вклад соискателя заключался в поиске и анализе литературных источников, подборе объектов исследования (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), в постановке и проведении лабораторных и полевых экспериментов, в статистической обработке, интерпретации и апробации полученных результатов. Обобщение результатов диссертационной работы и написание статей выполнены автором совместно с научным руководителем. Доля авторского участия более 90%.

**Апробация результатов диссертации.** Основные положения диссертации были представлены или доложены на республиканских и международных научных конференциях: Международная конференция и школа молодых ученых «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде», Иркутск, РФ, 2016 и 2018 гг.; XIII научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием, посвященная «Году развития туризма и народных ремесел», Душанбе, 2018 и 2019 гг.; Республиканской научной конференции «Адаптация живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды», Душанбе, 2019 и 2021 гг.; Международной научно-практической конференции (67-ой годичной) посвящённой 80-летию ТГМУ им. Абуали ибни Сино и «Годам развития села, туризма и народных ремесел», Душанбе, 2019г.; Республиканской конференции «Достижения современной биохимии в Таджикистане», Душанбе, 2020 г.; Международной научно-практической конференции (68-69 годичной) «Фундаментальные основы инновационного развития науки и образования»,

посвященной «Годам развития села, туризма и народных ремёсел» и 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан, Душанбе, 2020 и 2021 гг.; Международной научной конференции «Изучение, развитие, сохранение, перспективы эффективного использования биоразнообразия генофонда хлопчатника и других культур».

**Методы исследования.** В процессе исследования использовались классические и современные методы, используемые в физиологии и биохимии растений, с использованием современного оборудования и реактивов, а также методы математического и статистического анализа полученных экспериментальных результатов.

**Методология и методы исследований.** Научная методология работы основывается на физиолого-биохимическом подходе в изучении проблем регуляции процессов адаптации растений в условиях стресса. В работе использованы эмпирические и общенаучные методологии основанные на использовании методов физиологии и биохимии растений.

**Этапы исследования.** Исследования проводились в течение 2016-2022 гг. и состояли из 3-х основных этапов.

На первом этапе (2016 – 2017 гг.) проведен анализ научной литературы по теме диссертации, обоснована актуальность темы исследования, а также определена цель исследования и поставлены задачи для достижения цели.

На втором этапе (2017 – 2022 гг.) разработан план экспериментальных работ, определены методы и методология проведения исследования, проведены эксперименты, осуществлена обработка, анализ и обсуждение полученных научных результатов, написаны и опубликованы ряд тезисов и статей по теме исследования, в том числе в журналах рекомендованных ВАК при Президенте Республики Таджикистан.

На третьем этапе (2022 – 2024 гг.) проведено обобщение и обсуждение полученных результатов, сформулированы выводы и подготовлена диссертация.

**Опубликование результатов диссертации.** По теме диссертации опубликовано - 23 работы в материалах республиканских и международных

научных конференций и семинаров, в том числе - 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК при Президенте Республики Таджикистан.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 147 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, выводов, списка цитируемой литературы, включающей в себя 203 источника, из которых 136 на иностранном языке, приложения, содержит 11 таблиц и 23 рисунка.

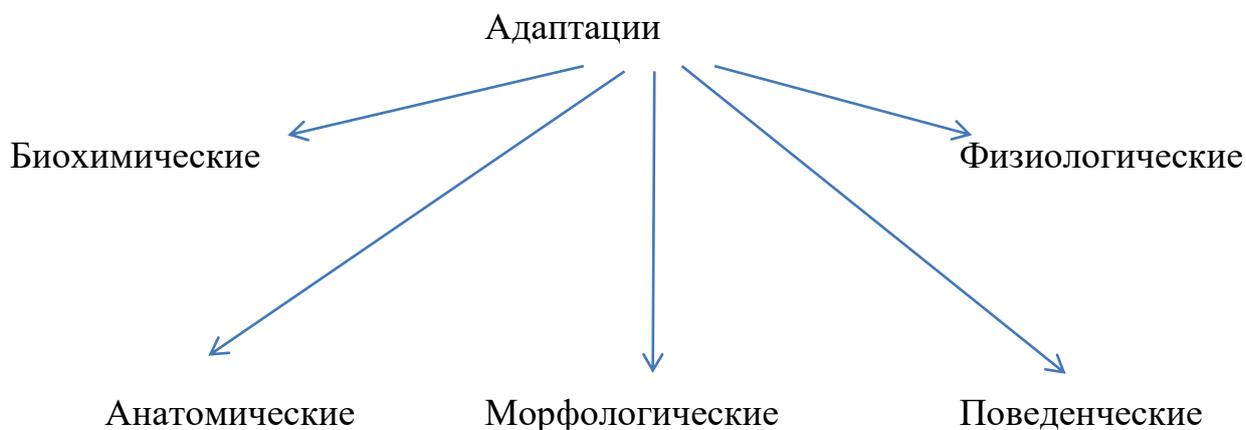
# Глава 1. АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТРЕССОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Окислительный стресс и адаптация растений

Проблема адаптации живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды является первостепенным условием для полноценного существования человечества. К изменяющимся условиям среды относятся благоприятные и негативные факторы, то есть стрессовые факторы. Существует большое количество факторов, которые являются стрессовыми, например загрязнение атмосферы, засоление почв, засуха, климатические факторы и т.д. Под воздействием этих факторов живые организмы, в том числе растения вынуждены приспосабливаться или адаптироваться для того чтобы выжить. Исходя из вышесказанного можно дать следующее определение адаптации – это проявление различных эндогенных и экзогенных признаков, с целью выживания и размножения.

В настоящее время накоплен обширный материал, демонстрирующий различные способы адаптации, например по В.В. Кузнецову «адаптация– это генетически детерминированный процесс формирования защитных систем, обеспечивающих повышение устойчивости и протекание онтогенеза в ранее неблагоприятных для него условиях». А по И.Ю. Усманову «адаптация – это определение совокупности морфологических, физиологических и биохимических первичных приспособительных реакций, обеспечивающих возможность видо-специфического выживания растений при действии вертикальных и горизонтальных биотических связей, а также неблагоприятных для данного вида условий среды». То есть можно определить адаптацию, как один из механизмов позволяющих выживать и давать потомство в условиях неблагоприятного воздействия окружающей среды. Другими словам, чем выше уровень адаптации, тем более устойчив к стрессовым воздействиям живой организм. В более широком понимании адаптация – это изменения на уровне анатомии,

морфологии, физиологии, поведении, способствующих повышению сопротивляемости и стабильности (гомеостазу), которое в свою очередь определяет выживание и прогресс того или иного вида.



Следует отметить, что растения обладают многофакторной стратегией выживания и, следовательно устойчивости, и ключевым фактором является время, то есть продолжительность ответной, приспособительной реакции. Чем больше времени есть у растения, тем больше возможности для выживания. Как правило, системы выживания, которые длительно формировались в ходе эволюции наиболее надёжны и могут функционировать на период стрессорного воздействия и в нормальных условиях в процессе всего онтогенеза.

Возникновение приспособлений и экзогенные защитные механизмы в целом генетически детерминированы и взаимосвязаны с внешней средой. Процессы образования систем защиты довольно скоротечны и коррелируют с изменениями трансляционной системы и экспрессии генов [35; 39].

Растения по-разному реагируют на воздействия стресса, но в целом механизм адаптации можно разделить на организменный и клеточный. То есть изменения в растениях происходят на уровне либо клетки, либо растения в целом. Как было сказано ранее, адаптация происходит различных уровнях, т.е. на уровне физиологических и биохимических путей. Физиологическая адаптация подразумевает морфологические изменения корней или листьев, закрытие устьиц, транспирацию и т.д. Биохимическая адаптация – это изменения, связанные с метаболическими путями или трансляционной системой, которая

инициирует синтез новых белков, ферментов и низкомолекулярных соединений [14,37,62, 2, 11].

Стрессорные факторы, воздействуя на растения, провоцируют ингибирование всех жизненно важных систем, подавляют метаболизм и приводят к деструкции физиологических и биохимических процессов, т.е. нарушают гомеостаз в растениях [1, 40,57, 64, 34, 11].

Адаптационные перестройки в растениях в первую очередь направлены на энергообеспечение организма, а также обеспечение метаболитами различного происхождения, прекурсорами белков и нуклеиновых кислот. Такого рода перестройки способствуют поддержанию гомеостаза и регуляции всех систем жизнеобеспечения под воздействием стрессорного фактора [33, 34, 43].

Большинство учёных в своих исследованиях по окислительному стрессу растительных или животных организмов делают акцент на процессы возникновения окислительного стресса и ответной реакции антиокислительной системы защиты при стрессе, так как необходимо учитывать равновесие окислителей (прооксидантов) и антиокислителей (антиоксидантов), другими словами баланс про- и антиоксидантной системы в различных условиях [88, 50]. Нарушение компартментов внутриклетки, которое провоцируется различного рода стрессами является пусковым механизмом образования АФК и дальнейшего окислительного стресса в клетке [148,114, 80,68,101, 152, 50].

Что означает абиотический стресс для живых организмов, в частности для растений?

Например в течении вегетации растения подвергаются различным изменениям, то есть от момента прорастания семени и вплоть до формирования плодов растения тесным образом взаимосвязаны с изменениями освещения, температуры, концентрации  $CO_2$  и  $O_2$ , влажности, солнечной инсоляции в течение суток [50]. Все факторы живой (биотический) и неживой (абиотический) природы оказывают определённое влияние на растения. Негативное воздействие таких факторов может стимулировать стресс и тогда эти факторы переходят в разряд стрессовых факторов среды. Существует мнение, что стрессовые факторы имеют

различные периоды воздействия, т. е. различные стадии: от действия раздражителя и получения сигнала - 1 стадия; узнавание или идентификации сигнала - 2 стадия и ответной реакции - 3 стадия [151, 50].

«Действие стрессорного воздействия идентичной мощности на растения, даже в пределах одного биоценоза, может различаться и вызывать или нет защитную реакцию. Например, многолетние растения выдерживают кратковременный стресс без формирования механизмов защитной системы, однолетние же более уязвимы и индукция ответной реакции может быть более выраженной. Хотя имеются некоторые однолетние виды растений, в которых эволюционно сформирована устойчивость к определенным стрессорам. Так, галофиты могут произрастать на засоленных почвах и нормально развиваться. Известно, что галофиты выдерживают высокую концентрацию солей без видимой индукции механизмов защиты. Следует также учитывать, что адаптационный потенциал растения может быть ограничен жизнеспособностью органа, который более подвержен действию стресса, например, корни подвергаются большему повреждению пагубного засоления, нежели стебли и листья» [50].

Растения, так же как и животные способны противостоять стрессорным факторам среды, однако следует отметить такое противостояние не ограничивается одним действием, это система ответных реакций, которая может быть разделена на 1 - стресс реакцию, то есть ответ, запускающий не специфические механизмы и 2 - более продолжительную адаптацию, включающую специфические (специализированные) механизмы ответа на стресс [35]. Такой подход способствует более точному пониманию формирования АФК в условиях стресса и выявлению общих путей механизмов устойчивости » [50].

Если рассматривать механизм воздействия стресса, то необходимо учитывать тот факт, что стрессоры влияют опосредовано, то есть абиотические и биотические факторы вызывают окислительный стресс, который в дальнейшем вызывает пагубные последствия в растениях.

В настоящее время физиологи, биохимики и молекулярные биологи всесторонне изучают окислительный стресс, так как окислительный стресс является одной из фундаментальных проблем в биологии растений и животных.

Окислительный стресс является последствием любого стресса и имеет более негативные последствия, так как в «результате сверхпродукции и накопления активных форм кислорода (АФК) происходят изменение и разобщение работы «всей биохимической «машины». Сейчас уже имеются неопровержимые данные о том, что белки, углеводы, липиды, а также нуклеиновые кислоты являются главными «мишенями» в клетке», которые подвергаются воздействию АФК [41,36, 23, 45,81, 160, 74, 99, 43,11]».

Пути образования АФК в различных условиях, в том числе и в норме разнообразны. Например: при «фотодыхании и фотосинтезе [100, 106,110,50], окислении митохондриальных компонентов, цитоплазматических белков, окислительно-восстановительных реакциях, а также других соединений, которые ведут к нарушению клеточного гомеостаза [136,50]». «Существует ферментативный путь образования АФК, например при функционировании различного рода оксидаз – пероксидаз, ксантиноксидаз, НАДФН-оксидаз, липоксигеназ» и др. [80, 153, 106, 50].

Известно, что факторы среды, такие как засоление, засуха и высокие температуры воздуха и почвы тоже провоцируют сверхпродукцию АФК.

АФК – это радикалы, содержащие неспаренный электрон, обладающие высокой реакционной способностью дестабилизации структур клетки, причём являются радикалами, участвующими в различных процессах без участия катализаторов. То есть, это соединения способные инициировать активацию сигнальных каскадов [100,125,50]. Так в процессе отнятия «неспаренного электрона от молекулярного кислорода формируется супероксид катион радикала  $O_2^+$ , а при присоединении электрона к супероксид аниону образуется  $O_2^-$ . Если происходит присоединение двух электронов, то образуется пероксидный ион кислорода, который может подвергнуться протонированию ионами водорода с формированием пероксида водорода  $H_2O_2$ . Если наличие двухвалентного железа

и одновалентной меди в клетке достаточно, то пероксид водорода подвергается распаду с формированием радикала гидроксида»  $\text{OH}^\bullet$  [50].

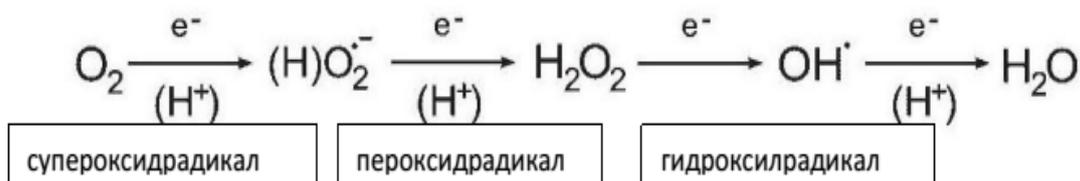
Таким образом, можно констатировать, что супероксид-радикалы являются предшественники высокореакционных компонентов клетки.

На рисунке 1 представлена схема формирования АФК:

«1 – супероксидрадикал (одноэлектронное восстановление)»,

«2 - пероксид водорода (двухэлектронное восстановление)»,

«3 - гидроксилрадикал (трехэлектронное восстановление)» [126, 106, 50].



**Рисунок 1.- Формирование активных форм кислорода [106]**

Известно, что некоторый уровень АФК может участвовать в передаче стрессорного сигнала, что способствует формированию ответной реакции, а также индуцирует процессы старения и апоптоза [84,125,110]. Известно, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  и абсцизовая кислота участвуют в активации кальциевых каналов и регуляции открывания и закрывания устьиц листьев растений[126, 50].

Для предотвращения негативных последствий окисления в различных компартментах клетки функционируют антиокислительные или антиоксидантные системы, способные синтезировать различного рода компоненты защиты от повреждений и преждевременной гибели.

### **1.1.1. Компартментация АФК в растительной клетке**

Необходимо отметить, что образование АФК может протекать в различных компартментах клетки. Например, в хлоропластах или пероксисомах, митохондриях и плазмолемме. Рассмотрим более подробно компартментацию АФК в клетках.

В растительной клетке ведущее положение в образовании АФК принадлежит хлоропластам. «Согласно реакции Мёлера при восстановлении кислорода ферредоксином, а также при нарушении электрон-транспортной цепи за счет дополнительной энергии и передачи электронов с Fe-S центра фотосистемы I может способствовать образованию супероксидрадикала. В фотосистеме II образуется синглетный кислород за счёт переноса электронов с возбужденного хлорофилла на кислород. В возбужденном состоянии молекула хлорофилладонирует электрон на кислород и образуется синглетный кислород, а хлорофилл переходит в невозбужденное состояние» (рис. 2) [50].

Под воздействием различных факторов внешней среды имеет место ограничение фиксации CO<sub>2</sub>, что в свою очередь ведёт к накоплению НАДФН и «утечке» от ферредоксина электронов на O<sub>2</sub>, при которой образуется супероксид анион-радикал и в дальнейшем под действием СОД образуется пероксид водорода [24, 26, 50].

Таким образом, фотосистема II является основным источником синглетного кислорода. Хлоропласты являются генератором АФК и обладают мощной антиоксидативной системой.

Кроме ферментативных антиоксидантов (АО) в хлоропластах присутствуют и низкомолекулярные антиоксиданты, такие как пероксидазы, а также гидрофобные АО: каротиноиды и токоферолы.

### **Митохондрии**

Митохондрии содержат достаточно большой уровень переносчиков электронов в электрон-транспортной или дыхательной цепи. Известно, что источником супероксидрадикала и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может быть и электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) (рис. 2).

Многими авторами показано, что формирование АФК в митохондриях происходит за счет комплекса III, а также НАДН-дегидрогеназы и убихинона [106, 50].

Метаболические пути, протекающие в митохондриях вносят значительный вклад в регуляцию формирования АФК в клетках и процент формирования АФК в них менее выражен, чем в хлоропластах [50].

В митохондриях детоксикация супероксид анион-радикала осуществляется при помощи двух форм СОД: Cu/Zn-СОД и Mn-СОД. А также следует отметить, что в митохондриях присутствуют почти все формы пероксидаз и каталаза. Присутствие вышеперечисленных компонентов создаёт условия успешного функционирования всей антиоксидантной системы.

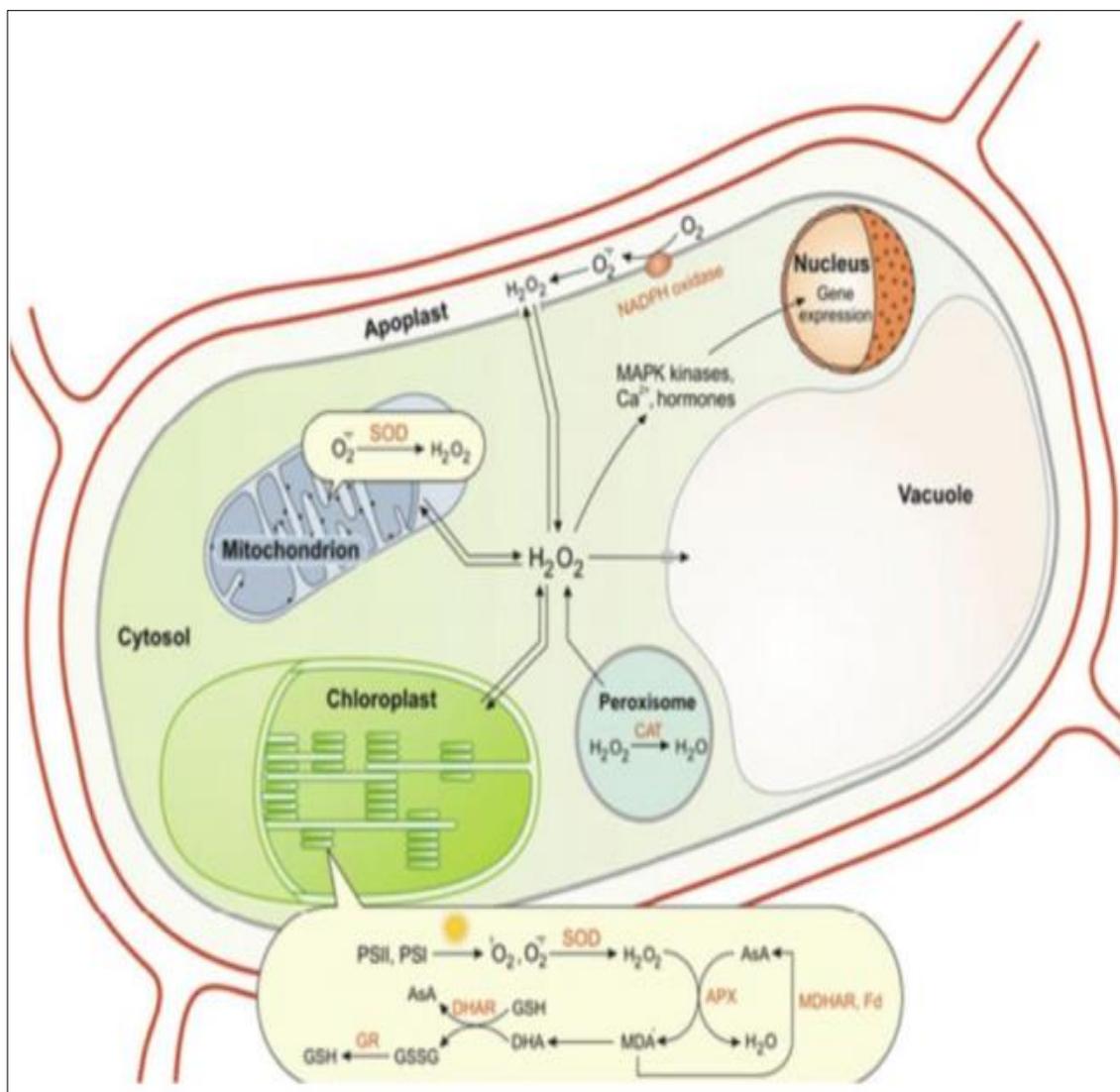


Рисунок 2. –Метаболические пути образованияАФК в растельной клетке[106].

## **Пероксисомы (глиоксисомы)**

Пероксисомы характерны для всех эукариот. По своему строению напоминают пузырьки небольшого размера внутрь которых выстлан гранулярным матриксом, не содержат ДНК и рибосом. По химическому составу отличаются наличием белков – ферментов, которые участвуют в процессах окисления органических веществ в присутствии молекулярного кислорода. В отличие от животных в растительных клетках в пероксисомах протекают процессы фотодыхания. Растительные пероксисомы также называют глиоксисомами. «Пероксисомы и глиоксисомы служат дополнительным источником АФК, которые образуются в ходе фотодыхания или окисления жирных кислот (рис. 3)». «Известен тот факт, что фотодыхание и фотосинтез – это два взаимосвязанных процесса, фотодыхание является обратной стороной фотосинтеза. Показано, что нарушение фиксации  $\text{CO}_2$  в хлоропластах ведёт к повышению оксигеназной активности рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы - ключевого фермента фотосинтеза. В результате образуется гликолат, транспортируемый в пероксисомы где гликолатоксидаза окисляет его с образованием пероксида водорода, как побочного продукта» [50].

При окисления жирных кислот в условиях каталитической активности ацетил-СоА-оксидазы может образовываться перексид водорода. Пероксисомы обладают мощной системой защиты от АФК. В эту систему прежде всего входят ферменты, такие как СОД, каталаза, различные пероксидазы, глутатионредуктаза и другие, которые отвечают за регуляцию процессов образования и утилизации АФК и обеспечения непрерывности электрон-транспортной цепи.

## **Плазмолемма и апопласт**

Образование супероксидрадикала и пероксида водорода с участием НАДФН-оксидазы, которая способна связываться с плазмалеммой происходит в апопласте. В апопласте, при участии диаминоксидазы и полиаминоксидазы при катаболизме аминов также образуется  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и имеет место его дальнейшее

участие в процессах лигнификации стенок клетки [86, 156, 50]. Распад пуринов, катализируемый ксантиноксидазой, а также синтез дезоксирибонуклеотидов являются дополнительными источниками образования супероксид-радикала и  $H_2O_2$ . Следует отметить, что апопласт также содержит некоторые антиоксиданты, регулирующие гомеостаз клетки в целом.

### **Цитозоль**

АФК, которые образуются в различных органелах клетки транспортируются в цитозоль, в котором в свою очередь присутствуют антиоксидантные ферменты от СОД до пероксидаз, которые способствуют поддержанию равновесия между образованием и разрушением АФК. «Воздействие различного рода стрессовых факторов окружающей среды может нарушать этот баланс, так как происходит повышение уровня реакционных радикалов и накопление перекисных компонентов» [50]. «Образование АФК под воздействием стресс-факторов высоко скоростной процесс, на который уходят секунды или даже миллисекунды в зависимости от генотипа и даже вида ткани. Это происходит в силу того, что АФК обладают способностью реагировать с достаточно большим количеством компонентов и могут инициировать цепи радикальных реакций, тем самым стимулируя образование новых и новых радикалов» [50].

«Блокирование такого рода реакций становится возможным благодаря так называемым «ловушкам» радикалов. Такими ловушками могут быть низкомолекулярные соединения и биополимеры, способные присоединять радикал и при этом не образовывать другой радикал. Как результат образуются стабильные соединения и цепь реакций обрывается. Наиболее подвержены воздействиям свободных радикалов липиды мембран, где происходит окисление полиненасыщенных жирных кислот (рис. 3) [50]».

«Образование перекисей жирных кислот в нормальных условиях составляет около  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  М/мг липидов мембран и этого достаточно для протекания различных процессов в клетках растений» [50].

«Увеличение содержания окисленных жирных кислот может привести к повышению концентрации кислорода мембран, которое способствует инактивации белков мембран и нарушению структуры липидного бислоя. Существуют данные о том, что АФК участвуют в окислении таких аминокислот, как метионин, триптофан, тирозин, фенилаланин, цистеин, а также углеводов и нуклеиновых кислот. Такого рода окисления вызывают нарушение целостности ДНК и структуры клеточных компартментов, и клетки в целом» [80, 168, 169, 50].



**Рисунок 3.-Схема перекисного окисления липидов [167, 50]**

В благоприятных для роста и развития растений условиях и в различные фазы онтогенеза скорость образования АФК находится под регуляцией биосинтеза антиокислительных компонентов, например антиоксидантных ферментов, низкомолекулярных соединений, некоторых аминокислот, таких как пролин или биосинтеза фенолов [167,109,101,50].

## **1.2. Антиоксидантные системы детоксикации активных форм кислорода в условиях стрессорного воздействия**

Первостепенная роль в защите растений от повреждающего действия оксидативного стресса принадлежит энзиматическим и не энзиматическим системам детоксикации АФК [7,100, 146,50]. Такие системы, как правило называют антиоксидантными, а компоненты системы антиоксидантами. Основным и универсальным свойством антиоксидантов является способность блокировки реакций формирования радикалов и образования устойчивых и нетоксичных компонентов. Исследования учёных доказывают, что системы

защиты, включающие в себя метаболические реакции снижения и инактивации АФК выработались в ходе эволюции растений [100,45, 50,11].

Следует отметить, что компоненты антиоксидантных систем подразделяют на высокомолекулярные, к ним относят ферменты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы и т.д. и низкомолекулярные к которым относятся пролин, каратиноиды, глутатион, некоторые витамины, сахара, полиамины и соединения фенольной природы [50, 66,80,102, 126, 177].

Известно, что антиоксидантная система защиты от стресса развивалась в ходе эволюции и на данный момент можно утверждать, что она имеет конституитивный характер и может проявляться в широких пределах у разных таксономических групп и видов растений. Нужно учитывать и тот факт, что антиоксидантная система является приспособляемой и многоцелевой, и это зависит от многих факторов, например биохимических свойств, компартментации клеток, трансляционной активности и биосинтеза белков и т.п. Всё это даёт возможность антиоксидантной системе контролировать постоянство уровня АФК во все периоды онтогенеза и в любых условиях [186, 50, 11].

Какова же роль антиоксидантных ферментов в растениях при воздействии стрессовых факторов среды?

### **1.2.1. Ферменты антиоксидантной системы**

#### **Фермент супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1)**

Существует мнение, что первостепенная роль в защите клеток от формирования АФК принадлежит супероксиддисмутазе (СОД). В настоящее время выявлено три изоформы СОД. Различают Cu/Zn-СОД, Fe-СОД и Mn-СОД, то есть от наличия иона металла в активном центре фермента. Эти изоформы различаются по клеточной локализации, например в митохондриях, хлоропластах, апопласте, пероксисомах и цитозоле [130,45,50]. Существует ряд работ, где показано, что все живые организмы содержат СОД, но только в растениях обнаружены все три изоформы [130,45, 50].

«Медь и цинк-содержащая СОД (Cu/Zn-СОД) обнаружена в клетках всех живых организмов. В клетках растений Cu/Zn-СОД обнаружена во всех

внутриклеточных компартментах - в цитозоле, хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, а также в апопласте. Cu/Zn-СОД цитозоля растительного и животного происхождения является гомодимером, состоящим из двух равного размера субъединиц, связанных нековалентно (масса изоформы колеблется в пределах 32-34 кДа), хлоропластная изоформа растений является гомотетрамером. Кристаллическая структура растительной Cu/Zn-СОД гомологична таковой из клеток животных: каждая субъединица фермента имеет структуру бочонка (бета-барреля)» [126, 3, 50].

«Марганец-содержащая изоформа (Mn-СОД) выявлена у эукариот и прокариот. Mn-СОД изоформа локализована в матриксе митохондрий и пероксисомах у эукариот, хотя в печени человека данный фермент в значительном количестве обнаружен в цитозоле [93]. Mn-СОД состоит из 2 или 4 субъединиц с молекулярной массой 46 или 92 кДа соответственно» [80,3,126,50].

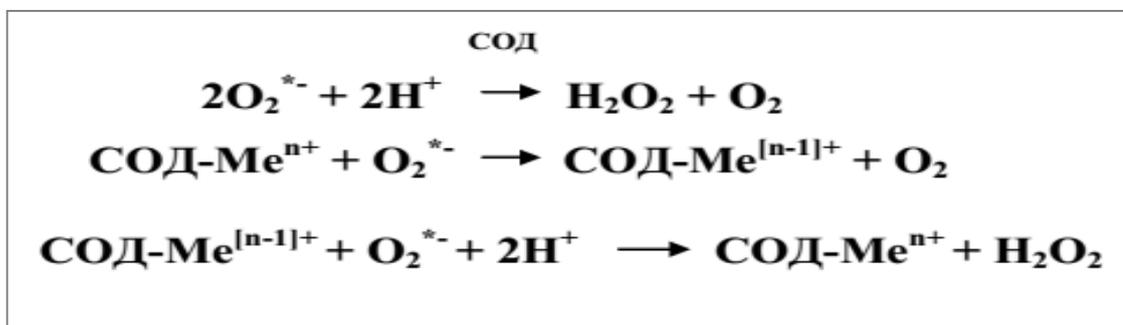
«Железо-содержащая изоформа (Fe-СОД) обнаружена только в клетках растений, где локализована в хлоропластах, пероксисомах листьев *Lycopersicon esculentum*, в цитозоле клубеньков клевера, сои, фасоли, а также пероксисомах лепестков гвоздики. Молекула Fe-СОД имеет форму гомодимера. Следует отметить, что имеет место различия по молекулярной массе, так в хлоропластах молекулярная масса равна 36-46 кДа, в цитозоле клубеньков у бобовых равна 54 кДа» [126, 3,50].

«Показано, что изоформы СОД отличаются и по чувствительности к ингибиторам, а именно к цианиду ( $\text{CN}^-$ ) и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Медь и цинк-содержащая СОД (Cu/Zn-СОД) ингибируется  $\text{CN}^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а изоформа Fe-СОД ингибируется  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Марганец-содержащая форма (Mn-СОД) устойчива к действию как цианида (CN), так и  $\text{H}_2\text{O}_2$ » [130, 80,3,50].

«Число изозимов СОД у разнообразных видов растений различается [3]. Например, в клетках листьев кукурузы обнаружено 9 изозимов СОД, которые включают 4-е медь- и цинксодержащие СОД (Cu/Zn-СОД), локализованные в цитоплазме, 1-ую Cu/Zn-СОД находящуюся в хлоропластах и 4-е марганецсодержащие СОД (Mn-СОД), выявленные в митохондриях. В растениях

*Arabidopsis thaliana* обнаружено 3 Cu/Zn-СОД, 1 Mn-СОД и 3 Fe-СОД» [126, 50].

«СОД участвует в реакции диспропорционирования супероксидных анион-радикалов, в результате чего образуется молекулярный кислород и пероксид водорода (рис.4)».



**Рисунок 4. - Механизм активности супероксиддисмутазы (СОД)**

«Механизм активности супероксиддисмутазы заключается в последовательном восстановлении и окислении супероксидными анион-радикалами металла (Me) активного центра. Данная реакция может протекать спонтанно, но в присутствии СОД скорость протекания реакции повышается в 10000 раз» [80, 3, 50].

Известно, что сверхпродукция  $\text{H}_2\text{O}_2$  может происходить под действием стрессовых факторов среды и провоцировать нарушения в структуре биомолекул. Также как и СОД, в клетках растений присутствуют ферменты детоксификации пероксида водорода. Для растений наиболее характерно проявление активности каталазы и ряда пероксидаз, например гваяколпероксидазы, аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидаза [80,153,102, 50].

#### **Фермент каталаза(КФ 1.11.1.6)**

«Каталаза является тетрамером, который в своей структуре содержит гем и участвует в разложении перекиси водорода на молекулярный кислород и воду. Этот процесс не требует присутствия других соединений-восстановителей и функционирует в условиях довольно высокой концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Проведённые филогенетические исследования выявили возможность разделить растительные каталазы на три класса: I - ферменты, обнаруженные у однодольных и двудольных растений, которые участвуют в детоксикации пероксида водорода в

пероксисомах и глиоксисомах в нормальных условиях жизнедеятельности растений; II - ферменты, в основном, обнаруженные у двудольных растений; III - ферменты, обнаруженные у однодольных [80, 126, 45, 50]».

### **Ферменты пероксидазы (КФ 1.11.1.X)**

«Пероксидазы (ПО) составляют большое семейство ферментов, которые также как каталаза содержат в своей структуре гем. Пероксидазы подразделяют на три класса:

I - внутриклеточные пероксидазы;

II – пероксидазы грибов;

III - секреторные пероксидазы» [161, 50].

«Известно, что секреторные пероксидазы III-его класса катализируют реакции восстановления пероксида ( $H_2O_2$ ), используя различные молекулы - доноры, такие как пирокатехин, гваякол, гидрохинон, аскорбиновая кислота, глутатион, ароматические кислоты, адреналин. Этот класс пероксидаз характерен почти для всех компартментов клетки (хлоропласты, глиоксисомы, пероксисомы, митохондрии, цитозоль, клеточная стенка). Следует отметить, что изоэлектрические точки этих ферментов различаются существенно, имеют место как анионные, так и катионные формы. Хотя корреляция между изоэлектрической точкой и изменением энзиматической функции пока не найдена» [161,50]. «Гены, кодирующие ферменты этого класса составляют мультигенное семейство. Эволюция пероксидаз подразумевает около 450 миллионов лет. Большое число копий генов, которые кодируют пероксидазы, возможно, являются следствием эволюции органов, функции и структуры растительной клетки, из которых вытекает сложность организации метаболизма самой клетки. Такая мультигенность пероксидаз является причиной их участия в большом числе процессов, присущих клетке, в том числе защита от патогенов, что связано с влиянием биоразнообразия биотопов. Высокий уровень аскорбата глутатиона и пероксидаз, локализованных на внутренней поверхности тонопласта вакуолей способны транспортировать избыток  $H_2O_2$ » [161, 50].

### **Аскорбат пероксидаза (КФ 1.11.1.11)**

«Аскорбатпероксидаза (АПО) – это фермент, содержащий порфириновое кольцо и гем как простетическую группу, в связи с чем относится к семейству пероксидаз растительного и бактериального происхождения 1 класса. При восстановлении  $H_2O_2$  эти ферменты используют аскорбиновую кислоту как донора электронов» [50]. «АПО идентифицирована во многих компартментах клеток высших растений, водорослей и цианобактерий [74,187, 50]». «Существует множество изоформ аскорбат пероксидазы отличающиеся по молекулярной массе, специфичности, рН и стабильности. Под воздействием АПО две молекулы аскорбата окисляются до монодегидроаскорбата и дегидроаскорбата» [173,100,126,111, 50].

«АПО локализована в различных клеточных компартментах: цитоплазме, пероксисомах, хлоропластах» [50].

«Гены, участвующие в кодировании изоформ АПО, охарактеризованы для гороха, *Arabidopsis thaliana*, клубники и др. Исследования на молекулярном уровне показали, что экспрессия гена *APX1*, кодирующего изоформу зависит от стрессовых факторов среды, провоцирующих окислительный стресс. Это подтверждает факт *cis*-элемента в промоторной части гена. В настоящее время выявлен *heat-shock cis*-элемент и антипероксид *cis*-элемент» [50].

В ходе исследования Dabrowska с соавторами [90] выявлено, что дифференциация семейства АПО по филогенетическому дереву на цитозольную и хлоропластную формы является одним из наиболее ранних событий процесса эволюции [90, 50].

«АПО, наряду с другими антиоксидантными ферментами и низкомолекулярными соединениями участвует в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза и необходимого уровня глутатиона и аскорбата в клетках растений» [190,102, 50].

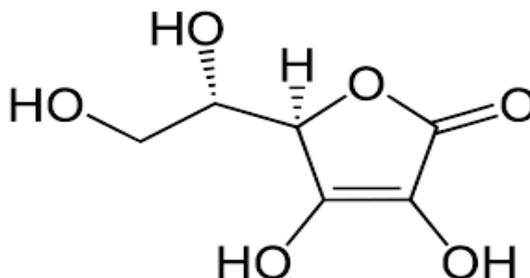
### **1.2.2. Низкомолекулярные антиоксиданты**

«Биосинтез низкомолекулярных антиоксидантов, которые образуются в результате стресса, например аскорбиновая кислота, токоферол, пролин,

полиамины, глутатион, антоцианы, каротиноиды и флавоноиды показан в исследованиях многих авторов» [188,173, 92, 103, 155, 181, 77, 50].

### Аскорбиновая кислота

«Аскорбиновая кислота, аскорбат, витамин С имена одного и того же вещества, которое относится к наиболее распространенному антиоксиданту как в растительной, так и в животной клетке».



«Концентрация аскорбиновой кислоты в хлоропластах и других компартментах может быть высокой, до 20 мМ. Аскорбиновая кислота является донором электронов во многих биохимических реакциях. Существует достаточно много работ, где показана роль аскорбиновой кислоты как низкомолекулярного антиоксиданта» [193,80,102,50]. «Аскорбат выявлен во всех компартментах клетки растений. Биосинтез аскорбата происходит в митохондриях и далее осуществляется его транспорт в другие части клетки с помощью протонно - электрохимического градиента или простой диффузии. Известно, что две молекулы аскорбата восстанавливают перекись водорода до воды с образованием монодегидроаскорбата под действием аскорбатпероксидазы в аскорбат-глутатионовом цикле» [50].

«Монодегидроаскорбат является неустойчивым радикалом, подвергающемся диспропорционированию с образованием дегидроаскорбата и далее аскорбата. Данная реакция протекает под каталитическим действием гидроаскорбатредуктазы или ферредоксина, и НАД(Ф)Н выступает в качестве донора электронов. Некоторые учёные считают, что аскорбат способен вступать в реакцию непосредственно с синглетным кислородом и с гидроксил-радикалом, а также с анион-радикалом. Существуют неопровержимые доказательства участия аскорбата в реакции регенерации токоферолов и

окисленных каротиноидов. Но наибольшая активность аскорбата проявляется в процессах детоксикации вторичных продуктов окислительно-восстановительных реакций [100, 50]».

«Известно несколько путей биосинтеза аскорбиновой кислоты (рис. 5). Наиболее хорошо изучен биосинтез аскорбиновой кислоты из L-галактозы, где в качестве фермента катализирующего данное превращение выступает ГДФ L-галактозфосфорилаза» [50].

«Изучение мутантных линий *Arabidopsis thaliana* показало, что биосинтез из L-галактозы является основным путём образования аскорбиновой кислоты» [50].

«Известен путь биосинтеза аскорбата с участием галактоуроновой кислоты, L-глюкозы и мио-инозитола [196], однако существует мнение, что этот путь не играет значимую роль в биосинтезе аскорбиновой кислоты» [50].

### **Фенольные соединения**

Повышенные концентрации соли способны частично или полностью подавлять биосинтез белка, ингибировать ферментативную активность ферментов ассимиляции азота [56, 22], что в итоге способствует накоплению ряда аминокислот в растениях, таких как лейцин, тирозин и др.

«При воздействии солевого стресса в тканях растений наблюдается увеличение скорости процессов гликолиза пентозофосфатного цикла» [43, 59].

«В результате протекания данных реакций образуются эритрозо-4-фосфат и 3-х и 4-х – углеродные фрагменты фосфоэнолпирувата (ФЭП), которые, в свою очередь, являются предшественниками фенольных соединений (ФС) [43]. С повышением пула предшественников ФС происходит активация процессов биосинтеза полифенолов у растений, особенно в условиях стрессовых факторов среды.

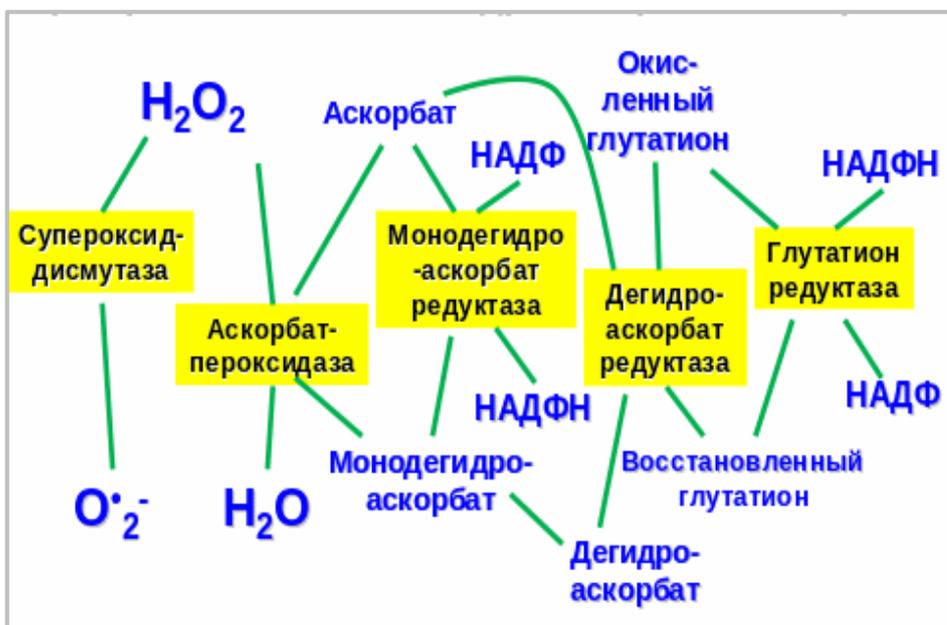
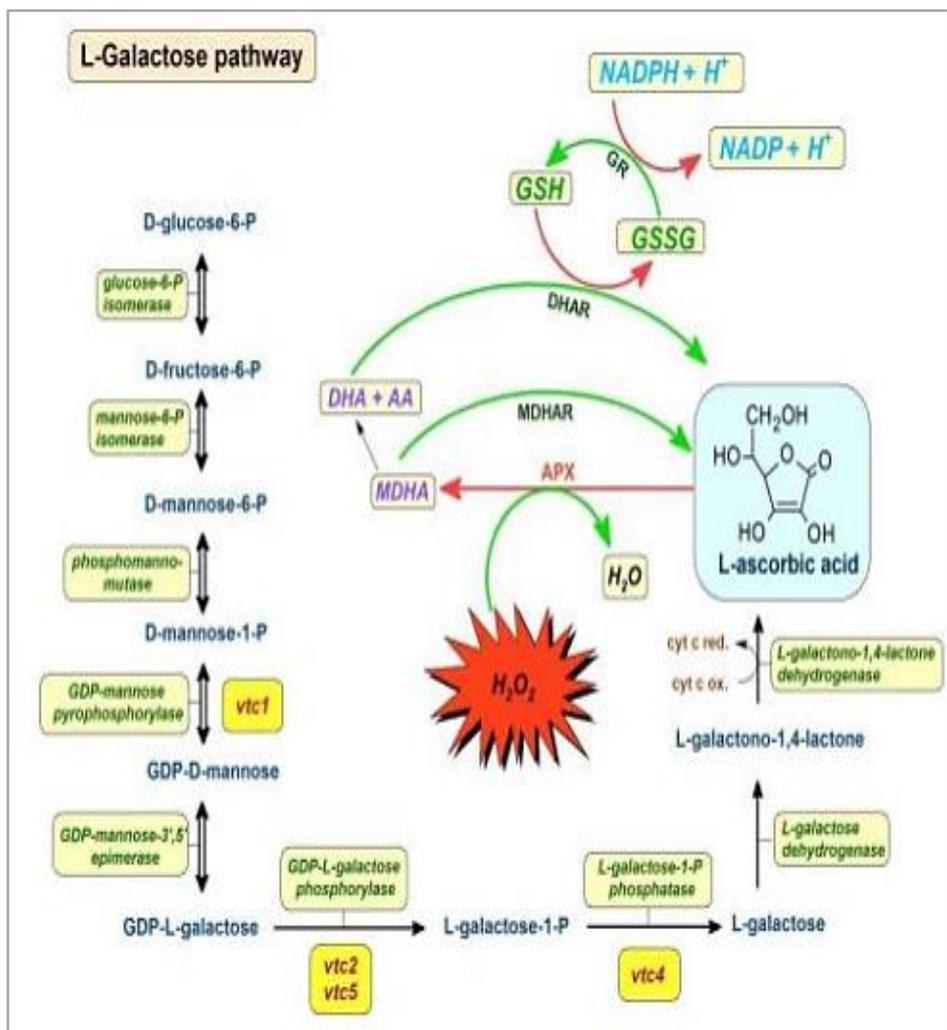


Рисунок 5. - Пути биосинтеза аскорбиной кислоты и процессы детоксикации перекиси водорода

Как правило, в клетках растений ФС присутствуют в свободной форме в виде гликозидов или простых и сложных эфиров, не обладающих высокой метаболической активностью.

«Повышение у растений концентрации свободных форм ФС под действием засоления ведёт к повышению активности, так как в нормальных условиях полярные формы ФС участвуют в стабилизации мембран клеток за счёт гидрофобных и водородных связей. Кроме того, ФС могут участвовать в накоплении запасных субстратов дыхания при стрессе» [11, 43].

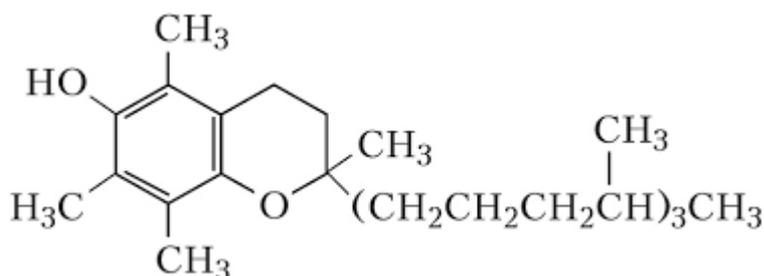
Известно также, что фенольные соединения могут играть роль биологически активных соединений за счёт наличия гидроксильных групп, связанных с ароматическим кольцом.

Например, широко известно, что многие лекарственные растения обладают высоким содержанием фенольных соединений и алкалоидов, в следствие наличия которых проявляется их биологическая активность в качестве лекарственных средств [18, 138, 158].

К наиболее широко распространённым и используемым в различных областях фенольным соединениям относятся токоферолы.

### Токоферолы

«Токоферол или витамин Е является метилированным фенолом. Метилированные фенолы относятся к биологически активным веществам с антиоксидантными свойствами, так как являясь жирорастворимыми веществами участвует в защите клеточных мембран от перекисного окисления».



Некоторыми авторами показано, что растения с повышенной экспрессией гена биосинтеза токоферола имеют высокую антиоксидантную активность» [107,50]. Имеется ряд исследований, подтверждающих что при увеличении

содержания токоферола и фенольных соединений повышается устойчивость растений к воздействию негативных факторов окружающей среды [152]. В работе Leisso с соавторами показана положительная корреляция между уровнем токоферола и устойчивостью некоторых древесных растений к пониженным температурам воздуха [141,50].

Известно, что биосинтез токоферолов осуществляется только в фотосинтезирующих организмах, т.е. в растениях, водорослях и некоторых цианобактериях. Токоферолы синтезируются в оболочках хлоропластов и далее распространяются между мембраной хлоропластов, тилакоидами и пластоглобулами [42]. Физиологическое значение токоферолов в жизнедеятельности человека и животных хорошо изучено, однако недостаточно данных об их функционировании в растительных клетках. Показано, что основной функцией токоферолов является участие в обезвреживании активных форм кислорода и побочных жирорастворимых продуктов при окислительном стрессе. Выявлена роль токоферолов в защите фотосистемы II (ФСII) от фотоингибирования за счет дезактивации синглетного кислорода и путем снижения протонной проницаемости мембран тиллакоидов, что приводит к закислению люмена при активации виолоксантин дезоксидазы под действием интенсивного света. Показана дополнительная биологическая активность токоферолов, которая не коррелирует с их антиоксидантной функцией. Механизмы такого рода эффектов связаны с модуляцией путей передачи сигнала при помощи токоферолов, а также с активацией транскрипции соответствующих генов.

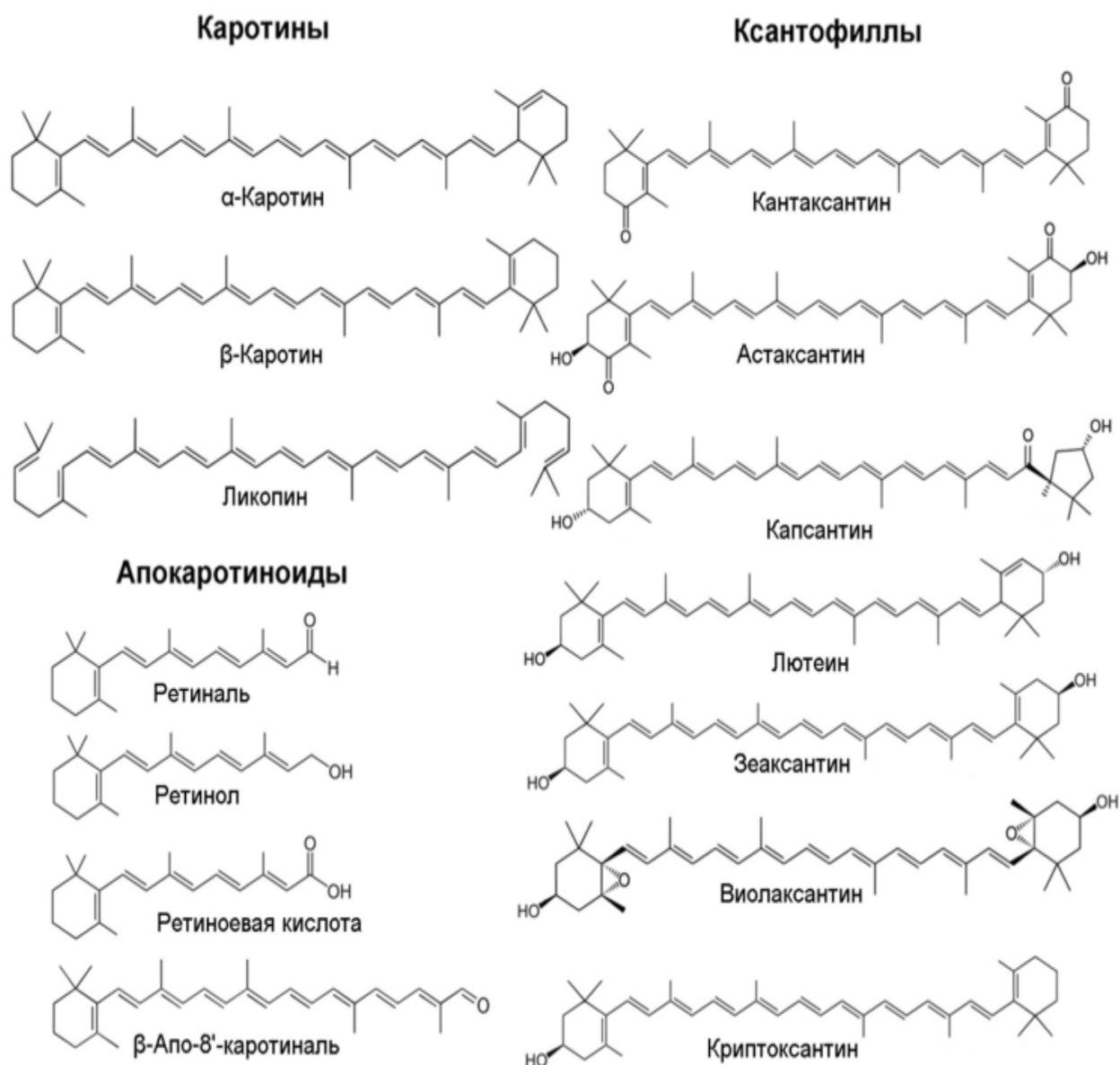
### **Каротиноиды**

«Каротиноиды считаются вспомогательными пигментами фотосинтетического аппарата растений. Каротиноиды являются неотемлемыми пигментами большинства фотоавтотрофных организмов, и несут структурную и защитную функции. По своей химической структуре каротиноиды относятся к терпеноидным соединениям. Тетратерпены и тетратерпеноиды могут являться продуктами окисления или комбинации предшественника ликопина,

образующегося при конденсации изопреноидов» [6,49].

«К.А.Тимирязев писал, что «каротиноиды и, в частности, ксантофилл - это то вещество, которое появляется ранее хлорофилла в этиолированных растениях и сохраняется дольше его в пожелтевших листьях».

По своему составу каротиноиды делят на: каротины и их производные ксантофиллы.



Следует отметить, что каротины – это простые углеводородные соединения. Каротиноиды в основном бывают желтого, оранжевого или красного цвета, чем и отличаются от хлорофиллов. «Каротиноиды, благодаря наличию двойных связей в молекуле очень активно участвуют в «тушении» возбужденного хлорофилла и

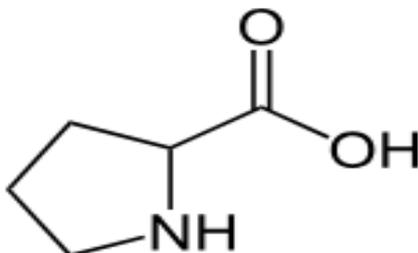
кислорода, что и по сути является проявлением их фотозащитной функции». «В некоторых исследованиях показано, что каротиноиды могут участвовать в экранировании избыточного излучения» [54, 49, 50].

Также имеются данные [133], где показано, что высокое содержание каротиноидов и фенолов в листьях способствует защите ФС II в условиях воздействия UV-B. В ряде работ [50, 150, 152] показано, что каротиноиды вносят существенный вклад в обеспечение непрерывной работы фотосинтетического аппарата.

Таким образом, можно заключить, что каротиноиды несут три основные функции – светособирающую, фотозащитную и структурную. Последняя связана с участием каротиноидов в стабилизации клеточных мембран.

### **Имминокислота пролин**

«Пролин является иминокислотой, которая относится к наиболее распространенным метаболитом высших растений [33,50, 96, 129, 165, 180, 182, 197,199,195].



Достаточно много данных указывает на то, что содержание свободного пролина в десятки, а иногда и в сотни раз повышается при засухе, засолении, действии низких температур, тяжелых металлах и др. [71, 95,113, 124, 191,198,134]. Следует также отметить, что имеются неоспоримые доказательства того, что пролин является одним из ведущих компонентов антиоксидантной защиты клетки в условиях воздействия стресса, выполняет роль осмо- и рН-регулятора в растениях, а также является энергетическим субстратом клетки» [33, 50, 128, 147, 149, 157].

Пролин способен повышать осмотическое давление клеточного сока, что влияет на способность клетки противостоять стрессу в условиях водного

дефицита. [120]. Такая осморегуляторная роль пролина играет стресс-протекторную функцию, то есть при повышении уровня пролина наблюдается понижение водного потенциала [95, 50].

Также известно, что взаимодействуя с макромолекулами и сохраняя свою нативную конформацию в условиях стрессорного воздействия проявляются стресс-протекторные свойства. Это происходит за счёт стабилизации интактной гидратационной сферы белков [129, 159, 171] и связано со строением молекулы пролина, которая имеет гидрофильную и гидрофобную группы, за счёт чего способна образовывать коллоиды. Пролин защищает некоторые ферменты в условиях денатурации, например показано, что при воздействии трихлоруксусной кислоты преципитация белков не наблюдалась [179]. «Имеются данные по изучению агрегации специфических белков в условиях *invitro* под воздействием хлорида натрия и способности пролина понижать степень повреждения [123]. Однако все эти исследования показывают, что пролин оказывает протекторное действие только на нативную структуру белка и способствует предотвращению его полной агрегации, в то время как на первичную структуру белка не наблюдалось его защитного свойства» [50].

Пролин может дестабилизировать двойную спираль ДНК и в условиях понижения температуры плавления ДНК способствует повышению чувствительности к ферменту нуклеазе. Пролин также способствует облегчению репликации ДНК, транскрипции ДНК, и тем самым повышению адаптационного потенциала в условиях стресса [171].

«Пролин играет важную роль, как источник энергии и восстановителей [132, 192]. Фермент скорости деградации пролина в высших растениях пролиндегидрогеназа (ПДГ) локализованная на внутренней мембране митохондрий напрямую связана с электронтранспортной системой и энергогенерацией. Установлено, что электроны и протоны пролина включаются в дыхательную цепь, и это сопровождается пролин-зависимым поглощением кислорода [98, 124, 166]. Окисление пролина до пирролин-5-карбоксилата (П5К) и затем до глутамата является одним из способов обмена НАД/НАДН и

НАДФ/НАДФН [166]. По всей видимости данный механизм способствует повышению уровня глутамата и пролина в высших растениях [5, 131]. У растений в цветках и зрелых семенах имеет место интенсивная экспрессия генов биосинтеза пролина [199], несмотря на высокую активность в этих органах пролиндегидрогеназы (ПДГ) и пониженный водный потенциал» [50, 198].

Существуют косвенные доказательства того, что пролин может играть роль «ловушки» гидроксильного радикала [194]. Также имеются данные, которые указывают на способность пролина «гасить» синглетный кислород [149].

«В некоторых работах показана антиоксидантная роль пролина у растений *Mesembryan thenumcrys tallinum L.* Выявлено что при инициации окислительного стресса под воздействием параквата понижается паракват-индуцируемая активность СОД, то есть у растений, обработанных паракватом экзогенный пролин снижал содержание СОД, что по всей видимости явилось следствием снижения содержания супероксидрадикала» [50, 65].

В условиях света высокой интенсивности и солевого стресса выявлена защитная роль пролина в культуре клеток. Показано, что в присутствии 1М пролина показатели ПОЛ значительно понижаются [72]. «Доказано, что пролин способен инактивировать АФК и тем самым предотвращать апоптоз в животных клетках». «В данной серии экспериментов пролин оказывал защитные свойства от воздействия перекиси водорода и перекиси бутана, использованных в качестве канцерогенов. Данный защитный эффект, по всей видимости, обусловлен наличием вторичной аминогруппы в структуре пирролидинового кольца и участием глутатиона» [135, 50].

### **1.3. Экзогенная индукция антиоксидантной системы растений**

Устойчивость растений в условиях влияния факторов среды, которые вызывают оксидативный стресс и функционирование антиоксидантной системы (АОС) подразумевает поиск методов экзогенной индукции АОС. Предотвращение окислительного стресса включает применение экзогенных антиоксидантов (АО) и подавление генерации АФК. Существует мнение, что

уменьшение оксидативных повреждений в результате действия стрессоров и повышение устойчивости растений связано с использованием антиоксидантов и синтетических производных, обладающих протекторными свойствами [23, 25, 26, 116, 139].

Например, «при добавление пролина в среду выращивания клеток растений табака в условиях солевого стресса наблюдалось повышение активности ферментов каталазы и пероксидазы» [23, 25, 26, 116]. Было выявлено, что «экзогенный пролин способствовал поддержанию постоянного уровня содержания аскорбата и глутатиона при засолении, а также имел положительное воздействие на активность ферментов монодегидроаскорбатредуктазы, дегидроаскорбатредуктазы, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы» [23, 25, 26, 139]. «Наблюдается прямая зависимость влияния экзогенного пролина и бетаина на устойчивость проростков фасоли в условиях окислительного стресса [25, 26, 117], так как происходит увеличение пула глутатиона и ферментов глутатион - редуктазы, -трансферазы и - глутатионпероксидазы. Содержание транскриптов ферментов при стрессе увеличивалось при добавлении экзогенного пролина [76]. При стимулировании растений *Cucumis melo* L. Экзогенным пролином активность СОД, каталазы, пероксидазы, аскорбатпероксидазы и глутатион-зависимых ферментов также увеличивалась» [200,162,32, 23, 25, 26]. По всей видимости это связано с тем, что под действием экзогенного пролина понижается уровень эндогенного. Можно предположить, что пролин как сигнальная молекула регулирует не только редокс гомеостаз клетки, но и влияет на экспрессию генов, ответственных за стрессорный ответ [118]. Выдвинуто предположение, что данный эффект воздействия пролина при стрессе связан с его способностью проявлять эффект шаперона [25, 26].

Имеются данные о том, что содержание сахаров коррелирует с устойчивостью растений в условиях окислительного стресса и наблюдается низкая скорость генерации АФК [172, 87].

Таким образом, из литературных данных видно, что в условиях окислительного стресса экзогенная регуляция устойчивости растений

основывается как на процессах стабилизации АОС, так и на процессах регуляции образования и генерации АФК [8, 13, 23, 25, 26]. Например, имеются исследования по предпосевной обработке семян седаксаном малонатом, что ингибировало активность СДГ, а также понижало содержание пероксида водорода [28]. Можно предположить, что в стрессорных условиях ингибирование образования АФК повышает устойчивость растений к стрессорам. «На различных объектах показано, что экзогенный кальций положительно влияет на образование транскриптов, а следовательно на активность антиоксидантных ферментов. Так выявлено увеличение активности СОД, каталазы и пероксидаз в колеоптилях пшеницы и в листьях кукурузы в условиях хлорида кальция» [23, 24, 25, 26, 119]. «Имеются данные об повышении содержания каталазы комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин у пшеницы [25], арабидопсиса [201], батата» [25, 26, 70, 142, 176]. «Выявлено увеличение числа транскриптов и содержания СОД, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы в клетках растений кукурузы под действием экзогенного  $\text{H}_2\text{O}_2$ » [20, 23, 25, 26, 119, 174, 200]. Активация экспрессии гена APX2 аскорбатпероксидазы в листьях арабидопсиса происходит при участии внеклеточного пероксида водорода [78].

Следует отметить роль «экзогенного оксида азота и его доноров, так как в ряде работ показано, что изменения активности антиоксидантных ферментов и экспрессия их генов происходят под влиянием NO, по всей видимости обусловленной посттрансляционной модификацией и прямом влиянии на экспрессию соответствующих генов» [23, 75, 73, 39]. «Так, оксид азота «взаимодействует с GSH образуя S-нитрозоглутатион (GSNO), обладающий способностью транснаитрозировать белки» [23, 25, 26, 83, 75]. «Известно, что GSNO играет роль индуктора защитных генов [94], а также оксид азота способен стимулировать и ингибировать синтез глутатиона» [24, 25, 26, 75, 79, 203].

В работах показано, что нитропруссид натрия (НПН) в концентрации 0.5 и 2 мМ влияет на понижение содержания перекиси водорода в листьях пшеницы и более того наблюдается рост растений при засухе. Данный положительный эффект обусловлен воздействием оксида азота на экспрессию генов

антиоксидантных ферментов, а также на взаимовлияние компонентов антиоксидантной системы растений пшеницы [23, 27].

Имеются работы, где показано, что сероводород участвует «в сигналинге и регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза растительных клеток в условиях стресса» [25, 143]. «Показано увеличение экспрессии генов и активности аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы и монодегидроаскорбатредуктазы у проростков пшеницы, обработанных сероводородом в условиях осмотического стресса, при добавлении в среду ПЭГ» [23, 24, 25, 26, 183].

«При обработке растений пшеницы гидросульфидом натрия наблюдалось увеличение активности СОД и стабилизация активности каталазы и пероксидазы [23, 24, 25, 26, 30]. Существуют данные, что в условиях засоления наблюдается активация СОД, аскорбатпероксидазы растения пшеницы после воздействия сероводорода [23, 91, 184, 122]. Увеличение активности антиоксидантных ферментов зависит от образования АФК и подавляется антагонистами кальция в клетках колеоптилей пшеницы [23, 25, 29]. Увеличение активности СОД в условиях низких температур при воздействии NaHS наблюдалось у растений винограда [104]. Такая же картина наблюдалась при действии донора сероводорода [85] на растения пеларгонии и бермудской травы, имело место повышение активности каталазы, пероксидазы и глутатионредуктазы» [23, 29, 189].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что стрессовые факторы среды абиотической и биотической природы способны провоцировать окислительный стресс в клетках растений, так как в условиях стрессорного воздействия образуются активные формы кислорода. Показано, что АФК принадлежит важная роль в метаболизме растений. Следует отметить двоякую роль АФК, которые могут выступать как сигнальные молекулы и прооксиданты.

Показано, что существуют различные пути обезвреживания АФК. Системы компонентов, участвующих в детоксикации АФК образуют антиоксидантные системы. Антиоксидантные системы подразделяются на ферментативные и

неферментативные, т.е. компоненты низкомолекулярной природы. Предполагается, что активность антиокислительных ферментов может ингибироваться при воздействии различных стрессоров в клетках растений. В условиях засоления наиболее эффективным защитным механизмом является индукция синтеза низкомолекулярных антиоксидантов [25, 50].

Антиоксидантная система находится под регуляцией компонентов как эндогенной, так и экзогенной системы защиты растений. Однако нет достаточных данных об экзогенной регуляции антиоксидантных систем, в частности в отношении таких компонентов как аскорбиновая кислота и  $\alpha$  - токоферол. В литературе нет данных об комплексных исследованиях, которые бы давали возможность оценить вклад экзогенных антиоксидантов на адаптационный потенциал растений в целом, что и послужило целью данного исследования. В задачу исследования входило выявление роли экзогенных низкомолекулярных антиоксидантов на морфо-физиологические показатели и анализ антиокислительных систем мутантных линий растений арабидопсиса в контроле и в условиях солевого стресса. Полученные данные могут быть использованы в разработке мер по смягчению воздействия неблагоприятных условий окружающей среды, инициирующих окислительный стресс и сверхпродукцию АФК.

Выявленные закономерности некоторых аспектов механизмов устойчивости растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. можно применять в исследованиях различных сельскохозяйственных культур, а также использовать при чтении лекций и спецкурсов по экофизиологии и биохимии устойчивости растений в ВУЗах биологического и сельскохозяйственного профиля, так как механизмы устойчивости растений имеют одинаковые тенденции формирования, что может быть применительно по отношению с/х культур.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

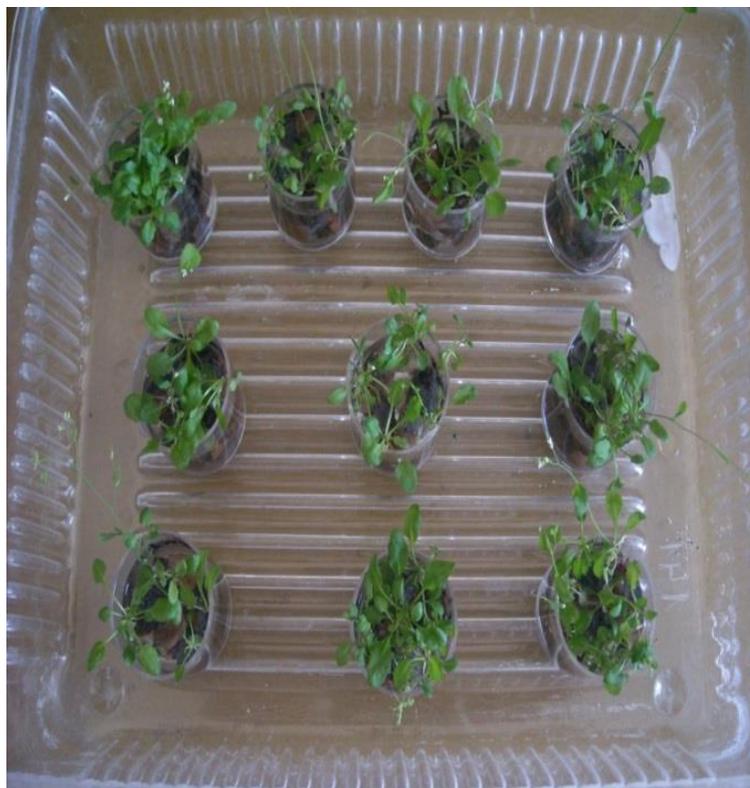
### 2.1. Объекты исследования

В исследовании были использованы растения вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. взятые из генетической коллекции Института ботаники, физиологии и генетики растений Национальной академии наук Таджикистана.

«Для растений относящихся к виду *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. характерными признаками являются: число хромосом  $2n=10$ , однолетнее растение с тонким прямым стеблем от 6 до 44 см, в некоторых случаях до 70 см высотой, имеющим простую или ветвистую форму с голой нижней частью. Листья опушены двух-трёх конечными волосками на черешках и простыми длинными волосками, иногда нижняя сторона пластинки листьев почти голая, цельнокрайняя или с малозаметными немногочисленными зубцами; прикорневые листья продолговатые или овальные на коротких черешках; стеблевые листья малочисленные, некрупные, сидячие или на очень коротких черешках, продолговатые или ланцетные. Кисть в период плодоношения сильно удлиняющаяся и рыхлая. Чашелистики 1 – 1,8 мм длины, продолговатолinéйные, островатые голые или у самой верхушки с несколькими простыми волосками. Лепестки 2 – 3,5 мм длины, белые, продолговатые. Плодоножки 4 – 18 мм длины, тонкие, голые, косо вверх направленные. Стручки 6 – 15 мм длины и 0,5 – 0,7 мм ширины вверх направлены, прямые или слегка изогнутые, плосковатые или цилиндрические, голые» [60].

«В Таджикистане растения вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. встречаются в предгорьях, среднегорьях и высокогорьях на высоте 700 до 3600 м. над уровнем моря, по берегам рек, на песках и глинистой почве, на мелкоземистых и щебнисто-каменистых склонах, изредка на скалах и вдоль снежников, в злаково-разнотравных группировках, разнотравно-кустарниковых зарослях, миндальниках, орешниках, кленовниках, арчѳвниках, розариях, иногда, как сорное растение в посевах пшеницы» [60].

Экспериментальные работы (рис.6.А) проводили используя дикий генотип *Enkheim* (*En*) и следующие мутантные линии (рис.6.В):



**Рисунок 6(А). – Растения арабидопсиса (дикая форма *Enkheim* и мутанты) в условиях эксперимента.**

*flavi* - 58/15 *flavis*-1(*flavoviridis*), мутации из серии множественных аллелей локализованы в 5-ой хромосоме, относящиеся к пигментным мутациям. Растения имеют желто-зеленую яркую окраску листьев (иногда стеблей и стручков), переходящих в светло-желтый или светло-зеленый; верхушки стручков усыхающие; созревание семян неравномерное. Размер розетки 2.5-5.0 см; высота растения 10-17 см. Развитие замедленное; плодовитость пониженная. *flavi* - 58/15



*cla* – 90 *Clavatus* (*clavatus*), мутантные гены находятся в 5-ой хромосоме, относящиеся к морфологическим мутациям. Стручки у данного генотипа имеют булавовидную, саблевидно-изогнутую форму. Размер розетки 1.5-3.5 см; высота растения 14-35 см. Всегда только 1 стебель (иногда 1-2 боковые ветви), развитие почти нормальное, плодовитость нормальная или чуть повышенная.



*cla* – 90 *Clavatus*

*ass*- 931/1 (*ass* 1) (*asymmetrica*) мутантные гены локализованы в 3-ей хромосоме, относятся к морфологическим мутациям. Листья у данного генотипа расположены ассиметрично, растение кустистое. Размер розетки 3-6.5 см. Высота растения 20-25 см. Развитие замедленное, плодовитость пониженная [61].



*ass*- 931/1

**Рисунок 6 (В). – Растения арабидопсиса, мутантные линии.**

## 2.2. Методы исследования

Полевые и лабораторные экспериментальные работы проводились в течение 2016-2020 гг. на опытном участке Института ботаники, физиологии и генетики растений Национальной Академии наук Таджикистана (г. Душанбе), расположенном в восточной части Гиссарской долины на высоте 834 м над уровнем моря.

Природно-климатические условия места, где проводились опыты характеризуются заметными сезонными изменениями температуры и влажности воздуха. Среднегодовая температура воздуха равна +14,2<sup>0</sup>С. Сумма эффективных температур (выше 10 <sup>0</sup>С) составляет 4700-4900 <sup>0</sup>С. Среднегодовая сумма осадков – 610 мм и их основное количество (до 90%) приходится на зимне-весенний период. Среднегодовая относительная влажность воздуха – 60%. Суммарное количество приходящей солнечной излучений за год составляет 7600 МДж/м<sup>2</sup>, а фотосинтетически активной радиации (ФАР) – 3200 МДж/м<sup>2</sup>.

Растения арабидопсиса выращивали в пластмассовых ванночках (24x14x7), заполненных субстратом (почва/песок в соотношении 2:1 соответственно) в период с марта по май месяц.

В фазу выхода в стрелку – цветения одну группу растений переводили в водную среду с добавлением аскорбиновой кислоты (АК) и α-токоферола (Е) по схеме: контроль I - H<sub>2</sub>O; опыт I – H<sub>2</sub>O+АК (1 мкМ); H<sub>2</sub>O+Е (1 мкг/мл); H<sub>2</sub>O+АК+Е. Опыты во второй группе растений проводились по аналогичной схеме, но с добавлением NaCl: контроль II – H<sub>2</sub>O+NaCl; опыт II – H<sub>2</sub>O+ NaCl + АК (1 мкМоль); H<sub>2</sub>O+NaCl +Е; H<sub>2</sub>O+NaCl + АК + Е. Длительность солевого стресса составила до 3-х суток.

Прирост корней и стеблей определяли на 5-тый день после перевода растений в условия стресса. Длину стеблей и корней проводили общепринятым методом, используя миллиметровую бумагу.

### **Определение прорастания и всхожести семян**

Определение проводили по [58]. Всхожесть семян – это количество (выраженное в процентах) нормально проросших семян за определенный период времени, который определяется для каждой культуры индивидуально, в наших исследованиях - 7 суток. Одновременно со всхожестью высчитывается энергия прорастания, которая характеризует дружность всходов семян (на 3-й день).

Предварительно семена арабидопсиса помещали в воронку Шотта и поверхностно стерилизовали 96% этанолом, затем, переносили на чашки Петри, покрытые фильтровальной бумагой и замоченные дистиллированной водой (контроль) или различной концентрацией раствора NaCl (от 50 до 200 мМ). Растения выращивали в термостате (ТС-80М-2, Россия) при температуре 24°C. Подсчёт семян производили на 3-ий и 7-ой день. Результаты учета проросших растений обозначали (выражали) процентом от общего количества семян, взятых для каждого опытного варианта (100%).

### **Определение активности супероксиддисмутазы**

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия [108] с некоторыми модификациями, как описано инициал Полесской с соавт. [44].

1) 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7,8). Для его приготовления использовали ранее приготовленные сток-растворы: 0,2 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,36 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворить в дист. воде и довести до 50 мл), 0,2 М NaOH (400 мг NaOH растворить в дист. воде и довести до 50 мл).

Приготовление 50 мМ К, Na -фосфатного буфера, рН 7,8:

25 мл 0,2 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 25,22 мл 0,2 М NaOH довели до 100 мл дист. водой.

2) экстракционный буфер (к 2 мл 50 мМ К, Na-фосфатного буфера ( рН 7,8) добавили 20 мкл фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)).

3) 0,025% раствор рибофлавина (2,5 мг рибофлавина растворить в 10 мл кипящей дист. воды).

4) 0,05% раствор п-нитросинего тетразолия (NBT) (5 мг NBT растворить в 10 мл дист. воды).

5) 0,24% раствор Na-ЭДТА (24 мг Na-ЭДТА растворить в 10 мл дист. воды).

Навеску растений арабидопсиса массой 150-200 мг растирали в охлажденной ступке в 300-400 мкл экстракционного буфера. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 12 000g. Пробы хранили в холодильнике при 4<sup>0</sup>C.

*Реакционная смесь содержала:*

0,5 мл 0,05% раствора NBT

0,9 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,8)

100 мкл экстракта

20 мкл 0,24% раствора Na-ЭДТА

Для каждого образца сделали две одинаковые пробы с реакционной смесью и экстрактом. Одну пробирку поместили в темноту (шкаф) – темновой контроль, другую выставили на свет. Кроме того, необходимо было приготовить контрольные пробирки без ферментативной вытяжки – для расчета максимального образования формазана. В эти пробирки вместо экстракта внесли 100 мкл К, Na-фосфатного буфера. Реакция запускается добавлением 20 мкл 0,025% рибофлавина во все пробирки. Темновые контроли, включая пробирки для определения максимального образования формазана, поместили в темное место. Остальные пробирки установили под двумя люминесцентными лампами (по 18 Вт). Реакция длилась 15 минут. По истечении времени реакцию следует остановить выключением света. До определения оптической плотности пробы следует держать в темноте. Оптическую плотность измеряли при длине волны 560 нм. За единицу активности СОД принимают количество фермента, способно подавить реакцию восстановления нитросинего тетразолия на 50%. Сначала вычисляется соответствие полученной оптической плотности единице активности. Для этого оптическая плотность максимального образования формазана делится на два и принимается за 50% ингибирования или 0,5 единиц. Расчет производится по формуле:

$$a = 1 - ((\text{Добразца} \cdot 0,5) / (\text{Дформаза} / 2)) \quad (1)$$

Активность СОД рассчитывали по формуле:

$$A = (a \cdot V \cdot X) / (C \cdot L), \quad (2)$$

где: А - активность фермента

а - относительная единица активности, формула (1),

V - объем полученной вытяжки, мл,

X - конечное разведение вытяжки в кювете,

L - толщина кюветы, см,

C - количество белка в данной навеске, мг.

Активность СОД выражают в условных единицах на один мг белка.

Расчет активности СОД также проводили по количественному показателю ингибирования образования формазана. Для этого использовали следующую формулу:

$$\Phi = (\Delta D \cdot X) / (7,2 \cdot C \cdot l),$$

Где: Φ - количество образованного формазана, ммоль/мг белка,

ΔD - разность оптической плотности максимального образования формазана и оптической плотности образца,

X - разведение в кювете,

7,2 - коэффициент экстинкции формазана при длине волны 560 нм,  $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$ ,

C - содержание белка в пробе, мг,

l - длина оптического пути, см.

Измерение активности супероксиддисмутазы произвели в трёх биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляли в программе Microsoft Office Excel.

### **Определение уровня перекисного окисления липидов по измерению содержания конечного продукта - малонового диальдегида**

Измерение содержания малонового диальдегида (МДА) проводили на листьях растений арабидопсиса в фазе бутонизации - начало цветения. Растения выкапывали, корни промывали холодной проточной водой, а затем

дистиллированной водой. Далее растения переносили в водные среды (контроль – H<sub>2</sub>O, опыт –NaCl) с добавлением α-токоферола (Е) и аскорбиновой кислоты (АК) в течение 24 часов.

Об уровне перекисного окисления липидов (ПОЛ) судят по накоплению конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА оценивают по степени накопления продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [115].

500 мг растений арабидопсиса растирали в 1 мл 20% ТХУ. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин. при 12 000 g. Полученный супернатант использовали в качестве образца для анализа.

В две плотно закрывающиеся пробирки внесли по 0,4 мл супернатанта. К одной из проб добавили 0,4 мл 20% ТХУ; в дальнейшем эту пробу использовали при спектрофотометрических измерениях в качестве контроля. К другой пробе добавили 0,4 мл 0,5% раствора ТБК. Пробы инкубировали на кипящей водяной бане (100 °С) в течение 30 мин, затем охладили при комнатной температуре.

Измерения проводили на спектрофотометре при длине волны 532 нм, а также при 600 нм для корректировки неспецифического поглощения (Hodges et al., 1999).

Для вычисления содержания МДА используют коэффициент экстинкции  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Расчет производят по формуле:

$$C = ((\Delta D / 155) \cdot X \cdot V) / ((m \cdot \Delta m) \cdot l),$$

где: C – количество МДА, ммоль/г сухого веса,

$\Delta D$  – разность оптической плотности образца при 532 нм и 600 нм,

155 – коэффициент экстинкции МДА при 532 нм,  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,

X – разведение (общий объем реакционной смеси разделить на количество вносимого образца экстракта),

V – объем вытяжки, мл,

m – масса сырой навески, г,

$\Delta m$  – отношение сухого веса к сырому

l – длина оптического пути, см.

Измерения проводили в трёх биологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляли по программе Microsoft Office Excel («Описательная статистика»).

### **Определение содержания фотосинтетических пигментов**

Содержание фотосинтетических пигментов определяли согласно [54]. Для анализа использовали листья арабидопсиса, которые растирали в 2 мл 96% этанола, затем центрифугировали в течение 5 мин. при 9000 об/мин. (Eppendorf, Польша). Осадок промывали спиртом три раза до полного извлечения пигментов. Оптическую плотность спиртового раствора измеряли при длине волны 665 нм, 649 нм, 654 нм и 440 нм на спектрофотометре Ultraspec II (Швеция).

Эксперимент проводился в трех повторностях. Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали по формуле:

$$A=(C*V) / (1000*m); B=(C* V) / (1000*S),$$

где; A- количество пигментов, в мг/г сухой или сырой массы;

B- количество пигментов, в мг/ дм<sup>2</sup> ;

C-концентрация пигментов в мг/л;

V-объём вытяжки пигментов, в мл;

m- навеска, г;

S- площадь всех дисков, в дм<sup>2</sup>.

### **Определение активности каталазы**

Для определения активности каталазы используют спектрофотометрический метод по [69]. Метод основан на определении скорости разложения перекиси водорода каталазой исследуемого образца с образованием воды и кислорода.

*1. Приготовление 50мМ К, Na-фосфатный буфера, рН 7,8:*

25 мл 0,2 МКН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> и 22,25 мл 0,2 МNaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и скорректировать рН раствора с помощью концентрированной Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> или 5% NaOH.

*2. Приготовление 50мМ К, Na-фосфатного буфера рН 7,0:*

25 мл 0,2 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 14,55 мл 0,2 М  $\text{NaOH}$  смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и скорректировать pH раствора.

3. *Экстракционный буфер* (к 2 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,8) добавить 20 мкл раствора 100 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)).

4. *0,6 М перекись водорода* (3 мл 3% перекиси водорода довести до 4,5 мл дистиллированной водой).

Навеску растений арабидопсиса массой 250 мг растирали в охлажденной ступке в 0,5 мл экстракционного буфера. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 12 000 g. Пробы помещали для охлаждения в холодильник (4<sup>0</sup>С).

Реакционная смесь содержит:

2,95 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,0).

30 мкл экстракт

Реакция запускается внесением в реакционную смесь 20 мкл 0,6 М перекиси водорода.

Контрольная кювета содержит те же реактивы.

Активность каталазы определяли по изменению оптической плотности при длине волны 240 нм ежесекундно в течение 100 с.

Расчет активности каталазы в относительных единицах на один грамм сухого веса проводили по формуле:

$$A = (\Delta D \cdot V \cdot X) / (T \cdot L \cdot m \cdot \Delta m),$$

где: A – активность фермента,

$\Delta D$  - изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

V – Общий объем полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта),

t – время реакции, с,

m – масса навески, г.

$\Delta m$ -отношение сухого веса к сырому

Измерение активности каталазы проводят в трехбиологических и аналитических повторностях. Стандартную ошибку вычисляют в программе Microsoft Office Excel.

### **Определение свободного пролина**

При определении свободного пролина в растительном материале за основу взята методика Bates [5].

Предварительно, на дистиллированной воде приготовили:

- а) пролин (M 115,1) – 23,1 мг на 100 мл (0,2 мМ);
- б) сульфосалициловую кислоту (M 138) – 3 г на 100 мл (3%-й р-р);
- в) орто- фосфорную кислоту (M 98) – 41,9 мл 85%-го раствора орто-фосфорной кислоты до 100 мл (6 М).
- г) ледяную уксусную кислоту (M 60,1) – раствор уксусной кислоты (70%-й р-р); толуол (M 92,1).

Ациднингидриновый реактив готовили, растворяя 1,25 г нингидрина в 30 мл ледяной уксусной кислоты и в 20 мл раствора орто - фосфорной кислоты при нагревании, до полного растворения. Реактив хранится в холодном месте (при температуре 4 °С), стабилен в течение 24 ч.

Навеску растительного материала (0,5-1 г сырых листьев) гомогенизируют в 8 мл раствора сульфосалициловой кислоты. Затем центрифугируют в течение 20 мин (15000g). Супернатант сливают и отбирают в пробирку для определения аликвоту 2 мл, добавляют к супернатанту 2 мл ациднингидринового реактива и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь реагентов нагревают на водной бане при 100 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливают, погружая пробирки в холодную воду (2°С).

Реакционную смесь экстрагируют толуолом (4 мл) при энергичном встряхивании в течение 20-30 с. Хромофор, содержащий толуол, отделяют от водной фазы нагреванием до комнатной температуры. Измерение поглощения проводят при 520 нм, используя толуол в качестве контроля. Концентрацию пролина в супернатанте определяли по калибровочной кривой.

Построение калибровочного графика: необходим стандартный раствор пролина концентрацией 0,2 мкМ/мл (23,1 мг/л), разбавленный до следующих концентраций:

Калибровочные растворы

№ п/п	Концентрация пролина, мкМ/мл	Концентрация Пролина, Мкг/	объем исходного стандартного раствора пролина, мл	Объем воды мл
1	0,2	23,1	2	0
2	0.1	11,5	1	1
3	0,05	5,75	0,5	1,5
4	0,025	2,875	0,25	1,75
5	0,0125	1,2375	0,125	1,875
6	0,00625	0.72	0,0625	1,9375

Реакцию с калибровочными растворами проводят аналогично реакции с опытными пробами. Содержание пролина в растительном материале рассчитывают по следующей формуле:

$$СП = (C_n \cdot V) / (115 \cdot 5 \cdot m),$$

Где: СП - содержание пролина, мкМ / г сырого веса;

$C_n$  – концентрация пролина, определения по калибровочному графику, мкг/мл;

V- объем толуола, мл;

115 – молярная концентрация пролина, мкг/мкМ;

m – навеска растительного материала, г.

### **Определение содержания аскорбиновой кислоты**

Количественное определение содержания аскорбиновой кислоты проводили с помощью гексацианоферрата калия. В кислой среде аскорбиновая кислота стехиометрически восстанавливает гексацианоферрит калия ( $Fe^{+3}$ ) до

гексацианоферрата калия ( $\text{Fe}^{+2}$ ), который в присутствии ионов трехвалентного железа образует гексацианоферат железа (берлинская лазурь). При этом если в среде присутствуют ионы фтора, то берлинская лазурь не выпадает в осадок, а получается раствор синего цвета.

Необходимые реактивы:

1) 0,1 М цитратный буфер, рН 3,69 (2,26 г цитрата аммония растворить в 100 мл дистиллированной воды. Довести рН раствора концентрированной  $\text{HCl}$ ). 2) 1% раствор  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (100 мг  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  растворить в 10 мл дистиллированной воды). 3) 2% раствор  $\text{NaF}$  (200 мг  $\text{NaF}$  растворить в 10 мл дистиллированной воды). 4) 2% раствор  $\text{FeCl}_3$  (200 мг  $\text{FeCl}_3$  растворить в 10 мл дистиллированной воды). 5) 0,2% раствор аскорбиновой кислоты (4 мг аскорбиновой кислоты растворить в 2 мл дистиллированной воды).

Навеску арабидопсиса массой 500 мг растирали в 1 мл буферного раствора (рН 3,69), переносили в пробирки типа эппендорф, сильно встряхнув центрифугировали 5 мин при 12 500 g. Супернатант (экстракт) использовали для дальнейших измерений.

Реакционная смесь содержит: 500 мкл экстракта (буфера – в качестве контроля) 25 мкл 1% раствора  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  25 мкл 2% раствора  $\text{NaF}$  1,9 мл дистиллированной воды 50 мкл 2% раствора  $\text{FeCl}_3$  Примечание: после добавления первых трех компонентов реакционной смеси пробирки встряхнуть и подождать 5 мин. После чего добавить дистиллированную воду и 2% раствор  $\text{FeCl}_3$ . Полученный раствор выдержать 5- 7 мин, периодически встряхивая, после чего проводить измерение оптической плотности относительно контрольного раствора (реакционная смесь с буфером вместо экстракта) при красном светофильтре (680 нм).

Для построения калибровочной кривой необходимо:

Приготовить 0,2% сток-раствор аскорбиновой кислоты (4 мг аскорбиновой кислоты растворить в 2 мл дистиллированной воды). Приготовить серию растворов с концентрацией аскорбиновой кислоты от 2 до 60 мкг/мл (см. табл.). Далее к растворам аскорбиновой кислоты с известной концентрацией добавить

остальные реактивы и проводить измерения, как описано ранее. По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах оптическая плотность—концентрация аскорбиновой кислоты.

Концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/мл	Объём стокраствора аскорбиновой кислоты, мкл	Объём дистиллированной воды, мкл
2	5	495
4	10	490
6	15	485
12	30	470
24	60	440
36	90	410
48	120	380
60	150	350

Содержание аскорбиновой кислоты в экстракте определили с помощью калибровочной кривой. Далее рассчитали содержание аскорбиновой кислоты в образце по формуле:

$$C = (K \cdot V \cdot X) / (m \cdot \Delta m \cdot L)$$

где: C – содержание аскорбиновой кислоты, мкг/г сырого веса,

K – концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/мл,

V – общий объём экстракта, мл,

X – разведение экстракта в реакционной смеси (в данном случае в 6 раз),

L – длина оптического пути, см,

m – масса сырой навески, г,

$\Delta m$  – отношение сухого веса к сырому.

Измерения проводили в трёх биологических и аналитических повторностях.

## Определение содержания активных форм кислорода (АФК)

Определение АФК проводили с использованием нитросинего тетразоля (НСТ) по методу описанному в [97]. Листья погружали в 3мл 0,02М К-На-фосфатного буфера, (рН 7,8), содержащего 0,05% НСТ и 10мМ NaNO<sub>3</sub> (Sigma), на 1 ч. После удаления пробы смесь прогревали на водяной бани в течение 15 мин. при 85°C и затем охлаждали. Восстановление НСТ пробы оценивали на спектрофотометре, по увеличению поглощения при 580 нм. Расчет производили на 1 г сырой массы растений.

## Изучение потенциальной интенсивности фотосинтеза (ПИФ)

Растения выращивали в пластмассовых ванночках (24x14x7), заполненных субстратом (почва/песок в соотношении 2:1 соответственно) в период с марта по май месяцы на экспериментальном участке Института ботаники, физиологии и генетики растений Национальной академии наук Таджикистана.

В опытах использовали растения *Arabidopsis thaliana* в фазе бутонизации - начало цветения. Использовали следующие варианты опытов:

Контроль включал в себя водный раствор с добавлением антиоксидантов:

1) H<sub>2</sub>O; 2) H<sub>2</sub>O+АК(1мкМ); 3) H<sub>2</sub>O+Е; 4) H<sub>2</sub>O+АК+Е.

Опытный вариант состоял из водной среды с добавлением NaCl и антиоксидантов:

2) 1)H<sub>2</sub>O+NaCl; 2)H<sub>2</sub>O+ NaCl +АК(1 мкМ); 3) H<sub>2</sub>O+ NaCl +Е; 4) H<sub>2</sub>O+ NaCl +АК+Е.

Интенсивность потенциального фотосинтеза определяли радиометрическим методом [17] по поглощению <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> срезанными листьями при температуре 28 °С. При этом, карбонат натрия – Na<sub>2</sub> <sup>14</sup>CO<sub>3</sub> использовали как источник меченого углекислого газа <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. В газгольдере концентрация CO<sub>2</sub> составляет 1%, удельная радиоактивность 1 М + Кюри на 1 л CO<sub>2</sub>, длительность экспозиции в листовой камере составляла 1 мин. По завершению экспозиции листья фиксировали в кипящем этиловом спирте. Затем при температуре +65...+70 °С высушивали листья и растирали в порошок для просчитывания их радиоактивности на

пересчётной установке ПП-10, где использовали торцовый счётчик Т-25 БФЛ, эффективность которого была 10 – 12%. Используя формулу, предложенную О. В. Заленским и др. [17]. После внесения поправок на самопоглощение производили расчёт интенсивности фотосинтеза в мг  $\text{CO}_2$  на 1 г сухого веса за 1 ч (или на 1  $\text{дм}^2$  за 1 ч).

### **Радиохроматографический метод определения меченых продуктов фотосинтеза**

При кратковременном фотосинтезе метаболизм  $^{14}\text{C}$  изучали радиометрическим методом по методу [67] при коротких экспозициях. При этом, карбонат натрия ( $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ ) служил источником меченого углекислого газа. Уровень радиоактивности газовой смеси составлял 40 МБК моль, концентрация  $\text{CO}_2$  – 1,0 %. Все опыты по фиксации  $^{14}\text{CO}_2$  определяли на 10-15 высечках из флаговых листьев арабидопсиса площадью около 1  $\text{см}^2$ .

Продолжительность экспозиции в камере с  $^{14}\text{CO}_2$  составляла 60 сек., затем быстро фиксировали высечки в парах кипящего этанола. После чего пробы при температуре 67-70  $^{\circ}\text{C}$  высушивали в термостате. Затем в этих пробах путём радиохроматографического анализа использовали для определения динамики образования меченых продуктов фотосинтеза.

Используя различные концентрации раствора этанола (80, 60, 40, 20%), а затем водой получили экстракции растительного материала. Полученные таким образом, водно-спиртовые фракции выпаривали в тонкой фарфоровой чашке и растворяли в 2-3 мл дистиллированной воде. Затем методом двухмерной тонкослойной хроматографии проводили разделение продуктов водно-спиртовой фракции в следующих системах растворителей: 1. н - бутиловый спирт - муравьиная кислота - вода (6: 1: 2) на порошке целлюлозы – три раза, 2. н - пропиловый спирт - изопропиловый спирт - 25% аммиак - вода (3: 3: 3: 1) – один раз. Затем в зависимости от количества нанесённого радиоактивного экстракта, высушенные хроматограммы экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-I в

течение 55 - 60 дней. С использованием метчиков проводили идентификацию веществ.

### **Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку полученных данных проводили по программам *Microsoft Office Excel 2010*, *Stat Crop 7.2.*, Б.А. Доспехову [16]. Измерения проводили в не менее, чем в трёх биологических и аналитических повторностях.

# ГЛАВА III. НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

## 3.1. Морфо-физиологические показатели *Arabidopsis thaliana* (L.)

### Heynh. в условиях солевого стресса

Факторы абиотической природы могут оказывать негативное влияние на рост и развитие, а также продуктивность растений, так как провоцируют окислительный стресс в клетках. Одним из таких факторов среды является засоление почв. Следует отметить, что существует первичное засоление, которое связано с географическими особенностями местности и вторичное засоление, которое происходит в результате использования различных удобрений в сельскохозяйственном производстве. За последние десятилетия наблюдается тенденция увеличения масштабов вторичного засоления почв во всем мире в силу глобального потепления, так как одним из последствий глобального изменения климата является почвенная засуха, опустынивание и повышение засоленности почв. Всё это негативно сказывается на сельском хозяйстве и имеет далеко идущие негативные последствия для природных экосистем и агроэкосистем.

В Таджикистане имеет место наличие как первичного, так и вторичного засоления. Известно, что более 20% поливных земель в республике подвержены засолению и эта цифра неуклонно растёт.

Очевидно, что для получения высоких и стабильных урожаев необходимо разрабатывать два направления— это, во-первых, изыскать и использовать солеустойчивые генотипы растений и, во-вторых, разработать ряд мер для успешного уменьшения аккумуляции солей в почве. В этом плане *Arabidopsis thaliana* представляет определённый интерес как объект исследования.

Одной из задач нашего исследования было изучение роста и развития растений арабидопсиса при различных концентрациях соли в среде выращивания и выявление роли низкомолекулярных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и  $\alpha$ -токоферол на формирование физиологических механизмов устойчивости при солевом стрессе.

Прежде необходимо дать пояснение, почему для исследования выбрали растения арабидопсиса (Рис. 4).



**Рисунок 7.- Растения вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

На первый взгляд логичнее было бы выбрать в качестве объекта хозяйственно ценное растение вроде пшеницы или бобовых, чем экспериментировать на сорняке, которым является арабидопсис.

Однако следует учесть, что у *Arabidopsis thaliana* есть преимущества перед другими растениями. Например, известно, что на протяжении нескольких тысячелетий селекция культурных видов растений привела к появлению полиплоидов. Понятно, что увеличение числа копий генов в геноме способствует увеличению биомассы и продуктивности. Большинство культурных растений имеют две и более копий генома в клетке, т.е. являются полиплоидами. Полиплоидия может способствовать тому, что при различного рода поломках генов, которые приводят к нарушению процесса транскрипции клетка может экспрессировать копии, которые будут предотвращать последствия генетических помоломок и повреждений. *Arabidopsis thaliana* является диплоидным растением, которое обладает самым маленьким ядерным геномом, расположенным в пяти парах хромосом, что в разы упрощает проведение биохимических и молекулярно-генетических исследований и различного рода манипуляций. Кроме того это растение обладает маленьким циклом развития. С момента прорастания до

получения семян проходит около шести недель и к концу вегетации каждое растение способно дать десятки тысяч семян в отличие от большинства высших растений для которых репродуктивный цикл длится несколько месяцев или даже больше. Арабидопсис самоопыляемое растение и для получения семян достаточно и одного растения. Растения арабидопсиса легко выращивать в лаборатории, в том числе, в стерильных условиях *in vitro*. Большинство высших растений довольно крупные и культивирование в условиях лаборатории затруднительно, а как известно научные исследования всегда стремятся к быстрым результатам, и чем длительнее протекает исследование, тем больше появляется всякого рода неопределенностей.

В литературе имеются много данных, об изучении физиологических, биохимических, генетических и сигнальных путях открытых у арабидопсиса и как правило, эти пути характерны и для других растительных организмов. Это свидетельствует о том, что изучение тех или иных процессов на таком удобном и быстро воспроизводимом модельном объекте как арабидопсис позволит выявить специфические механизмы у важных, с хозяйственной точки зрения, культур.

Проводимые в Институте ботаники, физиологии и генетики растений исследования по формированию механизмов устойчивости растений к факторам среды подразумевают изучение как физиолого – биохимических, так и молекулярно – генетических аспектов стрессоустойчивости и продуктивности в различных условиях. С этой точки зрения растения арабидопсиса являются удобной моделью для изучения экспрессии генов устойчивости и их использование способствует созданию новых, перспективных сортов различных сельскохозяйственных культур.

В сельскохозяйственном производстве, наряду с возделыванием различных устойчивых к засолению сортов, ещё становится очень важным оценка засоленности почвы с использованием некоторых модельных или маркерных (индикаторных) растений. В этом плане использование различных мутантов и диких видов арабидопсиса также является уникальным.

Таким образом, можно констатировать, что учёные во всём мире используют растения *Arabidopsis thaliana* в качестве модели, т.е. экспериментального материала из-за его простого генома, легкого доступа к генетическим материалам и хорошей совместимости к различным условиям, что даёт возможность создания новых перспективных форм растений.

В наших исследованиях, в качестве объекта использовали дикий генотип *En* (Enkheim) и ряд мутантных форм: *flavi* (flavoviridis), *ass* (asymmetrica), *cla* (clavatus) (см. главу 2), которые подвергали воздействию различных концентраций соли (NaCl) для выявления адаптационного потенциала растений и возможности регуляции экзогенными антиоксидантами.

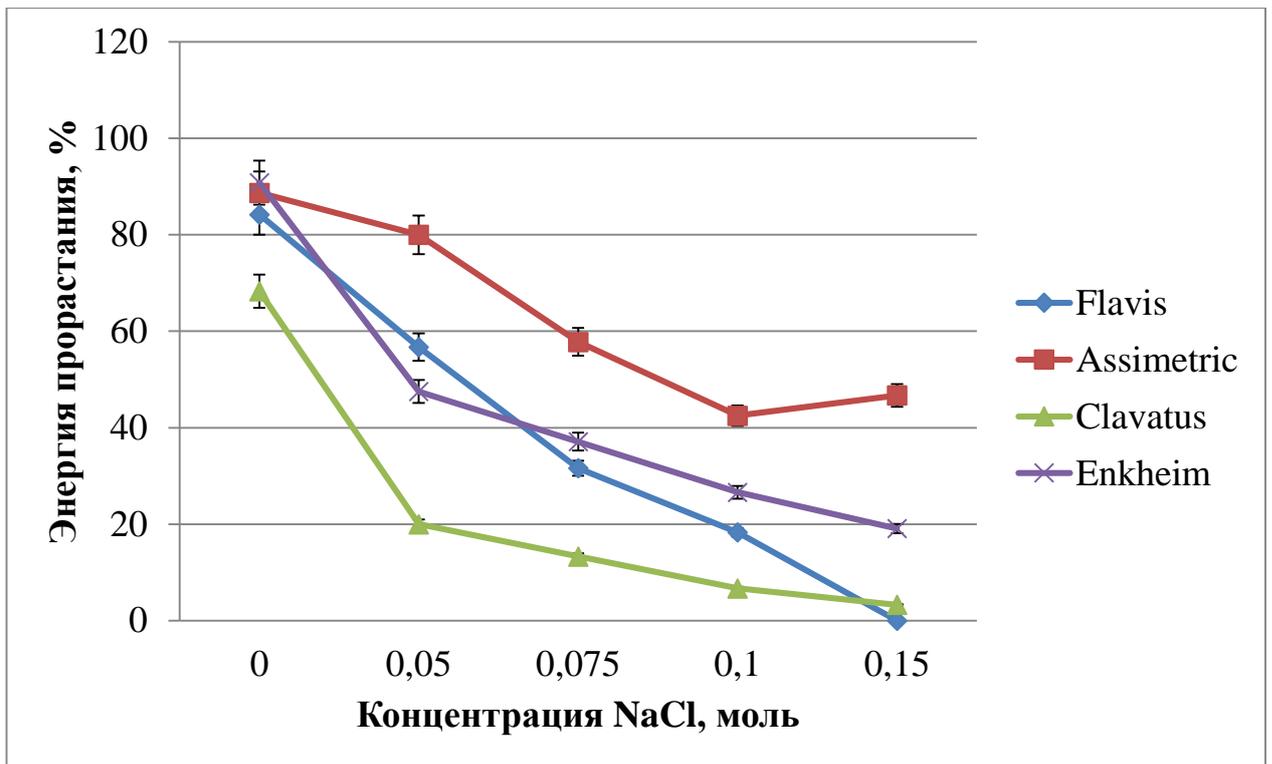
Засоление почв относится к наиболее распространенному экологическому фактору на планете. Увеличение концентрации соли в почве может негативно отразиться на росте и развитии растений, так как влияет на водный потенциал и водный гомеостаз в целом, ионы соли способны блокировать поступление воды в клетки растений, что в свою очередь нарушает нормальный ход метаболизма.

Известно, что большинство растений хорошо растут в нейтральной почвенной среде, но некоторые растения в процессе эволюции, выработали механизмы защитно-приспособительного характера, которые дают возможность расти и развиваться полноценно и в щелочной, и в кислой среде [34,11]. Было изучено влияние различных концентраций NaCl на энергию прорастания и степень всхожести семян растений арабидопсиса (табл.1).

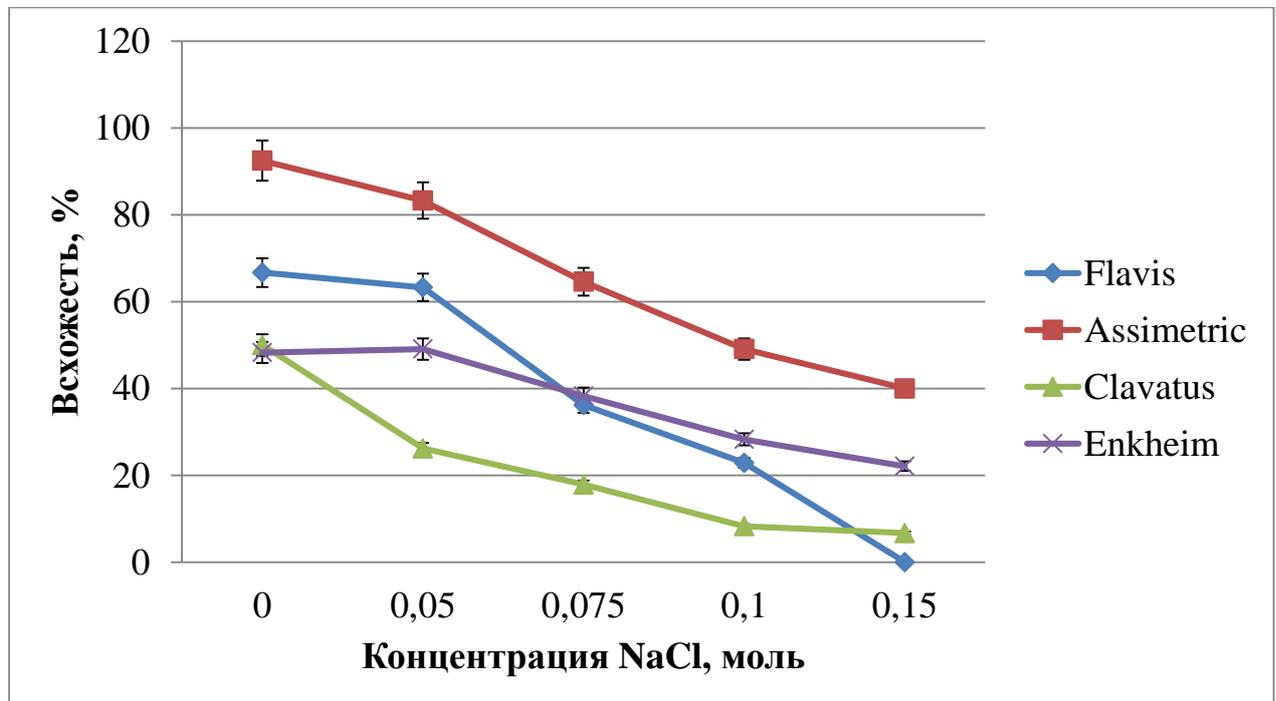
Результаты экспериментов показали, что для дикой формы арабидопсиса *En* и мутантных линий *ass*, *flavi* и *cla* характерно падение энергии прорастания во все периоды солевого стресса. Однако имели место различия, так у мутанта *ass* можно было наблюдать незначительный стимулирующий эффект воздействия NaCl, в то время как у других изученных генотипов наблюдалась чёткая тенденция падения данного энергии прорастания во все периоды воздействия солевого стресса (рис. 8).

**Таблица 1. - Энергия прорастания и всхожесть семян мутантов и дикой формы арабидопсиса при воздействии различной концентрации NaCl**

Генотип	Вариант опыта	Энергия прорастания, %			Всхожесть, %		
		средняя	разниц	% ингиби- рования	средняя	разниц	% ингиби- ровани я
<i>flavi</i>	Контроль	84,2	-	-	66,7	-	
	0,05мМ NaCl	56,7	27,5	32,7	63,3	3,4	5
	0,075мМ NaCl	31,6	52,6	62,5	36,2	30,5	46
	0,1мМ NaCl	18,3	65,9	78,2	22,9	43,8	65,7
	0,15мМ NaCl	-	-	-	-	-	-
<i>ass</i>	Контроль	88,7	-	-	92,5	-	-
	0,05мМ NaCl	80,0	8,7	9,8	83,3	9,2	10
	0,075мМ NaCl	57,8	30,9	34,8	64,6	27,9	30,2
	0,1мМ NaCl	42,5	46,2	52,1	49,1	43,4	46,9
	0,15мМ NaCl	46,7	53,5	47,4	40,0	52,5	56,7
<i>cla</i>	Контроль	68,3	-		50,0	-	-
	0,05мМ NaCl	20,0	14,1	70,7	26,2	23,8	47,6
	0,075мМ NaCl	13,3	20,8	80,5	17,9	32,1	64,2
	0,1мМ NaCl	6,7	27,4	90	8,3	41,7	83,4
	0,15мМ NaCl	3,3	30,8	95	6,7	43,3	86,6
<i>Enkheim</i>	Контроль	90,8	-	-	48,3	-	-
	0,05мМ NaCl	47,5	42,5	47,7	49,1	+1	-
	0,075мМ NaCl	37,1	8,3	59,1	38,3	10,0	20,7
	0,1мМ NaCl	26,6	18,8	70,7	28,3	20,0	41,4
	0,15мМ NaCl	19,1	26,3	79	22,1	26,2	54,2



**Рисунок 8. - Энергия прорастания растений арабидопсиса в условиях солевого стресса.**



**Рисунок 9. - Всхожесть семян растений арабидопсиса в условиях солевого стресса.**

Среди мутантных форм наиболее чувствительными к воздействию NaCl оказался мутант *cla*, у которого концентрация 50 мМ и выше понизила показатель энергии прорастания на более 70%, так же как и у дикой расы *En*, у двух других генотипов наблюдалось плавное падение энергии прорастания.

Следует отметить, что схожая тенденция наблюдалась и при всхожести семян (табл.1). При этом, у изученных мутантов задержка всхожести происходит при концентрации 50 мМ. У дикой формы *En* и мутанта *ass* падение всхожести происходит плавно, в то время как у мутанта *flavi* и *cla* наблюдается более резкий скачок падения при той же концентрации соли (рис.9).

Полученные данные показывают, что изученные генотипы арабидопсиса проявляют различную степень устойчивости, среднюю устойчивость наблюдается у *ass* и *flavi*, значительная неустойчивость у *cla*, а дикая форма *En* является более устойчивой.

Изучение таких физиологических показателей, как рост корней и стеблей дикой формы и мутантов арабидопсиса показало, что NaCl действует как фактор задерживающий ростовые процессы в различной степени, что показано и другими авторами [11] (табл.2). Так у дикой формы *En* процент прироста корней уменьшался в условиях засоления на более, чем 30%, у мутанта *ass* на 50%, у мутанта *flavi* этот показатель варьировал от 35 до более 80%, а у мутанта *cla* ингибирование роста корней в условиях солевого стресса было более 50%. Что касается длины стеблей, то наблюдалась следующая картина: у дикого типа разница от контроля варьировала в пределах от 10 до 37%, у *flavi* – от 6 до 39%, у *ass* от 17 до 40%, и у мутанта *cla* от 2 до 43%.

В целом, концентрация соли 50 мМ и более у мутантных линий значительно снижала ростовые процессы как у корней, так и у стеблей, в то время как дикая форма отличалась более стабильным ростом и развитием в тех же условиях.

Таким образом, анализируя полученные результаты можно заключить, что среди изученных растений наиболее солеустойчивыми являются дикая форма арабидопсиса *En* и мутанты *flavi* и *ass*, а слабоустойчивым *cla*.

**Таблица 2. - Влияние различной концентрации соли NaCl на прирост  
корня и стебля у растений арабидопсиса**

Генотип	Варианты опыта	Прирост корней, см			Прирост стебля, см		
		корень	% от конт-ля	Разница %	стебель	% от конт-ля	Разница %
<i>flavi</i>	Контроль	0,43	100	-	1,06	100	-
	0,05мМ NaCl	0,35	81,4	18,6	1,0	94,3	5,7
	0,075мМ NaCl	0,31	72,1	27,9	0,99	93,4	6,6
	0,1мМ NaCl	0,15	34,9	65,1	0,59	55,7	44,3
	0,15мМ NaCl	0,15	34,9	65,1	0,64	60,4	39,6
<i>ass</i>	Контроль	0,32	100	-	1,11	100	-
	0,05мМ NaCl	0,27	84,4	15,6	0,92	82,9	17,1
	0,075мМ NaCl	0,27	84,4	15,6	0,92	82,9	17,1
	0,1мМ NaCl	0,12	37,5	62,5	0,64	57,6	42,4
	0,15мМ NaCl	0,16	50	50,0	0,66	59,4	40,6
<i>cla</i>	Контроль	0,33	100	-	1,0	100	-
	0,05мМ NaCl	0,30	90,9	9,1	0,98	98,0	2,0
	0,075мМ NaCl	0,30	90,9	9,1	0,80	80,0	10,0
	0,1мМ NaCl	0,22	66,7	33,3	0,66	66,0	34,0
	0,15мМ NaCl	0,15	45,4	54,6	0,57	57,0	43,0
<i>Enkheim</i>	Контроль	0,35	100	-	1,07	100	-
	0,05мМ NaCl	0,30	85,7	14,3	0,96	89,7	10,3
	0,075мМ NaCl	0,31	88,6	11,4	0,89	83,2	16,8
	0,1мМ NaCl	0,31	88,6	11,4	0,82	76,6	23,4
	0,15мМ NaCl	0,24	68,6	31,4	0,67	62,6	37,4

Биометрические расчеты (табл. 3) показали, что в среднем у всех растений опытного варианта, по сравнению с растениями контрольного варианта NaCl угнетает энергию прорастания на 17.3%, а всхожесть семян на 25.6% при значении у контрольного варианта 49.4%, т.е. почти на 50% снижает уровень изученных показателей.

**Таблица 3. - Влияние различной концентрации NaCl на энергию прорастания и всхожесть семян у дикой формы и разных мутантов Арабидопсиса**

Варианты опыта	Энергия прорастания, %		Всхожесть семян, %	
	% прорастания	Разница	% проросших семян	Разница
Контроль*	49,4	-	55,0	-
0,05мМ NaCl	42,5	6,9	43,7	11,3
0,075мМ NaCl	28,3	21,1	31,9	23,1
0,1мМ NaCl	25,0	24,4	24,4	36,6
0,15мМ NaCl	32,5	16,9	17,5	37,5
X	32,5	17,3	29,4	25,6
S <sup>2</sup>	57,72	57,72	123,43	125,78
S	7,8	7,8	11,1	11,2
V,%	23,7	45	37,8	43,8
Sx	3,8	3,8	5,5	5,6
Sx,%	11,8	21,9	18,9	21,9
t <sub>05±</sub>	12,1	12,1	21,1	17,8
Доверит.интервал	20,0÷44,2	5,2÷29,4	8,3÷50,5	7,8÷43,4

Примечание: X - средняя арифметическая; S<sup>2</sup> – дисперсия; S-стандартное отклонение; V,%-коэффициент вариации; Sx - средняя ошибка; Sx,% - относительная ошибка средней

При этом коэффициент вариации (%) изученных показателей явно показывает, что уровень их изменчивости под влиянием соли NaCl значительно превышает нормальный порог и составляет 45.0 и 43.8% (по обоим изученным показателям, соответственно).

Также следует отметить, что значение доверительного интервала в опытных вариантах было значительно ниже, чем в контроле, что указывает на существенное сужение порога между минимальным и максимальным значениями изученных показателей при более высокой концентрации соли.

В целом высокая концентрация NaCl отрицательно влияет на прорастания семян и прирост корней и стеблей изученных растений, а также ведёт к нарушению ряда метаболических процессов и тем самым провоцирует задержку роста во время прорастания.

Таким образом, сравнительный анализ некоторых морфо-физиологических показателей различных мутантов и дикой формы арабидопсиса в условиях солевого стресса показал, что концентрация 100 и 75 мМ значительно влияют на энергию прорастания и всхожесть семян. Устойчивость изученных образцов имеет генотипический характер, то есть генотипически детерминирована, в связи с чем в растениях проявляются различия по физиологическим показателям, а значит дают различным адаптационным потенциалом, что в принципе согласуется с работами других авторов [11].

Известно, что повышенное содержание соли ведёт к изменениям на разных уровнях, на физиологическом уровне наблюдается разрушение компартментов клетки и, как результат, имеет место нарушение ультраструктуры клетки. Наиболее чувствительными к воздействию соли являются хлоропласты, а наиболее устойчивыми – митохондрии. При воздействии стрессорных факторов, в частности соли наблюдается «энергетический голод» в растениях, что непосредственно связано со снижением АТФ-азной активности клетки и митохондрии из доноров энергии превращаются в её активного потребителя [111, 144, 105].

### 3.2. Содержание АФК и фотосинтетических пигментов у *Arabidopsis thaliana* в условиях солевого стресса

«При произрастании растений в условиях повышенного содержания соли наблюдается нарушение структуры хлоропластов, а это, в свою очередь, ведёт к нарушению состояния пигментов, в частности хлорофилла. В большинстве случаев причиной более вредосного засоления почв являются хлористые соли, так как ионы хлора наиболее ядовитые» [11, 140]. «Известно, что пластические пигменты определяют функциональность фотосинтетического аппарата, которая, в свою очередь, коррелирует с продуктивностью растений. У растений, произрастающих на засоленных хлоридами почвах наблюдается специфический хлороз, листья теряют характерную зеленую окраску, становятся желтыми, засыхают и опадают» [11, 140].

Как было сказано, факторы среды могут оказывать негативное воздействие и вызывать окислительный стресс за счёт повышения уровня активных форм кислорода (АФК) и неспособности клетки к их своевременной утилизации.

Как показали исследования (табл.4), содержание АФК в клетках растений арабидопсиса в условиях солевого стресса повышалось.

Наибольшая скорость образования АФК наблюдалась у мутанта *cla*, которое возросло более, чем в 2 раза, у мутантов *flavi* и *ass* повышение содержания колебалось от 36 до 46%, а у дикого экотипа *En* наблюдалось незначительное накопление АФК- 6%.

Следует отметить, что повышение содержания АФК у дикой формы и мутантных линий коррелировало с понижением содержания хлорофилла *a* и *b*.

Так содержание пластидных пигментов у дикой и мутантных форм арабидопсиса при воздействии NaCl показало, что наблюдается некоторое падение соотношения хлорофиллов *a* и *b*, также как содержание каротиноидов. Однако следует отметить, что у мутанта *ass* содержание хлорофиллов и каротиноидов возросло.

Обработка растений антиоксидантами аскорбиновой кислотой и витамином Е (АК и Е) при солевом стрессе показала, что при добавлении в среду содержащей

NaCl экзогенных антиоксидантов имели место различия по уровню и соотношению хлорофиллов *a* и *b*. Такая же картина наблюдалась и в отношении каротиноидов. У дикого экотипа *En* в контроле при обработке растений антиоксидантами наблюдалось понижение содержания хлорофиллов и каротиноидов (рис.10).

**Таблица 4. - Содержание АФК и фотосинтетических пигментов (мг/г сырого веса) в растениях арабидопсиса в условиях солевого стресса**

Генотип	Хл.а	Хл.б	а+б	а/б	Сумма каротиноидов (мг/г сыр.веса)	АФК нмоль/г.сырой массы
<i>flavi/K</i>	0,784± 0,020	0,545± 0,018	1,329± 0,021	1,44	0,287± 0,062	0,206±0,041
<i>flavi/O</i>	0,579± 0,027	0,397± 0,049	0,976± 0,076	1,46	0,217± 0,025	0,302±0,060
<i>ass /K</i>	0,959± 0,077	0,497± 0,040	1,456± 0,116	1,93	0,495± 0,067	0,116±0,033
<i>ass /O</i>	1,056± 0,054	0,569± 0,020	1,625± 0,074	1,85	0,531± 0,063	0,158±0,037
<i>En /K</i>	1,257± 0,105	0,672± 0,054	1,929± 0,159	1,87	0,660± 0,110	0,138±0,031
<i>En/O</i>	1,098± 0,117	0,633± 0,067	1,731± 0,182	1,73	0,643± 0,126	0,147±0,029
<i>cla/K</i>	1,187± 0,111	0,574± 0,038	1,761± 0,150	2,06	0,690± 0,112	0,112±0,032
<i>cla/O</i>	1,126± 0,119	0,640± 0,069	1,766± 0,208	1,76	0,476± 0,208	0,269±0,054

Примечание: К-контрольный вариант (H<sub>2</sub>O); О – опытный вариант (NaCl).

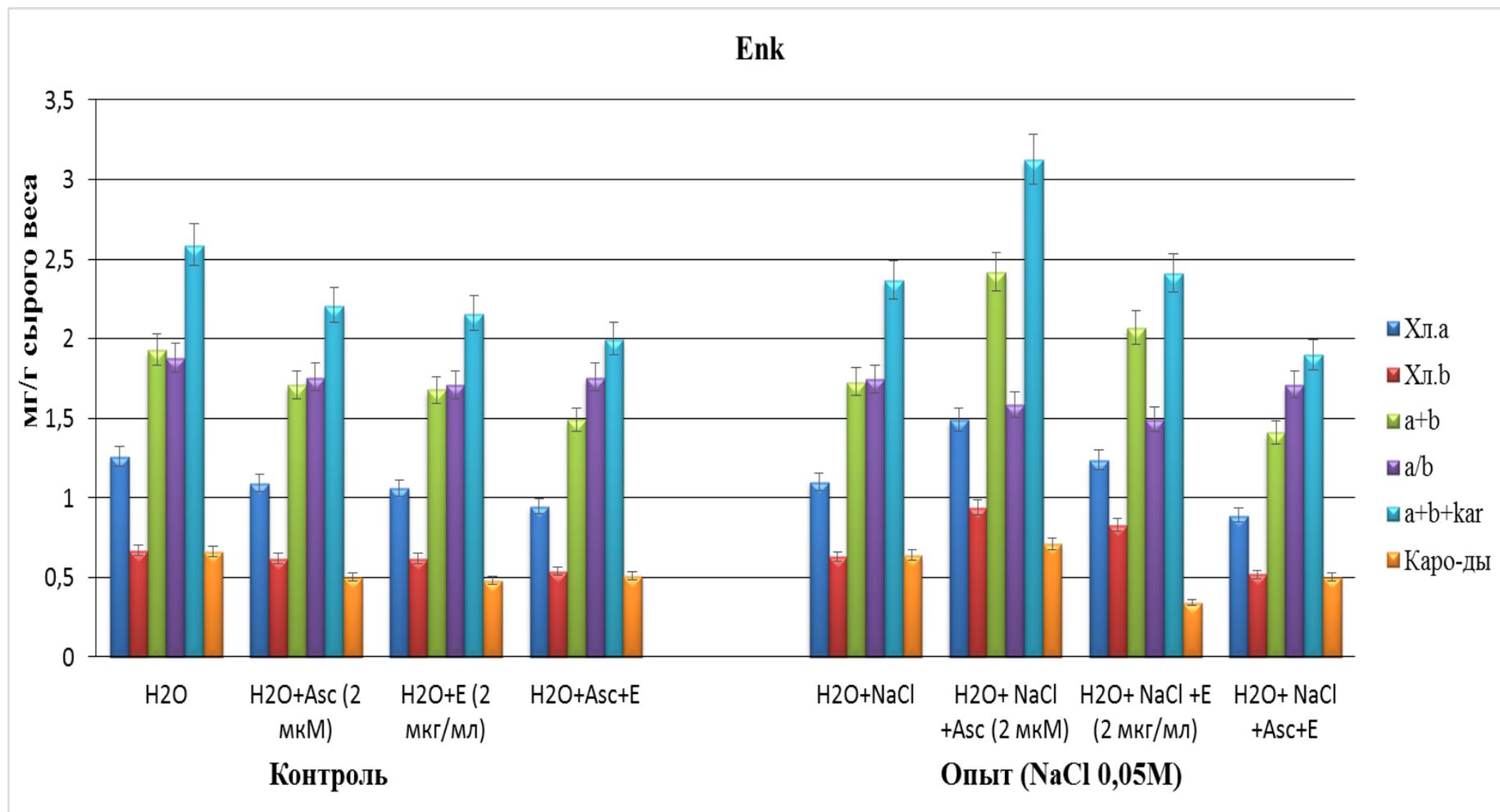
В условиях солевого стресса обработка антиоксидантами привела к повышению хлорофиллов *a* и *b*. Следует отметить, что добавление в среду витамина Е не оказывало такого же действия, как при обработке аскорбиновой кислотой, наблюдался меньший стимулирующий эффект Е в сравнение с АК. Витамин Е имеет ингибирующее действие и понижает содержание каротиноидов, которое упало почти в 2 раза, а обработка ратений комплексом витамина Е и АК оказывало некоторый стимулирующий эффект, т.е. имел место некоторый антиоксидантный эффект, который проявился за счёт аскорбиновой кислоты.

Различна картина наблюдалась и в вариантах с использованием мутантных линий. Так у мутанта *cla* добавление аскорбиновой кислоты как в контроле, так и в условиях солевого стресса не оказывало значительного эффекта. Однако следует отметить, что уровень содержания суммы каротиноидов несколько повышался при добавлении витамина Е и комплекса АК+Е. То есть, в данном варианте можно наблюдать больший стимулирующий эффект витамина Е, что имело место как в контроле, так и в условиях засоления (рис.11).

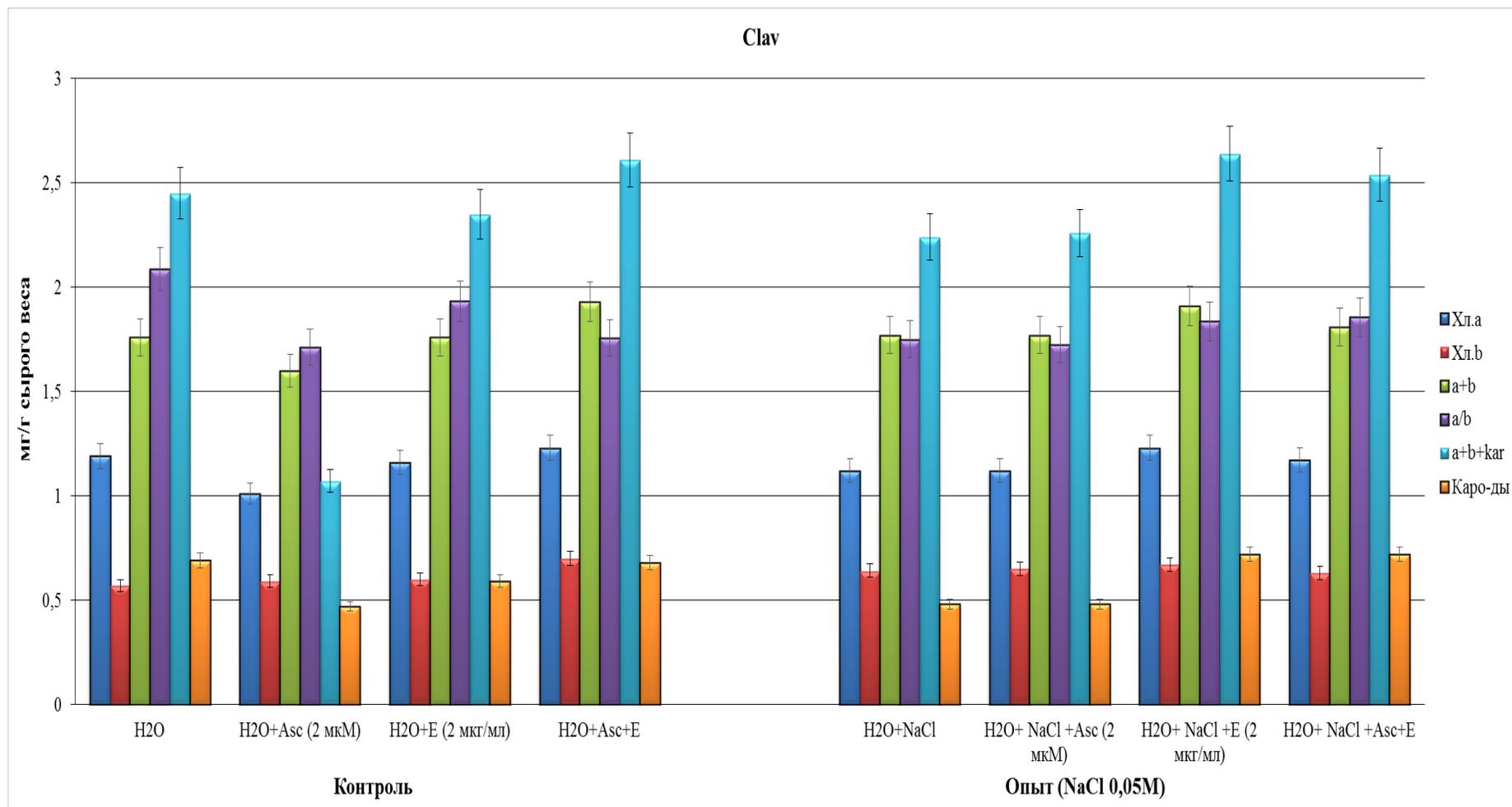
У мутанта *ass* так же как и у мутанта *cla* имел место стимулирующий эффект  $\alpha$ -токоферола, а комплекс - аскорбиновая кислота и токоферол в условиях засоления вызывали понижение содержания хлорофиллов и каротиноидов, в то время как в контроле такого эффекта не наблюдалось (рис.12).

Что касается мутанта *flavi*, в контроле при обработке антиоксидантами наблюдалось падение содержания пигментов, а в условиях солевого стресса АК (аскорбиновая кислота) повышала содержание хлорофиллов и каротиноидов. Токоферол оказывал ингибирующее действие, то есть содержание хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов понижалось (рис. 13).

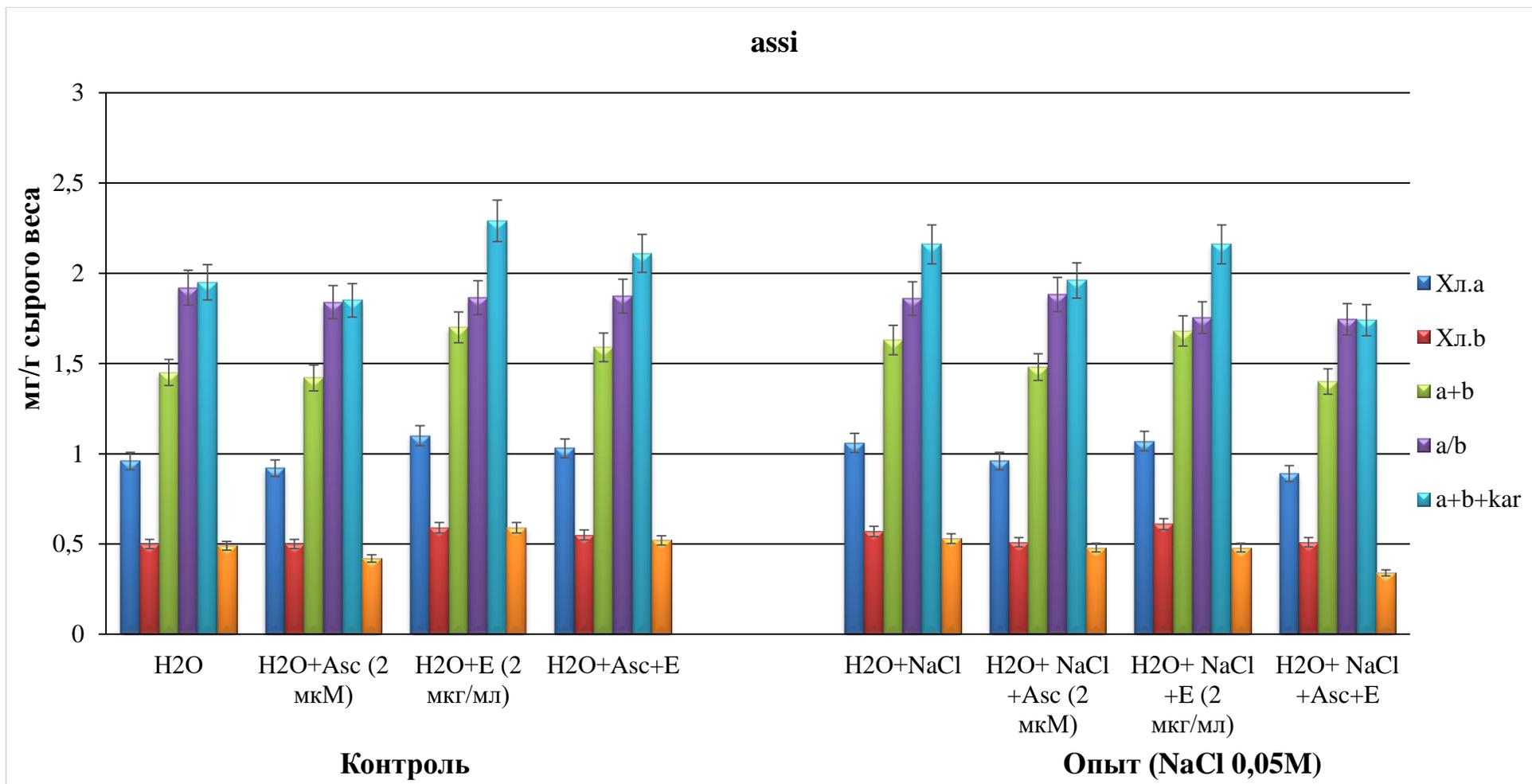
Таким образом, исследования показали, что в условиях и стрессорного воздействия NaCl, и в контроле добавление экзогенных антиоксидантов не всегда имеет стимулирующий эффект на биосинтез и содержание хлорофиллов и каротиноидов.



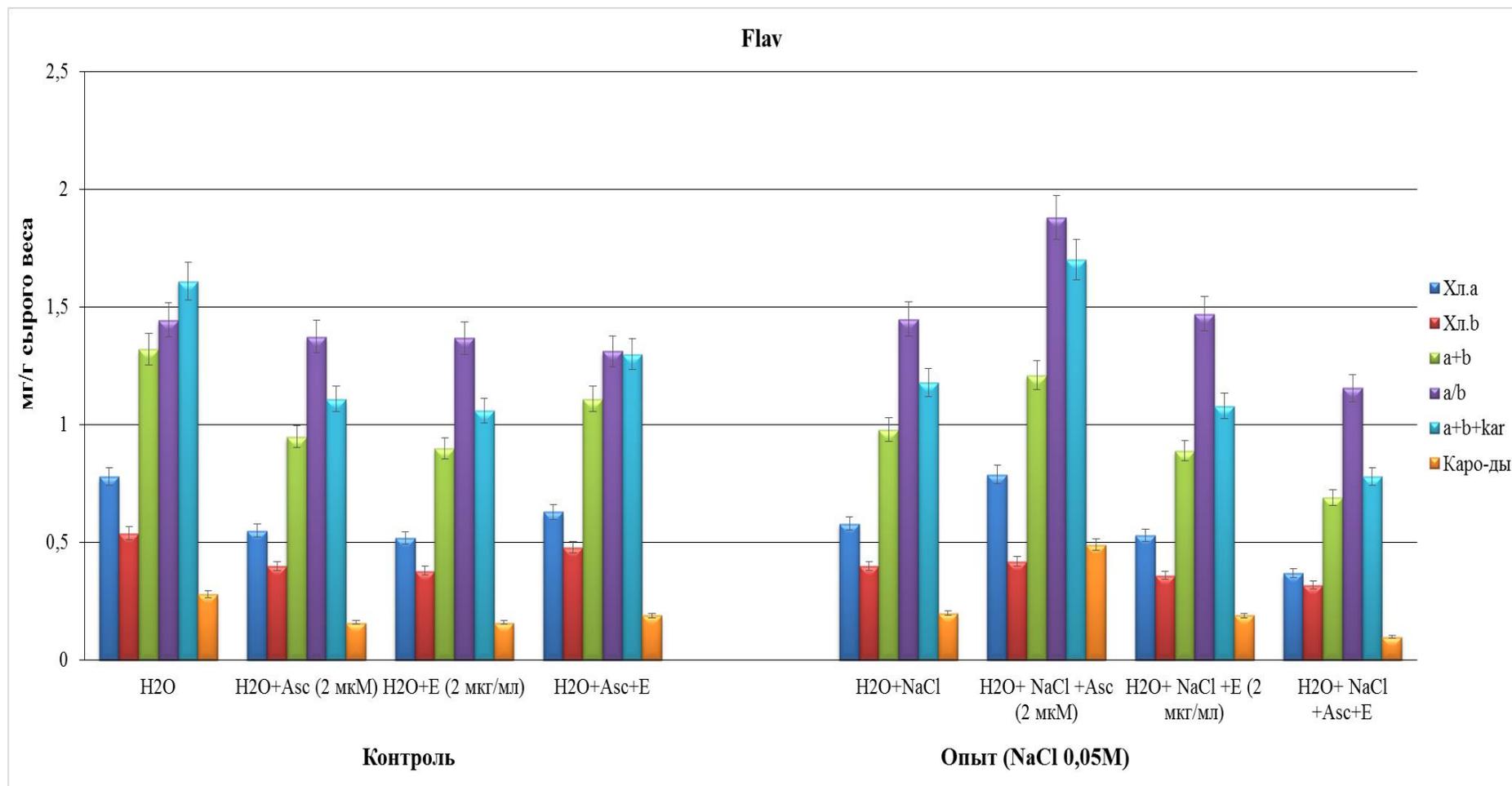
**Рисунок 10. - Содержание пластидных пигментов при воздействии солевого стресса и экзогенных антиоксидантов арабидопсиса дикого типа *En*.**



**Рисунок 11. - Содержание пигментов при воздействии NaCl и экзогенных антиоксидантов на мутант *clav*.**



**Рисунок 12. - Содержание пигментов при воздействии NaCl и экзогенных антиоксидантов на мутант *assi*.**



**Рисунок 13. - Содержание пигментов при воздействии NaCl и экзогенных антиоксидантов на мутант *flavi*.**

При изучении устойчивости и формирования адаптационного потенциала растений в неблагоприятных условиях важную роль играет понимание эндогенных приспособительных механизмов у растений, в частности функционирование фотосинтетического аппарата растений. Некоторыми работами показана универсальность защитной ответной реакции при воздействии стрессора, связанное с активностью белоксинтезирующей системы, который подразумевает сверхпродукцию и генерацию специфических белков или стрессовых белков. Одной из функций таких белков является непосредственное участие в формировании приспособительных механизмов.

Изучение действия факторов окружающей среды (засоление почв, засуха, недостаток элементов минерального питания, высокие или низкие температуры воздуха и патогены различной природы) на физиолого-биохимические параметры растений, в частности, на интенсивность фотосинтеза и фотосинтетический метаболизм, особенно в условиях негативного стрессорного воздействия позволяет более полно охарактеризовать закономерности механизмов устойчивости и формирования адаптационного потенциала растений в неблагоприятных условиях [111, 127].

### **3.3. Потенциальная интенсивность фотосинтеза и фотосинтетический метаболизм углерода у растений арабидопсиса в условиях стресса**

Некоторыми исследованиями показано, что потенциальная интенсивность фотосинтеза и распределение продуктов фотосинтетического метаболизма углерода в листьях четырёх видов бобовых растений в фазе цветения в условиях хлоридного засоления и разных сортов мягкой пшеницы при почвенной засухи заметно меняется, и данное изменение связано с механизмом физиолого-биохимической адаптации растений [12, 52].

Многие параметры фотосинтетического метаболизма углерода генетически детерминированы и проявляются в любых условиях. Исследованиями показано, что под влиянием факторов среды изменяется направленность фотосинтетического метаболизма и соотношение продуктов фотосинтеза. Данные

параметры тесным образом связаны с общими физиологическим состоянием растения [12, 52].

В наших исследованиях, изучение потенциальной интенсивности фотосинтеза (ПИФ) у дикой формы (*En*) и мутантных линий (*ass*, *flavi* и *cla*) арабидопсиса в условиях водной среды и хлоридного засоления, обработанных экзогенными антиоксидантами - аскорбиновой кислотой (АК),  $\alpha$ -токоферолом (Е) и их комплексом, показало, что изменения ПИФ имеют разнонаправленный характер (табл.5).

**Таблица 5. - Влияние экзогенных антиоксидантов на изменение интенсивности потенциального фотосинтеза (ПИФ) в листьях дикой формы и разных линий мутантов арабидопсиса в условиях хлоридного засоления**

№ п/ п	Генотипы  Условия эксперимента	Дикая форма	Мутанты		
			<i>flavi</i>	<i>ass</i>	<i>cla</i>
ПИФ, мг $^{14}\text{CO}_2/\text{г}$ сухого в-ва*ч					
Контроль					
1.	H <sub>2</sub> O	56,0±5,7	84,0±8,7	135,0±12,5	76,0±7,9
2.	H <sub>2</sub> O+АК	57,0±5,6	102,0±11,1	175,0±17,8	120,0±12,9
3.	H <sub>2</sub> O+Е	79,0±8,8	68,0±7,8	77,0±8,8	54,0±5,7
4.	H <sub>2</sub> O+АК+Е	82,0±8,8	42,0±4,6	106,0±11,4	146,0±14,9
Опыт (0,05 MNaCl)					
1.	H <sub>2</sub> O+NaCl	82,0±8,9	52,0±5,6	24,0±2,3	94,0±9,5
2.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +АК	22,0±2,3	10,0±1,3	24,0±2,3	39,0±4,3
3.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +Е	15,0±1,6	21,0±2,3	38,0±4,3	39,0±4,0
4.	H <sub>2</sub> O+ NaCl + АК+Е	23,0±2,6	16,0±1,8	34,0±3,6	23,0±2,4

Максимальные показатели ПИФ выявлены у мутантной формы *ass* в условиях водной среды, а у мутанта *cla* в условиях хлоридного засоления, что составляет 135.0 и 94.0 мг<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/г сухого в-ва\*ч, соответственно. Установлено, что ПИФ преобладает у растений дикой формы арабидопсиса *En* и у мутантной формы *cla* в условиях хлоридного засоления, над растениями контрольного варианта. Обратная закономерность обнаружена у мутантных форм *flavi* и *ass*, в ходе исследования выявлено, что потенциальная интенсивность фотосинтеза у данных генотипов в условиях водной среды выше, чем у растений, в условиях хлоридного засоления.

При добавлении в среду выращивания экзогенных антиоксидантов ( $\alpha$ -токоферола и аскорбиновой кислоты) удалось выявить следующие закономерности: у дикой формы и мутанта *cla* максимальная ПИФ обнаружена у растений в условиях водной среды, обработанных экзогенными антиоксидантами в комплексе АК+Е, у мутантных линий *flavi* и *ass*, обработанных антиоксидантом АК. Необходимо отметить, что данные показатели значительно превосходят показатели контрольного варианта.

Как видно, из данных табл. 5 только у растений мутантных линий *ass*, в условия хлоридного засоления, обработанных Е и в комплексе АК+Е, обнаружили сравнительно высокую ПИФ по сравнению с другими растениями, не обработанными антиоксидантам, а также выявили что при добавлении в среду АК интенсивность ПИФ несколько выше и составляет 34,0 и 38,0 мг<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/г сухого в-ва\*ч соответственно.

Более того стимулирующий эффект на ПИФ в условиях водной среды у дикой формы наблюдали у растений, обработанных антиоксидантами АК и Е, как в отдельности, так и в комплексе АК+Е, что соответственно составило 57.0, 79.0 и 82.0 мг<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/г сухого в-ва\*ч. У мутантов *flavi* и *ass* стимулирующий эффект при данных условиях наблюдали у растений, обработанных антиоксидантом АК, а также у мутанта *cla*, обработанных комплексом АК+Е.

Стимулирующий эффект на ПИФ в условиях хлоридного засоления выявлен у мутантной линии арабидопсиса *ass*, обработанной антиоксидантами Е и в

комплексе АК+Е. У остальных исследованных объектов выявлен подавляющий эффект при добавлении в среду выращивания антиоксидантов.

Таким образом установлено, что у дикой формы и мутанта *cla* ПИФ в условиях хлоридного засоления преобладает над растениями контрольного варианта, а у мутантов *ass* и *flavi* обнаружена обратная картина, т.е. ПИФ у этих форм арабидопсиса в контрольном варианте преобладает над растениями опытного варианта, что указывает на то, что имеет место различие ответной реакции на стресс, которая зависит от генотипа растения.

Одним из индикаторов ответных реакций растений на стрессорное воздействие является фотосинтетическая ассимиляция  $\text{CO}_2$  и фотосинтетический метаболизм углерода. Данный процесс является обязательным компонентом продукционного процесса растений, который, в свою очередь, является необходимым для изучения механизмов адаптации и продуктивности растений, особенно в условиях стресса. Показано, что в условиях воздействия факторов среды изменяется направленность метаболизма углерода и соотношения фотосинтетических продуктов [12, 52].

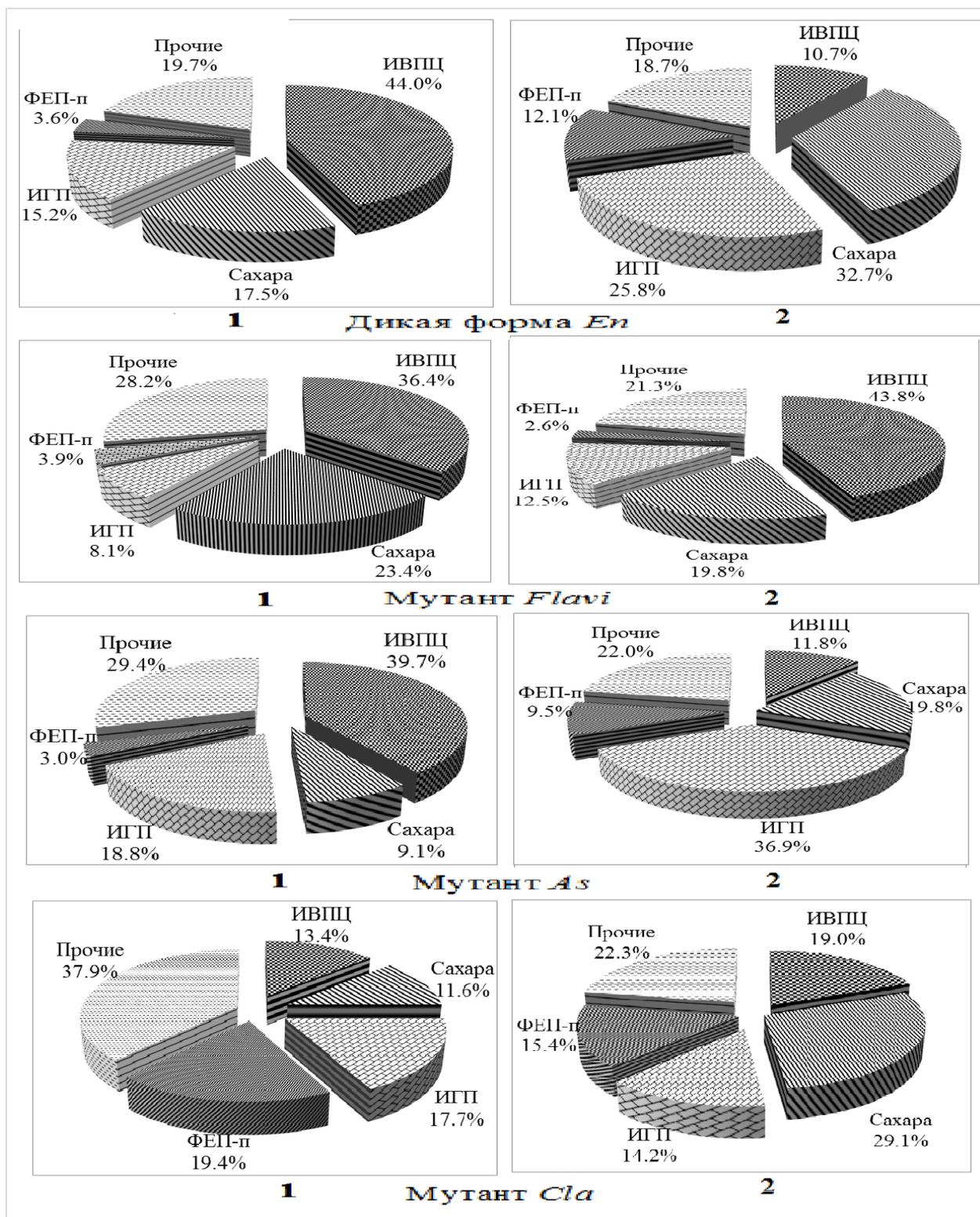
Исследования по распределению  $^{14}\text{C}$  среди продуктов фотосинтеза (табл.6) и суммы продуктов фотосинтетического метаболизма углерода в условиях хлоридного засоления у дикой формы и ряда мутантных линий арабидопсиса (рис.14) выявило, что у дикой формы *En* количество меченого углерода в условиях хлоридного засоления в составе сахаров, интермедиатов гликолатного пути (ИГП) и ФЭП-продукты преобладают по сравнению с растениями в условиях водной среды, и наоборот.

Так по количеству сосредоточения  $^{14}\text{C}$  в составе интермедиатов восстановительного пентозофосфатного цикла (ИВПЦ) наблюдается обратная картина. В условиях солевого стресса ИВПЦ падает на 33%. Включения  $^{14}\text{C}$  в состав сахаров в условиях засоления увеличивается почти вдвое.

**Таблица 6. - Распределение продуктов фотосинтеза (% от суммарной радиоактивности листьев) у дикой формы и мутантов арабидопсиса в фазе цветения в условиях хлоридного засоления: (1-контроль; 2- опыт- хлоридное засоление)**

Объект <sup>14</sup> C-соединения	Дикая форма		Мутанты					
	<i>En</i>		<i>flavi</i>		<i>ass</i>		<i>cla</i>	
	1-Н <sub>2</sub> O	2-NaCl						
Старт	17,6±0,88	10,8±0,5	26,3±1,3	19,4±1,2	27,3±2,2	13,4±0,7	15,3±1,2	14,1±0,7
ФГК+ФЭС	44,0±3,5	10,7±0,5	36,4±3,7	43,8±3,9	39,7±3,2	11,8±1,1	13,4±0,9	19,0±1,7
Сахароза	15,0±1,4	14,8±1,3	15,0±1,2	18,4±1,7	5,2±0,3	11,0±1,0	8,7±0,6	16,0±1,4
МС	2,5±0,1	17,9±1,8	8,4±0,8	1,4±0,1	3,9±0,4	8,8±1,1	2,9±0,2	13,1±1,3
Глицин	6,8±0,7	13,5±1,3	3,9±0,4	3,2±0,2	11,2±1,1	9,3±1,1	5,6±0,5	6,6±0,5
Серин	3,7±0,3	7,4±0,6	4,2±0,3	7,2±0,7		16,1±1,4	12,1±1,3	
Аланин	3,6±0,4	6,8±0,7	3,9±0,3	2,6±0,4	1,3±0,3	9,5±1,2	12,6±1,4	15,4±1,5
Глицерат	-	5,3±0,7	-	-	1,7±0,3	-	6,8±0,5	-
Гликолат	4,7±0,5	4,9±0,4	-	2,1±0,3	7,6±0,5	11,5±1,2	-	7,6±0,5
Линия фронта	2,1±0,4	7,9±0,5	2,1±0,2	1,9±0,3	2,1±0,4	8,6±0,7	22,6±2,1	8,2±0,9

Примечание: ФГК-фосфоглицериновая кислота; ФЭС-фосфорно-эфирные сахара.



**Рисунок 14. - Сумма продуктов фотосинтетического метаболизма  $^{14}\text{C}$  (% от суммарной радиоактивности листьев) у дикой формы и разных мутантов арабидопсиса в фазе цветения в условиях хлоридного засоления: 1- контроль; 2- опыт- хлоридное засоление.**

Обозначения: ИВПЦ-сумма интермедиатов восстановительного пентозофосфатного цикла; ИГП-сумма интермедиатов гликолатного пути; ФЕП-продукты - сумма продуктов ФЕП-карбоксилирования

У мутанта *flavi* в условиях хлоридного засоления наблюдается стимуляция включения меченого углерода в ИВПЦ и суммы интермедиатов гликолатного пути (ИГП) по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды, а по скорости включения  $^{14}\text{C}$  состав сахаров и ФЕП-продуктов наблюдается обратная картина, т.е. подавление накопления  $^{14}\text{C}$  в состав сахаров и ФЕП-продуктов растений, адаптированных в условиях хлоридного засоления, по сравнению с растениями в условиях водной среды.

У мутанта *cla* более чем в 2 раза происходит сосредоточение  $^{14}\text{C}$  углерода в составе сахаров и небольшое увеличение в составе ИГП и ФЭП продуктов в условиях хлоридного засоления, т.е. в условиях водной среды накапливается меньше продуктов, что составляет около 25%.

У мутанта *ass* в условиях хлоридного засоления наблюдается стимуляция включения меченого углерода в состав сахаров, ИГП и ФЕП-продуктов в 2 - 3 раза больше по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды, а по накоплению меченого углерода в ИВПЦ у растений, адаптированных в водной среде наблюдается обратная картина, т.е. почти в 3 раза больше сосредотачивается продуктов по сравнению с растениями в условиях хлоридного засоления.

У данного мутанта в условиях хлоридного засоления при обработке растений антиоксидантом Е скорость включения  $^{14}\text{C}$  в ИВПЦ по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды и обработанными этим антиоксидантом повышается, однако в составе других выявленных соединений - уменьшается. При обработке мутанта *ass* комплексом антиоксидантов АК+Е в условиях засоления количество включения  $^{14}\text{C}$  в состав суммы продуктов ИВПЦ и сахаров по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды увеличивается более чем в 2 раза (табл.7).

Изучение фотосинтетического метаболизма углерода у мутантной линии арабидопсиса *ass*, обработанной антиоксидантами, а именно АК и  $\alpha$ -токоферолом - Е, как в отдельности, так и в комплексе показало, что в условиях хлоридного засоления при обработке растений антиоксидантом Е скорость включения  $^{14}\text{C}$  в

ИВПЦ по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды и обработанными этим же антиоксидантом повышается, но обнаруживаются количественные изменения в составе продуктов фотосинтеза.

В таблице 8 суммированы результаты анализа продуктов ФЭП у изученных генотипов в нормальных условиях (контроль) и в условиях стрессорного воздействия NaCl.

Сравнительный анализ выявил разнонаправленный характер распределения продуктов фотосинтеза у дикой формы и мутантных линий арабидопсиса. Проявившееся многообразие фотосинтетического метаболизма  $^{14}\text{C}$  - углерода и его связь с другими метаболическими процессами наводят на мысль о существовании пути регуляции общей биохимической адаптации растений в различных стрессовых условиях среды.

Так, данные табл. 8 указывают на различия по накоплению фосфоэнолпирувата у мутантных линий и дикой формы арабидопсиса. У контрольного варианта при стрессе содержание ФЭП повышается на 336%. У мутанта *flavi* только на 57%, у мутанта *ass* также как и у *flavi* высокие показатели – 317%, а у мутанта *cla* – 79%.

На основании этих данных можно заключить, что: а) повышение сосредоточения  $^{14}\text{C}$  - углерода в ФЭП у контрольного варианта и мутанта *ass* указывает на то, что у этих генотипов под влиянием засоления происходит стимулирование реакции ФЭП - карбоксилирования; б) у мутантов *flavi* и *cla*, очевидно, интенсивность реакций превращения ФЭП – ФГК снижена за счёт уменьшения активности ферментов ФЭП- и РБФ- карбоксилазы; в) высокий уровень ФЭП и ФГК наблюдается у мутантов *ass*, который сопровождается более высоким уровнем фотосинтеза, чем у других генотипов арабидопсиса.

Следует также отметить, что метаболизация продуктов  $^{14}\text{C}$  - углерода происходила менее интенсивно в контрольном варианте, чем при засолении. Такое явление наблюдается не у всех линий арабидопсиса (рис.14). Сумма интермедиатов гликолатного цикла (ИГП) не одинакова в условиях засоления. Наибольшее накопление ИГП обнаружено у мутанта *ass* около 37%, а наиболее

низкое у мутанта *cla* – около 14%. Добавление в среду культивирования антиоксидантов аскорбиновой кислоты (АК) и  $\alpha$  – токоферола (Е) снижает процент ингибирования продуктов фотосинтеза у мутанта *cla*, особенно в варианте воздействия комплекса АК+Е у мутантной линии *ass*.

**Таблица 7. - Влияние экзогенных антиоксидантов на распределение продуктов фотосинтеза и сумму продуктов фотосинтетического метаболизма  $^{14}\text{C}$  в листьях арабидопсиса мутанта *ass* в условиях хлоридного засоления (% от суммарной радиоактивности)**

Генотип $^{14}\text{C}$ -соединение	Мутант <i>ass</i>					
	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaCl}$	$\text{H}_2\text{O}+\text{E}$	$\text{NaCl}+\text{E}$	$\text{H}_2\text{O}+\text{АК}+\text{Е}$	$\text{NaCl}+\text{АК}+\text{Е}$
Старт	27,3	13,4	25,0	38,2	9,1	18,5
ФГК+ФЭС	39,7	11,8	21,6	25,1	14,0	34,4
Сахароза	5,2	11,0	20,0	16,0	10,9	15,3
МС	3,9	8,8	5,5	7,2	8,4	24,3
Глицин	11,2	9,3	14,7	11,5	7,6	-
Серин		16,1	6,7	1,5	11,8	
Аланин	1,3	9,5	4,4	0,3	11,7	1,0
Глицерат	1,7	-			9,1	
Гликолат	7,6	11,5			9,4	3,4
Линия фронта	2,1	8,6	2,0	0,2	8,0	3,1
Сумма продуктов фотосинтетического метаболизма $^{14}\text{C}$						
$\Sigma$ ИВПЦ	39,7	11,8	21,7	25,1	14,0	34,4
$\Sigma$ Сахаров	9,1	19,8	25,5	23,2	19,3	39,6
$\Sigma$ ИГКП	18,8	36,9	21,4	13,0	28,8	1,0
ФЭП-продукты	3,0	9,5	4,4	0,3	20,8	3,4
Прочие соединения	29,4	22,0	27,0	38,4	17,1	21,6

**Таблица 8. – Сумма продуктов ФЭП у различных генотипов арабидопсиса в условиях солевого стресса**

	Содержание ФЭП, %			
		Контроль	NaCl	% от контроля
1.	Дикая форма <i>En</i>	3,6	12,1	336
2.	Мутант <i>flavi</i>	3,9	2,6	67
3.	Мутант <i>ass</i>	3,0	9,5	317
4.	Мутант <i>cla</i>	19,4	15,4	79

Накопление других продуктов фотосинтеза имеет разнонаправленный характер, что указывает на то, что у некоторых генотипов (мутанты *flavi* и *cla*) имеет место ингибирование или усиление (мутанты *ass*) экспрессии генов фотосинтеза и фотодыхания. Данный вывод подтверждается различием характера повышения ФЭП-карбоксилазной (по накоплению ФЭП) и РБФ-карбоксилазной (по накоплению ФГК) активностей.

На основании проведённых исследований и анализе распределения продуктов метаболизма углерода удалось обнаружить изменения в характере накопления гликолата через инициацию ФЭП и ФЭС обычного пути карбоксилирования  $^{14}\text{C}$  - углерода у изученных генотипов.

Таким образом, изучение ПИФ и суммы продуктов фотосинтетического метаболизма углерода у дикой формы (*En*) и мутантных линий (*ass*, *flavi* и *cla*) арабидопсиса в условиях хлоридного засоления выявило изменения биохимических параметров, но в разной степени, что может свидетельствовать о различной адаптационной способности в условиях солевого стресса.

## ГЛАВА IV. ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АДАПТАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

### 4.1. Воздействие экзогенных антиоксидантов на содержание эндогенной аскорбиновой кислоты в растениях арабидопсиса приконтрастных условиях среды

Как известно, «стрессорные факторы окружающей среды способствуют сверхпродукции активных форм кислорода (АФК), провоцирующих развитие окислительного стресса в клетках растений. В обезвреживании клетки от АФК, наряду с антиокислительными ферментами и другими компонентами белковой природы участвует группа не ферментативных антиоксидантов. Особая роль в этой группе принадлежит аскорбиновой кислоте (АК) и  $\alpha$ -токоферолу (Е)» [197, 31].

Аскорбиновая кислота содержится во всех компартментах клеток различных тканей растений, но наибольшее её количество локализовано в хлоропластах и цитозоле клеток листа [47]. Известно, что оксидоредуктазы, локализованные во всех органелах клетки участвуют в окислении АК, что приводит к изменению редокс-статуса растений. АК может выступать как антиоксидант и как сигнально-регуляторный агент в клетках высших растений. Антиоксидантные свойства, главным образом, связаны с детоксикацией  $H_2O_2$  и других активных форм кислорода (АФК). В аскорбат-глутатионовом цикле Фойер-Холливела-Асады перекись водорода восстанавливается аскорбатпероксидазой с образованием монодегидроаскорбат-анионного радикала, восстанавливающегося при окислении глутатиона [9]. Как было сказано ранее, АК может выполнять роль кофактора, участвующего в регенерации токоферола – одного из основных протекторов клеточных мембран от окислительного стресса и способствующего сохранению ионного гомеостаза клеток [171].

Роль токоферолов состоит во взаимодействии с перекисными радикалами липидов и торможении процессов перекисного окисления (ПОЛ).

«В некоторых работах показано, что в условиях стрессорного воздействия в хлоропластах растений арабидопсиса окисленная форма токоферола восстанавливается до  $\alpha$ -токоферола, что обеспечивает его постоянство в клетках» [121]. Существуют работы, в которых показано, что обработка семян пшеницы  $\alpha$ -токоферолом и АК до воздействия стресса и в период вегетации растений замедляет интенсивность ПОЛ [179].

Было изучено влияние экзогенной аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола на уровень содержания эндогенной аскорбиновой кислоты, синтезируемой растениями как в норме, так и в условиях хлоридного засоления, что имеет важное значение для решения проблем регуляции механизмов устойчивости при стрессорном воздействии.

Результаты определения содержания аскорбиновой кислоты (АК) в листьях 4-х генотипов растений арабидопсиса показали, что пул АК в листьях растений контрольного варианта неодинаков (табл. 5). У дикого типа арабидопсиса *En* и мутанта *ass* наблюдались более высокие показатели содержания АК, чем у мутантов *cla* и *flavi* ( $P < 0.05$ ). Добавление в водную среду NaCl привело к уменьшению содержания АК у дикого типа *En* и мутанта *ass* (на 10 и 37%) и к значительному увеличению у мутантов *cla* и *flavi* (в 3 и 7 раз, соответственно). По содержанию АК исследованные генотипы арабидопсиса можно условно разделить на две группы. Первая группа – дикий тип *En* и мутант *ass*, которые характеризовались высоким содержанием АК в контроле, а при добавлении в среду NaCl наблюдалось снижение пула АК на 10-37%. Вторая группа – мутанты *cla* и *flavi*, имела более низкий пул АК в контроле, который возрастал при добавлении в среду NaCl.

Имеются многочисленные данные, как об увеличении, так и об уменьшении уровня восстановленной АК в ответ на стрессовое воздействие [10]. В наших исследованиях, по всей видимости, у растений первой группы имеется больший пул аскорбатпероксидазы (АПО), чем у растений 2-й группы, и за счёт увеличения активности фермента АПО в условиях засоления снижается уровень АК в листьях. Аналогичные результаты были получены в работе [38]. Увеличение

уровня восстановленной АК у растений 2-ой группы может быть связано с подавлением активности АПО у этих генотипов в стрессовых условиях.

В пользу такого предположения служат данные о наличии обратной зависимости между содержанием уровня восстановленной АК и активностью АПО [1], а также данные о снижении активности АПО и увеличении активности глутатионредуктазы (ГР) впервые 24 ч воздействия хлоридного засоления [10].

Наши исследования показали, что добавление экзогенной АК привело к снижению накопления эндогенной АК как у дикого типа, так и у мутанта *ass* на 60 и 45%, соответственно в условиях водной среды. При добавлении в среду NaCl и экзогенной АК у растений арабидопсиса дикого типа уровень АК не изменился, а у мутанта *ass* – уровень АК увеличился на 18%. Во второй группе растений (*flavi, cla*) добавление в среду АК привело к увеличению экзогенной АК в контроле, тогда как в условиях хлоридного засоления этот показатель снизился на 42-47% (табл.9). Следовательно в этих условиях происходит подавление активности АПО растений второй группы. Этот вывод получил подтверждение при добавлении в среду культивирования витамина Е.

При добавлении витамина Е и комплекса АК+Е, в этих условиях (засоление), содержание эндогенной АК в листьях растений арабидопсиса дикого типа *En* снижается на 38% в условиях водной среды. В среде с NaCl добавление Е и комплекса АК+Е приводит к уменьшению экзогенной аскорбиновой кислоты (АК) в листьях на 49-50%, соответственно относительно контроля, но пул АК остаётся ниже, чем при отсутствии экзогенных антиоксидантов.

У мутанта *flavi* в условиях водной среды наблюдалось увеличение содержания АК на 40% при добавлении витамина Е и почти в 7 раз при использовании комплекса АК+Е. В условиях хлоридного засоления содержание АК у этого мутанта уменьшилось в 3 раза при внесении экзогенного Е, а при добавлении комплекса АК+Е – в 1.6 раза, что свидетельствует о возможной активации АПО у данного мутанта.

У мутанта *ass* без NaCl содержание АК в листьях при добавлении Е увеличивалось в 1.6 раза, а при использовании комплекса АК+Е было на 34%

ниже, чем в условиях без использования АК. В условиях засоления экзогенный Е не повлиял на содержание АК, а использование комплекса АК+Е увеличило её содержание в 3 раза.

**Таблица 9. - Влияние экзогенных антиоксидантов на содержание аскорбиновой кислоты у различных генотипов арабидопсиса в условиях хлоридного засоления**

Варианты опыта	Содержание аскорбиновой кислоты, мкг/г сыр.массы листа			
	<i>En</i>	<i>flavi</i>	<i>ass</i>	<i>cla</i>
Контроль				
H <sub>2</sub> O	18,23±1,36	10,59±0,34	16,61±0,23	7,18±0,72
H <sub>2</sub> O+АК	7,23±0,16	41,59±0,37	9,00±0,22	134,31±2,35
H <sub>2</sub> O+Е	11,32±0,04	6,32±0,17	23,20±1,98	78,18±1,31
H <sub>2</sub> O+АК+Е	11,92±1,60	46,13±2,52	10,91±0,79	15,55±1,37
Опыт (0,05 М NaCl)				
H <sub>2</sub> O+NaCl	16,27±1,19	41,33±0,11	10,32±0,90	20,94±0,25
H <sub>2</sub> O+ NaCl +АК	7,16±0,09	21,53±0,56	12,17±0,47	12,05±0,04
H <sub>2</sub> O+ NaCl +Е	8,25±0,29	13,34±0,73	10,43±0,90	62,48±0,35
H <sub>2</sub> O+NaCl+ АК+Е	8,12±0,69	24,62±0,31	32,43±1,46	88,81±3,60

У мутанта *cla* в условиях водной среды содержание аскорбиновой кислоты возросло при добавлении витаминаЕ и комплекса АК+Е (в 10 раз и 2 раза, соответственно). В условиях хлоридного засоления при использовании Е и комплекса АК+Е также наблюдалось увеличение экзогенной АК в 3 - 4 раза. Следовательно, у этого мутанта имеет место подавление активности АПО, что, по всей видимости связано с ингибированием экспрессии гена, ответственного за синтез АПО.

Таким образом, в результате исследований было выявлено, что при воздействии экзогенных антиоксидантов содержание АК у дикой расы *En* уменьшается, а у мутантных линий наблюдается разнонаправленный характер накопления эндогенной АК в условиях стрессорного воздействия. Можно заключить, что влияние экзогенных антиоксидантов различается и зависит от генотипа растений. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессах детоксикации АФК у различных генотипов арабидопсиса, наряду с различными антиоксидантами, в условиях солевого стресса принимают участие АК и токоферолы. Можно предположить, что увеличение содержания АК у мутантных линий, связано с дефектом экспрессии генов, ответственных за синтез АПО, который и приводит к снижению активности данного фермента.

#### **4.2. Активация процессов перекисного окисления липидов у растений арабидопсиса в условиях засоления**

Разрушающему действию окислительного стресса в клетках растений в первую очередь подвергаются клеточные мембраны, в которых протекают процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). В результате ПОЛ образуется токсический компонент - малоновый диальдегид (МДА), по содержанию которого можно определить степень повреждения клетки. Логично изучить ПОЛ у растений арабидопсиса и провести сравнительный анализ содержания МДА в норме и при стрессорном воздействии, а также изучить участие аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола в процессах ПОЛ у дикой и мутантных форм арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh.*) в условиях хлоридного засоления.

Результаты анализа реакции аскорбиновой кислоты (АК) и  $\alpha$ -токоферола (Е) в процессах перекисного окисления липидов у дикой и мутантных форм арабидопсиса в условиях хлоридного засоления представлены на рисунках 15-18.

Как видно из рис.15, у дикой формы арабидопсиса *En* в условиях водной среды (контроль) наблюдается незначительное накопление МДА. При добавлении аскорбиновой кислоты (АК) и  $\alpha$ -токоферола (Е), а также комплекса АК+Е наблюдается заметное изменение содержания МДА.

При добавлении АК содержание МДА уменьшается на 42% от контроля, при добавлении Е, процент ингибирования МДА уменьшается до 57%.

При применении комплекса АК+Е также наблюдается уменьшение содержания МДА. В условиях солевого стресса (рис. 1), уровень МДА увеличивается почти в 2 раза от контроля (без NaCl), при добавлении АК и Е по отдельности содержание МДА продолжало повышаться, а действие комплекса АК+Е ингибировало процессы ПОЛ в два раза по сравнению с контролем.

У мутантной формы арабидопсиса *cla* (рис. 16) влияние АК и Е кардинально различалось от дикой формы. В контроле имело место снижение уровня накопления МДА при добавлении экзогенных антиоксидантов, как по отдельности, так и в комплексе. В условиях NaCl при добавлении АК содержание МДА уменьшается более чем на 33% по сравнению с контролем (без NaCl). Добавление АК и Е, а также комплекса АК+Е не оказывало значительного влияния на содержание МДА.

У мутантной формы *ass* (рис. 17) наблюдается аналогичная картина по влиянию экзогенных антиоксидантов на содержание МДА как в контроле, так и в условиях NaCl сходна с мутантами *cla*.

У мутанта *flavi* (рис. 18) наблюдается совершенно иная картина, чем у вышеперечисленных мутантов.

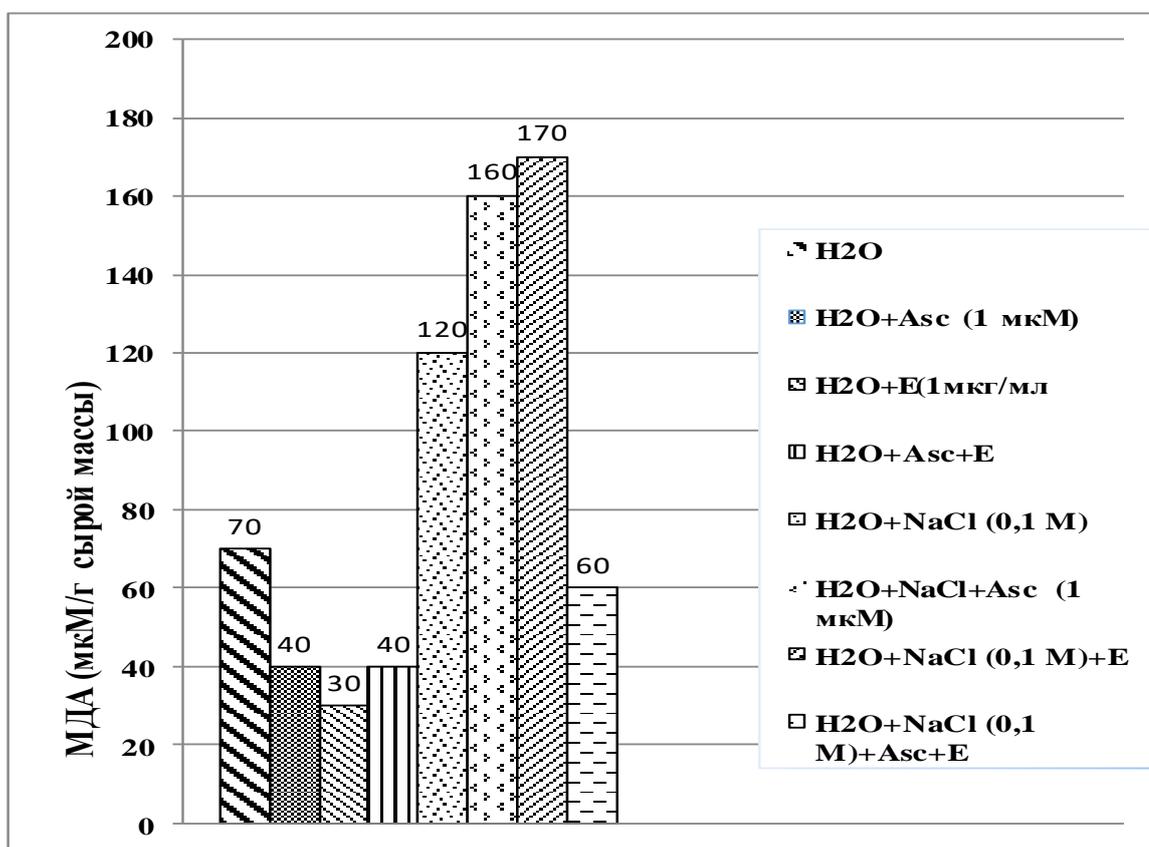
В ходе исследования выявлено, что у мутанта *flavi* уровень ПОЛ в контроле незначительный, а добавление экзогенных антиоксидантов плавно уменьшает содержание МДА. Содержание МДА резко возрастает при засолении почти в 3 раза.

Добавление АК не тормозит процессы ПОЛ, а Е уменьшает содержание МДА на более чем 50%. Комплексное добавление АК+Е также тормозит ПОЛ при засолении, что по всей вероятности происходит за счет синергизма двух компонентов АК и Е.

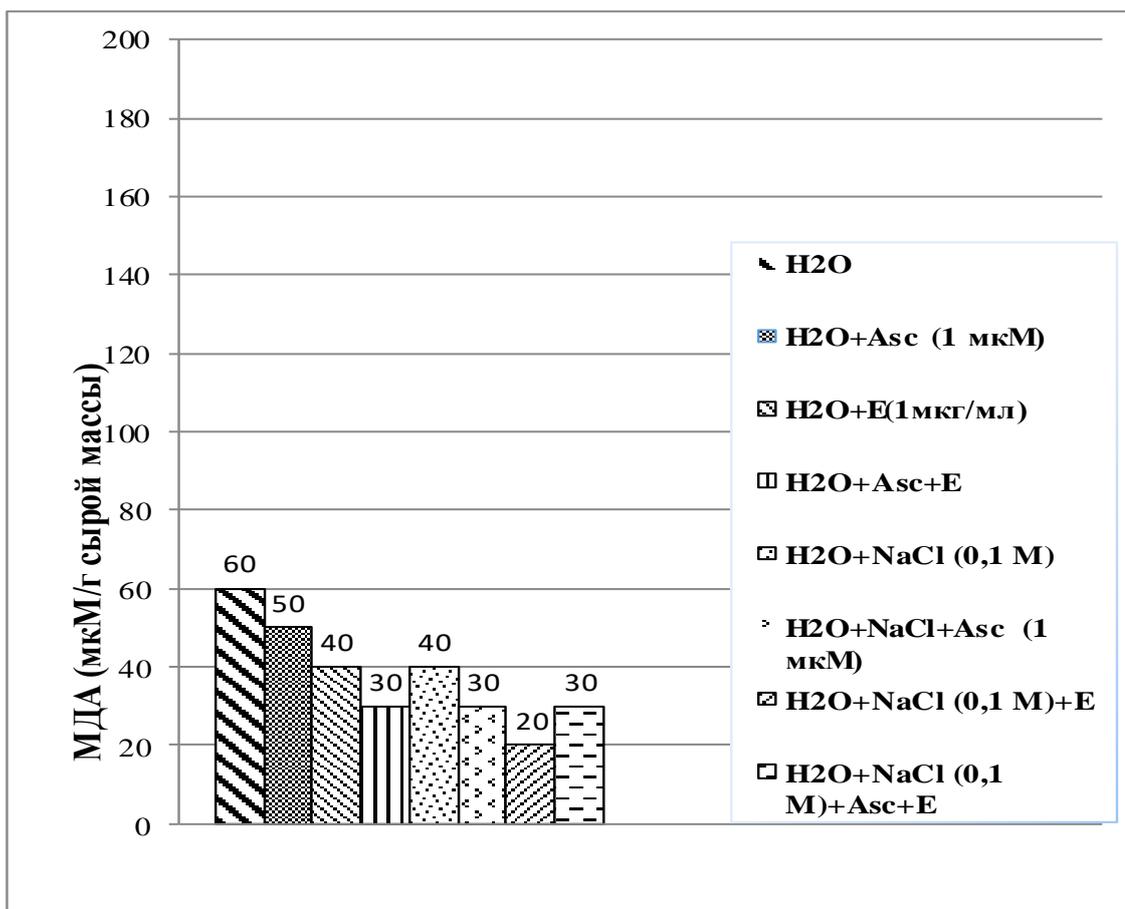
Известно, что некоторые вещества в зависимости от концентрации и условий среды могут вести себя как антиоксиданты или прооксиданты, т.е. являются компонентами, облегчающими процессы ПОЛ.

Наши исследования показали, что изученные экзогенные антиоксиданты имели различное влияние на накопление МДА. Аскорбиновая кислота действовала как прооксидант, т.е. облегчала реакции окисления, а  $\alpha$ -токоферол резко ингибировал процессы перекисного окисления липидов.

В варианте использования как аскорбиновой кислоты, так и  $\alpha$ -токоферола (АК+Е) наблюдалось плавное уменьшение содержания МДА, что по всей вероятности указывает на участие АК в восстановлении  $\alpha$ -токоферола.



**Рисунок 15. - Влияние хлоридного засоления на содержание МДА у дикой формы арабидопсиса *Ep* в зависимости от содержания экзогенных антиокислителей.**



**Рисунок 16. - Влияние хлоридного засоления на изменение содержания МДА у мутанта арабидопсиса *cla* в зависимости от содержания экзогенных антиоксидантов.**

Резюмируя полученные данные можно заключить, что влияние экзогенных антиоксидантов, как по отдельности, так и в комплексе у изученных объектов имеет разнонаправленный характер, о чём свидетельствуют различия ответных реакций дикой формы и мутантов на солевой стресс.

Данное заключение подтверждается и наличием положительной корреляции (рис.19) между уровнем восстановленной АК и содержанием МДА у генотипов арабидопсиса, так как выявлено, что аскорбиновая кислота прямо или косвенно ингибирует ПОЛ и участвует в защите компонентов самой антиоксидантной системы.

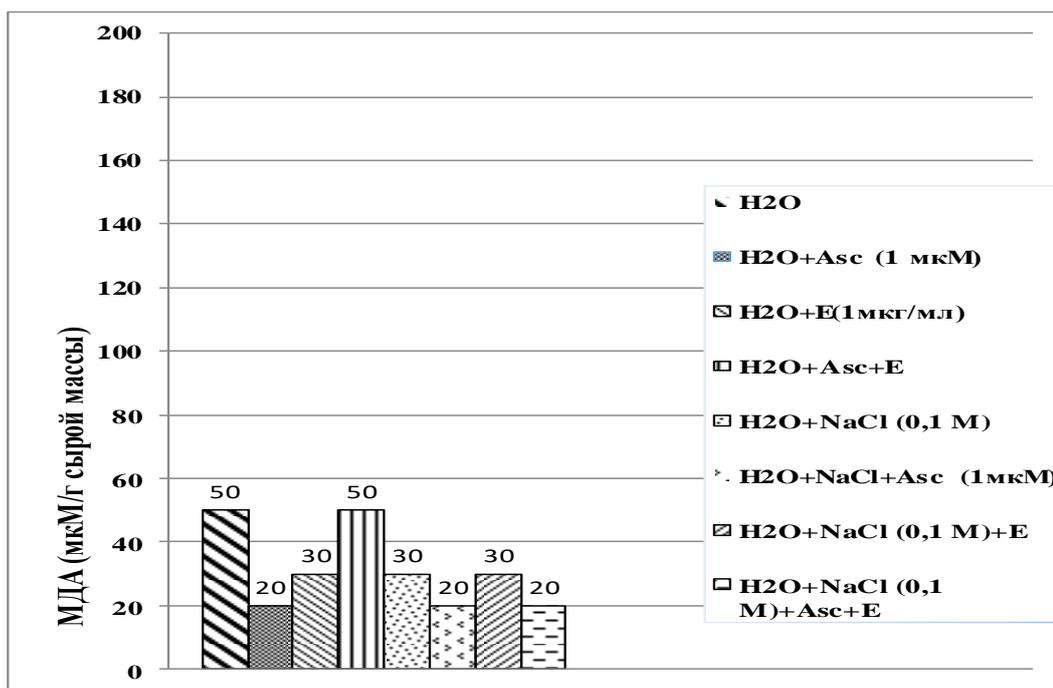


Рисунок 17. - Влияние хлоридного засоления на содержание МДА у мутанта арабидопсиса *ass* в зависимости от содержания экзогенных антиоксидантов.

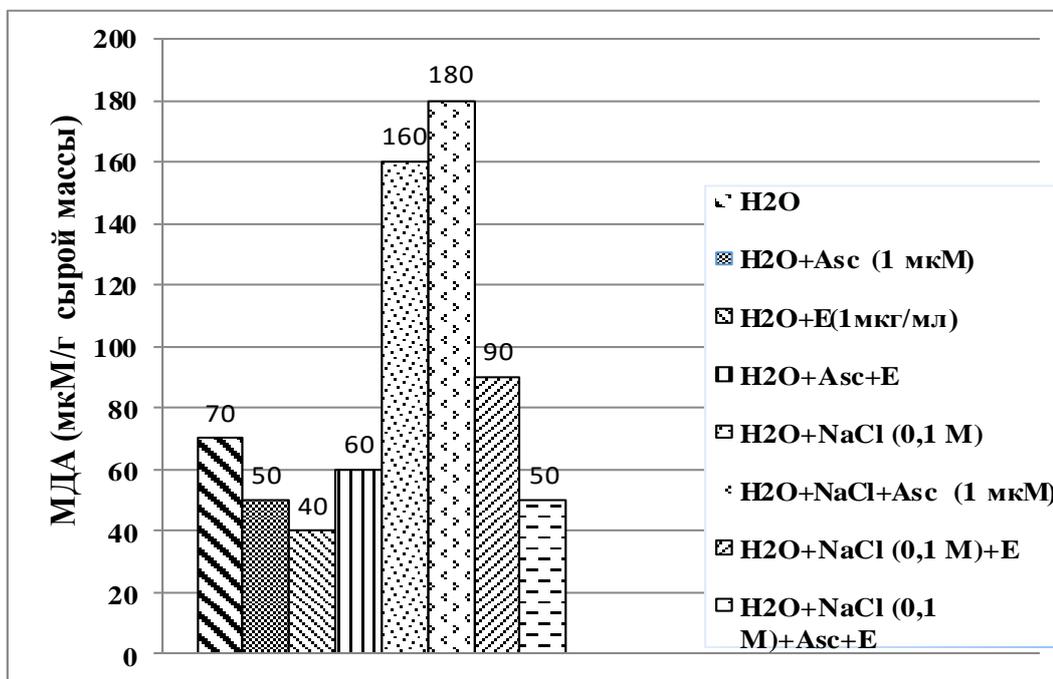
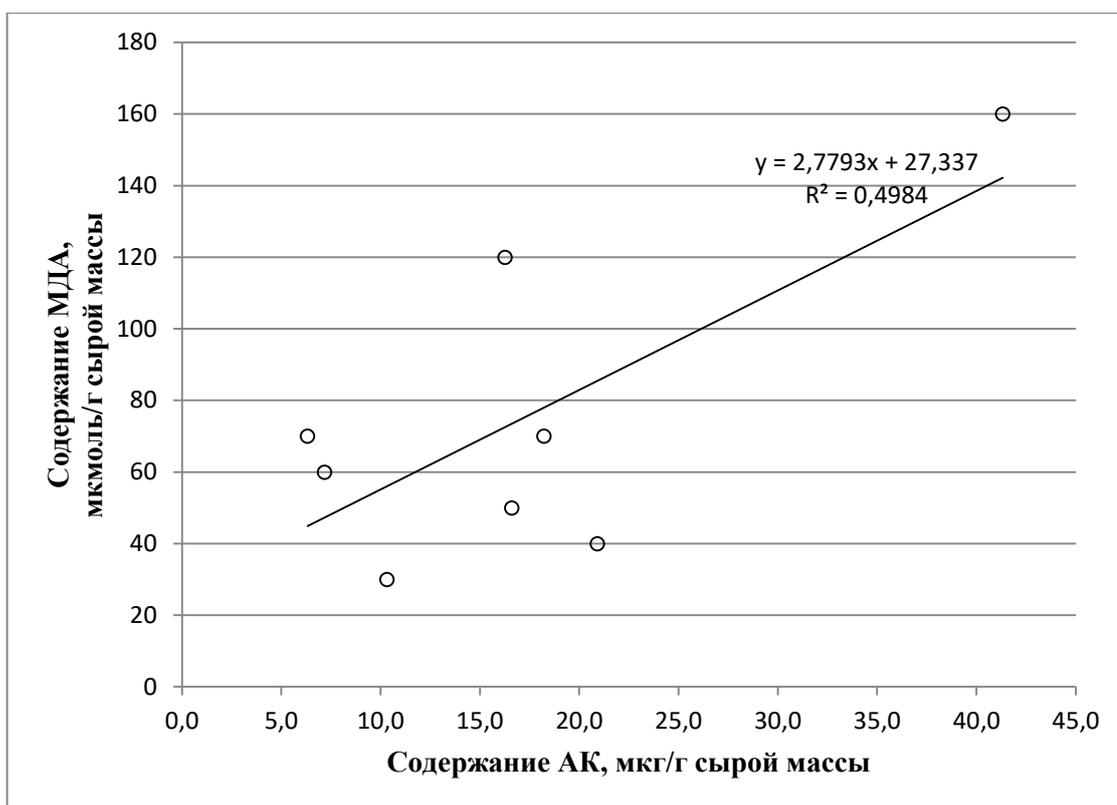


Рисунок 18. - Влияние хлоридного засоления на содержание МДА у мутанта арабидопсиса *flavi* в зависимости от содержания экзогенных антиоксидантов.



**Рисунок 19. - Зависимость содержания МДА от уровня эндогенной АК у различных генотипов арабидопсиса.**

Таким образом, изучение влияния экзогенных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и  $\alpha$ -токоферол на ингибирование процессов ПОЛ выявило разнонаправленный характер механизмов устойчивости при стрессорном воздействии повышенных концентраций NaCl, использование аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола как по отдельности, так и в комплексе в условиях хлоридного засоления оказывает не одинаковую защитную роль от АФК, и данные экзогенные антиоксиданты могут участвовать в процессах регуляции механизмов устойчивости при воздействии стрессоров.

#### **4.3. Активность антиоксидантных ферментов СОД и каталазы у различных генотипов *Arabidopsis thaliana* в условиях засоления**

«Известно, что антиокислительные или антиоксидантные системы, которые отвечают за защиту клетки от окислительного повреждения разнообразны. Для

обеспечения наиболее эффективной защиты эти ферменты компартиментализованы в разных субклеточных органеллах» [11].

«Например, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) содержатся не только в цитозоле, но и в других органеллах клетки (митохондриях, хлоропластах), где образуется большинство свободных радикалов» [21,11, 43]. «Растения содержат разные формы СОД и неодинаково реагируют на разного рода стрессорные воздействия (засуха и засоление), это зависит от их локализации в разных компартментах клетки, таких как хлоропласты, митохондрии и цитозоль. СОД также различается по содержанию металла в активном центре фермента. Например, хлоропластная СОД представлена в форме  $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ -СОД; в цитоплазме в форме –  $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ -СОД, а в митохондрии в форме  $-\text{Mn}^{++}$ -СОД. В механизме их действия лежит процесс окисления-восстановления металлов» [11, 41,43]. Действие стрессорных факторов приводит к образованию в клетках активных форм кислорода (АФК) или оксидантов. «Защитные механизмы от вредного воздействия АФК состоят из различных компонентов. К ним относятся ферменты, фенольные и низкомолекулярные соединения, а также ферментативные антиоксиданты (АО), такие как аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион, каротиноиды, токоферолы, флавоноиды, сахара и многие другие» [109, 26,46,11, 49, 50].

Результаты анализа влияния аскорбиновой кислоты (АК) и  $\alpha$ -токоферола (Е) на активность супероксиддисмутазы (СОД) у дикой и мутантных форм арабидопсиса в условиях водной среды и хлоридного засоления представлены на рисунке 20-22.

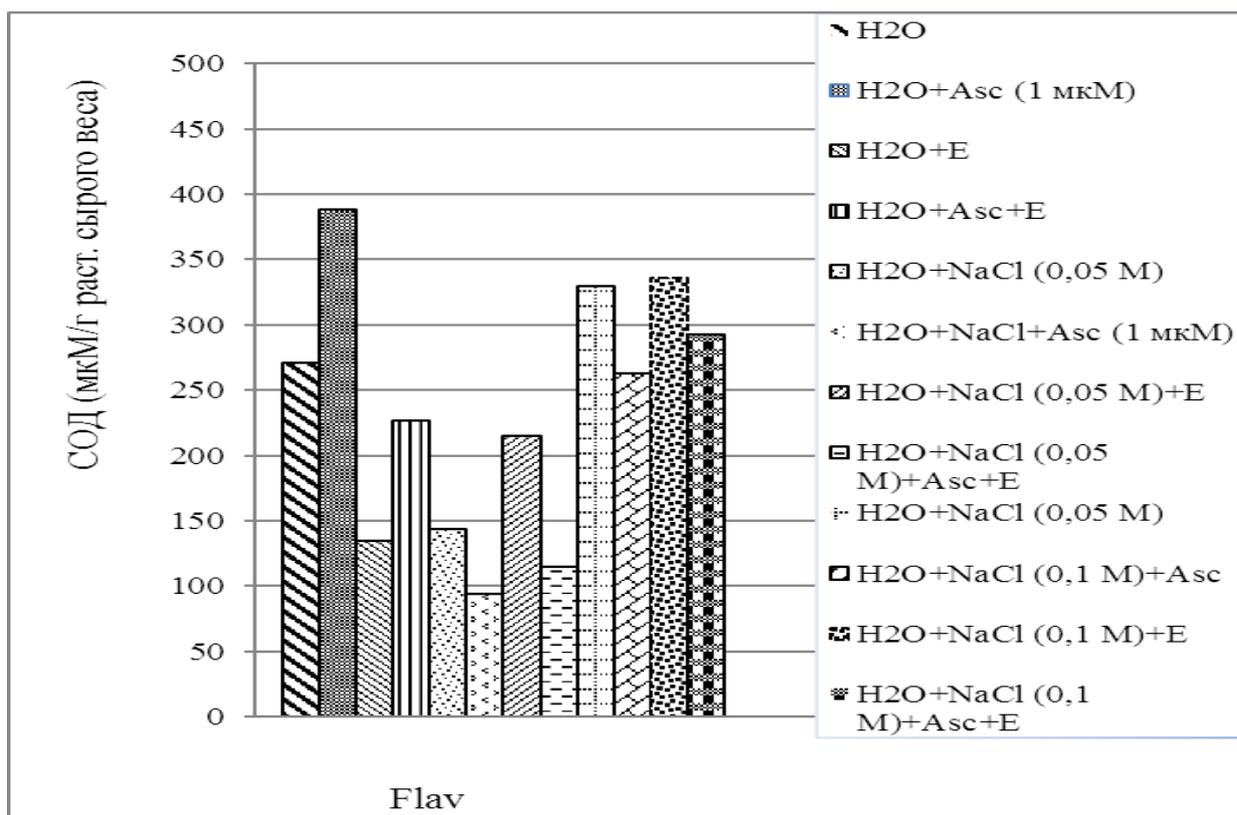
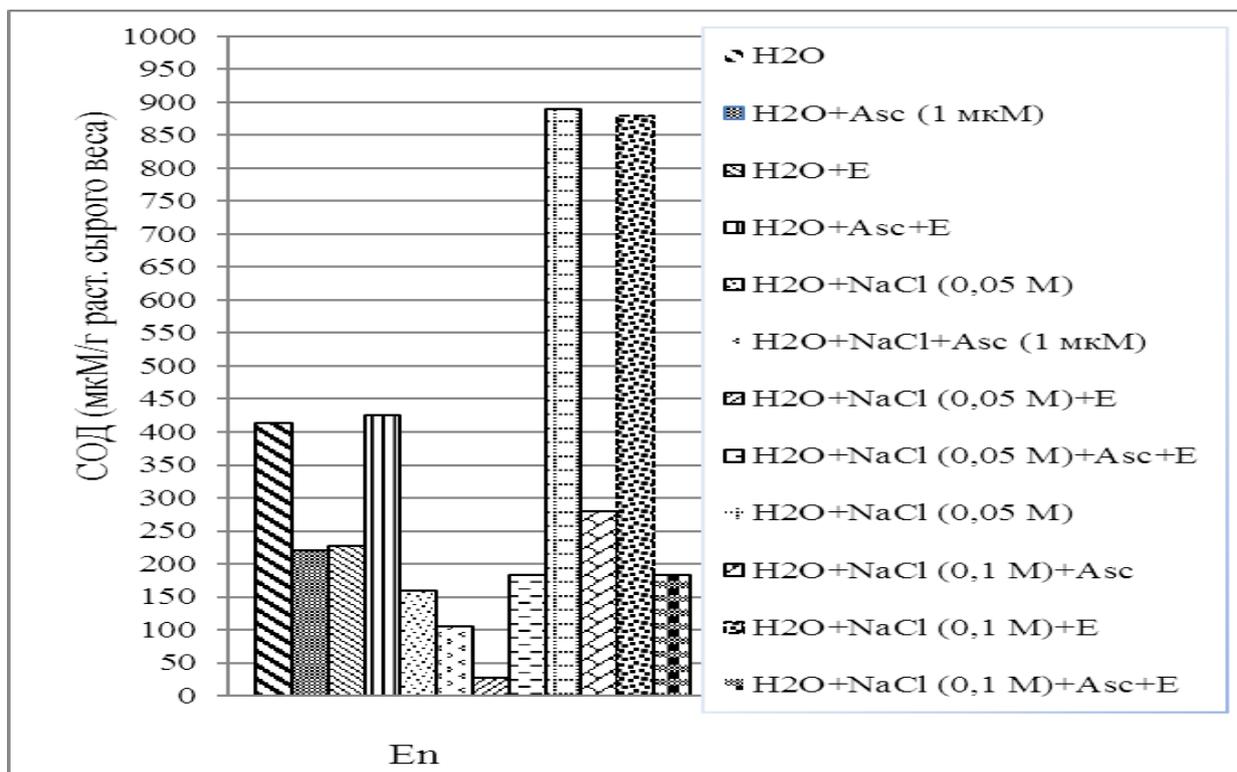
Как видно из рис.20, у дикой формы арабидопсиса *En* в условиях водной среды (контроль) наблюдается повышение активности супероксиддисмутазы. При добавлении АК и Е по отдельности активность СОД почти в 2 раза уменьшается. Однако в таких же условиях эксперимента при добавлении этих компонентов в комплексе АК+Е активность СОД по сравнению с контролем увеличивается несущественно. Почти такая же закономерность наблюдается в условиях хлоридного засоления при концентрации 0.05 М NaCl. В условиях повышенной

концентрации хлорида натрия (0.1 М), без экзогенных антиоксидантов по сравнению с растениями, выращенными в условиях хлоридного засоления, с добавлением антиоксидантов как по отдельности, так и в комплексе активность СОД увеличивалась, т.е. в случаях с добавлением экзогенных АК, и их комплекса АК + Е уменьшается очень резко почти в 7 раз, а в случае применения токоферола уменьшается несущественно, что указывает на косвенную роль этих антиоксидантов на активность СОД.

На рис. 21 представлены результаты изменения активности СОД у мутанта *flavi* в разных условиях водной среды и хлоридного засоления. Показано, что в контроле, т.е. в условиях водной среды активность СОД в зависимости от различных вариантов воздействия антиоксидантов (по отдельности или в комплексе) изменяется по-разному. Активность СОД в условиях с содержанием АК по сравнению с растениями контрольного варианта увеличивается. В варианте с добавлением Е резко уменьшается и в комплексе (АК + Е) умеренно уменьшается. Активность СОД у растений, выращенных в условиях хлоридного засоления при концентрации 0.1 М NaCl по сравнению с растениями, выращенными в условиях хлоридного засоления с добавлением антиоксидантов АК и в комплексе (АК + Е) уменьшается существенно, а при применении Е увеличивается незначительно.

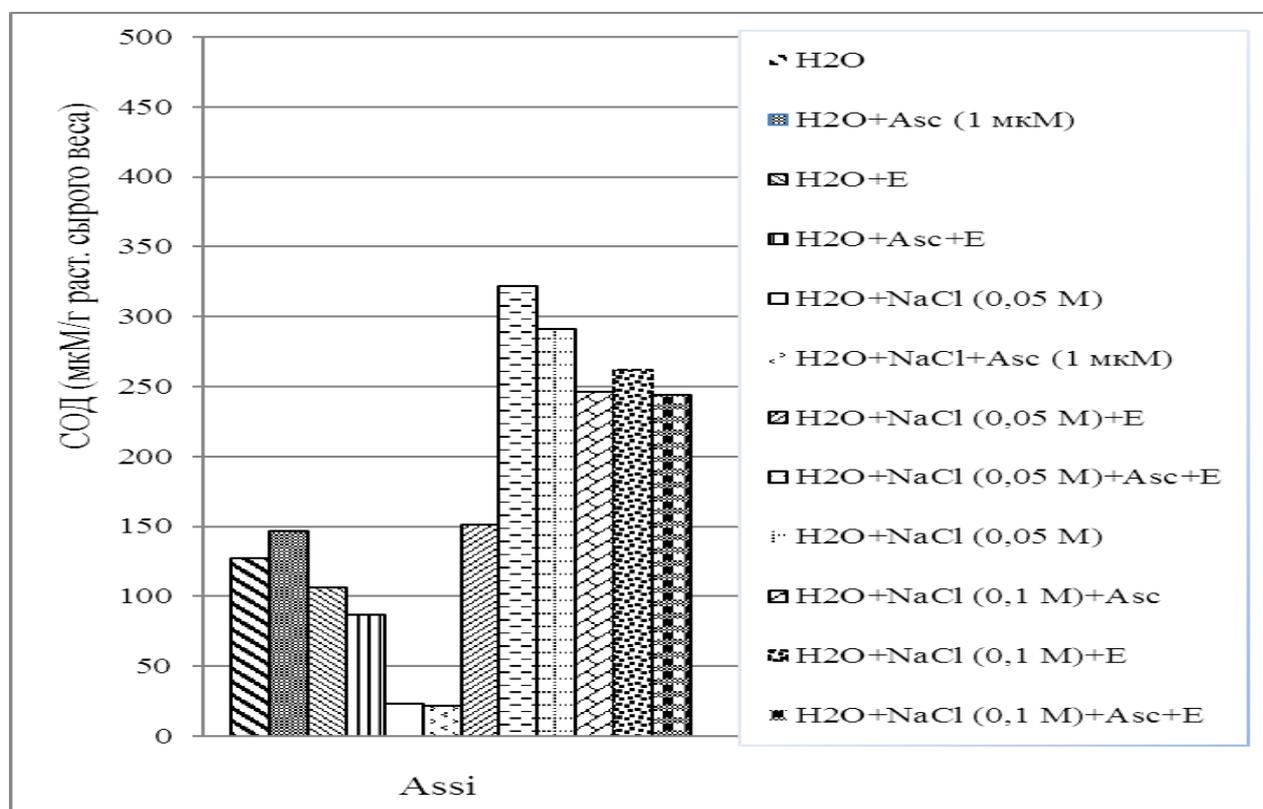
Как видно из рис. 22, у мутанта *ass* в условиях водной среды активность СОД ниже по сравнению с растениями, которые выращивались в таких же условиях с добавлением антиоксиданта АК. В случае добавления витамина Е и в комплексе (АК + Е) также активность СОД сильно подавляется.

В условиях засоления (контроль) и засоления с добавлением АК активность СОД сильно тормозится. Однако в случае с добавлением Е и в комплексе (АК + Е) данный показатель, наоборот, сильно повышается в 6 и 13 раз, соответственно.



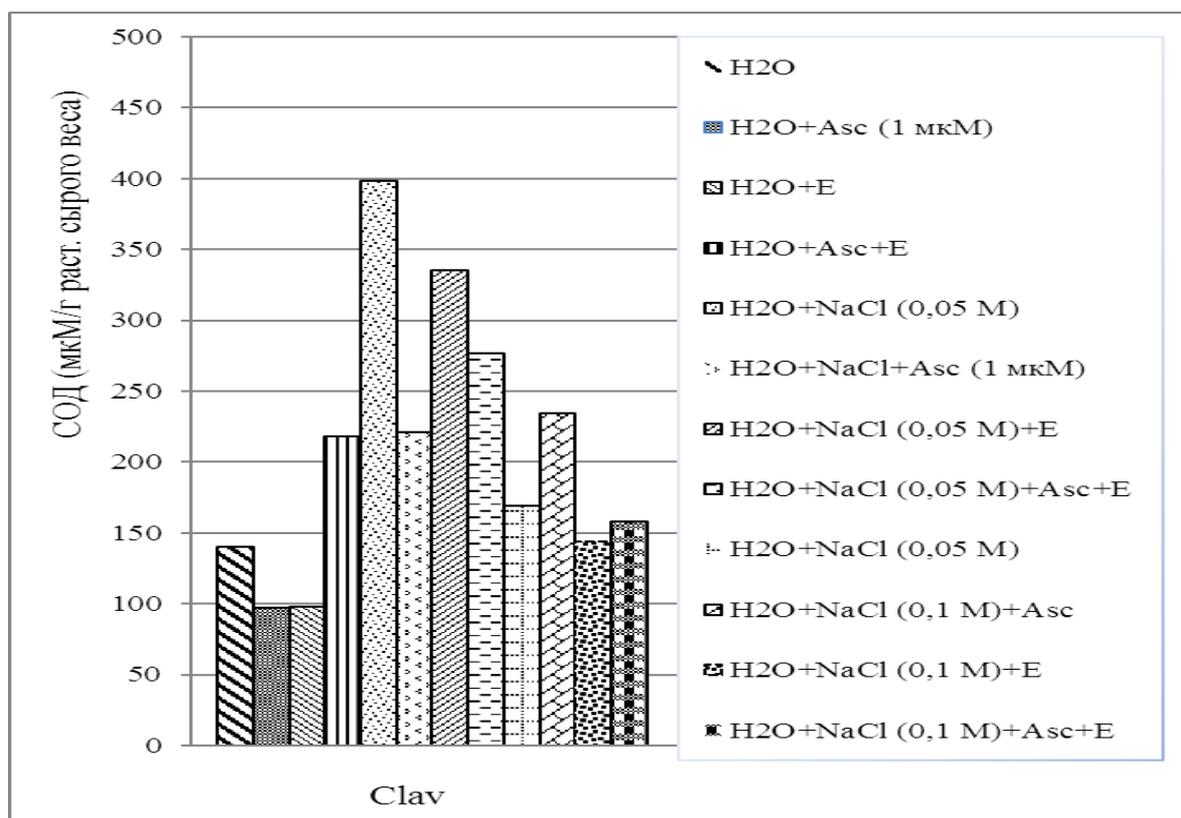
Рисунки 20-21.- Влияние хлоридного засоления на изменение активность супероксидсмутазы у дикой формы *En* (1) и мутанта *flavi* (2) арабидопсиса в зависимости от содержания экзогенных антиоксидантов.

Активность СОД у мутанта *cla* в условиях водной среды (рис. 23) с добавлением антиоксидантов АК и Е в отдельности по сравнению с растениями контрольного варианта понижается, а в случае с добавлением их комплекса существенно увеличивается.



**Рисунок 22. - Влияние хлоридного засоления на изменение активность супероксиддисмутазы у мутантов *ass* арабидопсиса в зависимости от содержания экзогенных антиоксидантов.**

В условиях хлоридного засоления (0.05 M NaCl) активность СОД сильно повышается по сравнению с растениями контрольного варианта без антиоксиданта, контрольного варианта и хлоридного засоления с добавлением антиоксидантов как по отдельности, так и в комплексе. Однако в условиях хлоридного засоления при концентрации (0.1 M NaCl) активность СОД повышается у растений с добавлением АК по сравнению с растениями контрольного варианта без и с добавлением антиоксидантов, и растения хлоридного засоления (0.05 M NaCl) с применением АК.



**Рисунок 23.– Влияние хлоридного засоления на изменение активность супероксиддисмутазы у мутантов *cla* арабидопсиса в зависимости от содержания экзогенных антиоксидантов.**

Таким образом, из полученных результатов можно констатировать, что у дикой формы самая высокая активность СОД наблюдалась у растений, выращенных в условиях хлоридного засоления при концентрации 0.1 М NaCl, а минимальная – у растений в условиях хлоридного засоления (0.05 М NaCl) при добавлении антиоксиданта Е.

Однако у мутанта *flavi* максимальная активность СОД установлена у растений, выращенных в условиях водной среды с применением АК, а минимальная активность такая же как у дикой формы.

У мутанта *ass* максимальное значение активности СОД наблюдается у растений в условиях хлоридного засоления при добавлении в комплексе (АК + Е), а минимальное - в условиях хлоридного засоления и хлоридного засоления с добавлением АК.

В табл.10 представлены экспериментальные данные по изменению активности каталазы у дикой и мутантных форм арабидопсиса в зависимости от содержания не ферментативных экзогенных антиоксидантов в условиях водной среды и хлоридного засоления. Как видно из таблицы, активность каталазы в разных вариантах опыта в зависимости от условия эксперимента изменяется по-разному.

У дикой формы *En* активность каталазы в условиях водной среды достигает минимального значения, а у растений, которые выращивались в таких же условиях с добавлением как по отдельности антиоксидантов АК и Е, так их в комплексе (АК+Е), данный показатель существенно увеличивается. В условиях хлоридного засоления активность каталазы у дикой формы по сравнению с растениями, которые выращивались в данных условиях с добавлением антиоксидантов АК и их в комплексе (АК + Е) увеличивается, а у растений с добавлением антиоксиданта Е, наоборот, уменьшается.

Активность каталазы у мутанта *flavi*, выращенного в условиях водной среды с применением по отдельности антиоксидантов АК и Е по сравнению с растениями в таких же условиях без применения антиоксидантов увеличивается, а при добавлении их в комплексе АК + Е, наоборот, существенно уменьшается. Однако активность каталазы у мутанта *flavi*, выращенного в условиях хлоридного засоления по сравнению с растениями в таких же условиях с добавлением как по отдельности антиоксидантов АК и Е, так и в комплексе (АК + Е) увеличивалась.

Активность каталазы у мутанта *ass*, выращенного в условиях водной среды по сравнению с растениями данной среды с использованием антиоксиданта АК существенно увеличивалась. Наоборот, существенное уменьшение активности каталазы установлено у мутанта *ass*, в условиях водной среды по сравнению с растениями при добавлении по отдельности антиоксиданта Е и в комплексе (АК + Е). В условиях хлоридного засоления повышение активности каталазы выявлено у мутанта, выращенного в данных условиях с добавлением антиоксиданта АК по сравнению со всеми изучаемыми вариантами опыта.

**Таблица 10. - Влияние экзогенных антиоксидантов на активность каталазы у дикой формы и разных мутантов арабидопсиса в условиях хлоридного засоления**

	Варианты и условия эксперимента	Дикая форма	Разных мутантов		
			<i>flavi</i>	<i>ass</i>	<i>cla</i>
		Активность каталазы, нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /г сырой массы*сек			
Контроль					
1.	H <sub>2</sub> O	62,99±0,47	67,80±0,33	83,64±0,54	67,49±0,37
2.	H <sub>2</sub> O+АК (1 мкМ)	76,28±0,52	70,01±0,42	67,57±0,24	76,45±0,4
3.	H <sub>2</sub> O+E	72,64±0,34	69,76±0,62	102,54±0,75	59,21±0,13
4.	H <sub>2</sub> O+АК+E	63,42±0,56	57,48±0,15	92,75±0,48	64,65±0,32
Опыт (0.05 М, NaCl)					
1.	H <sub>2</sub> O+NaCl	71,35±0,22	80,08±0,53	79,15±0,23	70,57±1,21
2.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +АК(1 мкМ)	65,78±0,68	77,62±0,34	82,93±0,51	59,68±0,21
3.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +E	72,64±0,46	79,10±0,22	60,95±0,37	74,60±0,80
4.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +АК+E	65,57±0,35	65,83±0,57	79,15±0,16	77,68±0,26

У мутанта *cla* в условиях водной среды активность каталазы по сравнению с растениями, выращенными в таких же условиях с добавлением антиоксиданта АК увеличивалась, а в других условиях эксперимента уменьшалась. Однако, в условиях хлоридного засоления активность каталазы у мутанта *cla* только в данных условиях с добавлением АК существенно уменьшается, а в других условиях опыта повышается.

То есть, активность каталазы почти у всех изученных объектов в условиях хлоридного засоления увеличилась по сравнению с растениями, выращенными в

условиях водной среды за исключением мутанта *ass*, у которого наблюдалась обратная картина. Такая же закономерность наблюдается у растений, выращенных в условиях хлоридного засоления с добавлением в комплексе (АК + Е) по сравнению с растениями в условиях водной среды с добавлением названного антиоксиданта.

У дикой формы арабидопсиса *En* активность каталазы как в условиях водной среды, так и в условиях хлоридного засоления без и с добавлением антиоксидантов изменяется, соответственно в пределах 63-76 и 65-73 ед.активности, у мутанта *flavi*- 57-70 и 65-73 ед.активности, соответственно, у мутанта *ass* наблюдается предел 67-102 и 60-79 ед.активности, а у мутанта *clav* – 59-76 и 59-77 ед. активности, соответственно. Самые высокие пределы изменения активности каталазы обнаружены у мутанта *ass*, выращенного в условиях водной среды и в условиях хлоридного засоления без и с добавлением антиоксидантов, которое составило 35 и 19 соответственно. Самые низкие пределы изменения активности каталазы выявлены у *En* как в условиях водной среды и хлоридного засоления без и с добавлением антиоксидантов соответственно 13 и 8, а также у *flavi* только в условиях водной среды без и с добавлением антиоксидантов.

Таким образом, можно заключить, что по уровню изменения активности каталазы самым устойчивым оказалась дикая форма *En* и мутант *ass* как в условиях водной среды, так и в условиях хлоридного засоления без и с добавлением антиоксидантов. По всей видимости у изученных мутантов имело место изменение на уровне экспрессии генов ферментов СОД и КАТ, что и проявилось в условиях засоления.

#### **4.4. Влияние экзогенной аскорбиновой кислоты и $\alpha$ -токоферола на содержание свободного пролина у растений арабидопсиса**

«Одним из основных биохимических показателей, по которому судят о процессах, происходящих у растений в условиях засоления и засухи с экологической точки зрения, является изменение содержания иминокислоты пролина в растительной массе, поскольку участие иминокислоты в адаптация

растений к солевому стрессу как осморегулятора общеизвестно. Пролин является одним из широко распространенных метаболитов в высших растениях [127, 48, 49], содержание которого в десятки, иногда и в сотни раз возрастает в условиях засухи, засоления, действия низких температур, тяжелых металлов, патогенов» [49, 63, 145].

«В настоящее время не вызывает сомнения, что пролин при стрессе участвует в осморегуляции, в антиоксидантной защите, работает как энергетический субстрат, регулирует рН и отношение НАДФ/НАДФН» [161, 127, 32, 49, 50].

«В последние десятилетия много внимания уделяется проявлению антиоксидантного эффекта пролина. Его структурные особенности дают основания рассматривать возможность прямой инактивации радикальных форм кислорода. Так, пролин может образовывать устойчивый радикал, поскольку содержит третичный углеродный атом. Образование такого устойчивого радикала приводит к «тушению» или обрыву каскада свободно-радикальных реакций, запускаемых супероксид-радикалом, пероксид-радикалом или гидроксил-радикалом» [30, 164]. «В то же время связь между накоплением пролина и солеустойчивостью различных генотипов не однозначна. Так, показана позитивная связь между накоплением пролина в листьях и корнях сортов томата и их солеустойчивостью» [30, 46]. «Имеются сведения об отсутствии корреляции между содержанием пролина и солеустойчивостью ячменя [30, 112]. «Мутанты арабидопсиса, отличающиеся повышенной чувствительностью к засолению [30, 89] и холоду [30, 143], имели высокое содержание пролина [30].

Поэтому изучение влияния экзогенной аскорбиновой кислоты (АК) и  $\alpha$ -токоферола (Е) на уровень содержания пролина в растениях дикой формы и мутантов арабидопсиса в условиях хлоридного засоления является важным для понимания механизмов устойчивости и поиска путей регуляции при засолении и других факторов среды.

Полученные результаты (табл.11) показывают, что использование экзогенных антиоксидантов в зависимости от условия эксперимента по-разному оказывают влияние на содержание пролина.

**Таблица 11. - Влияние экзогенных антиоксидантов на содержания пролина у дикой формы и мутантов арабидопсиса в условиях хлоридного засоления**

	Варианты и условия эксперимента	Дикая форма <i>En</i>	Мутанты		
			<i>flavi</i>	<i>ass</i>	<i>cla</i>
		Содержание пролина, мкмоль/г сырого веса			
Контроль					
1.	H <sub>2</sub> O	148,2±0,85	228,8±2,32	53,6±1,1	25,1±0,34
2.	H <sub>2</sub> O+АК	56,7±1,44	57,0±0,57	27,4±0,26	30,6±0,22
3.	H <sub>2</sub> O+Е	183,1±0,92	41,8±0,41	36,8±0,64	34,2±0,45
4.	H <sub>2</sub> O+АК+Е	122,8±2,3	43,9±0,53	83,1±0,88	20,1±0,35
Опыт (NaCl)					
1.	H <sub>2</sub> O+NaCl	145,3±1,75	153,7±1,28	91,6±0,57	47,6±0,32
2.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +АК	167,1±1,6	274,2±2,31	65,3±0,49	64,8±0,39
3.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +Е	243,3±2,44	103,0±0,94	155,1±0,95	50,7±0,41
4.	H <sub>2</sub> O+ NaCl +АК+Е	153,4±1,63	203,1±1,62	40,5±0,73	52,5±0,52

В условиях водной среды у арабидопсиса дикой формы *En* и мутанта *cla* максимальное содержание пролина обнаружили у растений при обработке экзогенным антиоксидантом Е, а у мутанта *ass* - при использовании комплекса (Е+АК), Однако, у мутанта *flavi* обнаружены высокие показатели у растений, не обработанных антиоксидантом, В условиях водной среды минимальное содержание пролина выявлено у растений *En* и *ass*, обработанных АК, а у мутантов *flavi* и *cla*- обработанных антиоксидантами Е и Е+АК, соответственно.

В условиях хлоридного засоления максимальное содержание пролина выявлено у растений *En* и *ass*, обработанных экзогенным антиоксидантом E, а у *cla* и *flavi* - антиоксидантом АК и в комплексе E+АК, минимальное содержание пролина установлено у растений *En* и *cla*, необработанных антиоксидантом, и выращенных в условиях хлоридного засоления, У мутантов *flavi* и *ass* - выращенных в условиях хлоридного засоления и обработанных антиоксидантом E и E+АК, соответственно.

Сопоставление полученных результатов у растений контрольного варианта с растениями опытного показало, что содержание пролина у растений опытного варианта, обработанных экзогенными антиоксидантами АК, E и в комплексе АК + E существенно преобладает над растениями контрольного варианта, А у мутанта *ass*, обработанного антиоксидантом в комплексе АК + E, наблюдается обратная картина, т.е. содержание пролина существенно преобладает над растениями опытного варианта.

Однако, сравнение полученных результатов по содержанию пролина у растений контрольного варианта, выращенных в условиях водной среды и растений опытного варианта в условиях хлоридного засоления показало, что у *En* отличия несущественны, на уровне ошибки эксперимента, у *flavi* отличается существенно, т.е. преобладает над растениями опытного варианта, а у мутантов *ass* и *cla* наблюдается обратная картина – контрольные растения почти в 1,7 и 1,9 раза уступают растениям опытного варианта.

Таким образом, из полученных результатов можно заключить, что при воздействии экзогенными антиоксидантами (АК, E и комплексом E+АК )как в отдельности, так и их комплексана разные генотипы арабидопсиса в условиях хлоридного засоления проявляется их проантиоксидантная функция, которая подтверждается образованием свободного пролина. Уровень аккумуляции пролина связан с генетическими особенностями различных форм арабидопсиса.

## ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Факторы биотической и абиотической природы оказывают позитивное и негативное влияние на растительные организмы на разных уровнях. Такого рода воздействия могут затрагивать структурный уровень, т.е, от клетки до целого растения и функциональный уровень, подразумевающий изменения на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях.

Необходимо учитывать факт того, что влияние негативных факторов происходит опосредованно, так как первоначально негативные факторы среды вызывают окислительный стресс, который и ведёт к нарушению гомеостаза клетки. Окислительный стресс происходит за счёт повышенного образования активных форм кислорода (АФК), к АФК относят супероксид радикал, перекись водорода, анион радикал и другие молекулы, которые обладают очень высокой реакционной способностью за счёт присутствия неспаренного электрона на внешней орбитали. В нормальных условиях в растениях вырабатывается определённый уровень АФК, который участвует в клеточном сигналинге. В условиях стрессорного воздействия образование АФК доминирует над утилизацией, что и ведёт к увеличению его уровня и дальнейшему развитию окислительного стресса.

Окислительный стресс может провоцировать повреждение клеточных мембран и как следствие может привести к разрушению структуры клеточных компонентов, в том числе белков, липидов, нуклеиновых кислот ДНК и РНК и других молекул.

Эволюционно в растениях выработались различные механизмы обезвреживания или детоксикации АФК. Эти механизмы можно рассматривать как каскад реакций, в которые вовлечены, в первую очередь, эндогенные ферментные системы, такие как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), различные пероксидазы, в том числе аскорбатпероксидаза (АПО) и др., а также не ферментативные системы, включающие низкомолекулярные соединения. Биосинтез компонентов антиоксидантной защиты находится под контролем

определённых генов, которые начинают экспрессировать в условиях того или иного внешнего (внутреннего) фактора.

Существует ряд компонентов, которые играют роль антиокислителей или антиоксидантов, т.е. обладают способностью гасить АФК и участвовать в детоксикации на эндогенном и экзогенном уровнях. Такого рода компоненты могут иметь как природное происхождение, так являться синтетическими аналогами. К экзогенным компонентам можно отнести витамины, некоторые низкомолекулярные соединения, осмолиты и т.д. Другими словами, воздействуя на растительные организмы экзогенными антиоксидантами возможно уменьшить или даже полностью нивелировать негативное воздействие окислительного стресса.

В настоящем исследовании была изучена роль аскорбиновой кислоты (витамин С) и  $\alpha$ -токоферола (витамин Е) в качестве экзогенных антиоксидантов, которые могли бы участвовать в детоксикации АФК и выполнять регуляторную функцию.

Изучение стрессорного воздействия NaCl на растения арабидопсиса и влияние экзогенных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и  $\alpha$ -токоферол на антиоксидантный статус показало, что для всех изученных генотипов растений арабидопсиса характерно падение энергии прорастания во все периоды солевого стресса. У всех растений опытного варианта солевой стресс угнетает энергию прорастания на 17,3%, а всхожесть семян на 25,6% при значении у контрольного варианта 49,4%. Коэффициент вариации (%) энергии прорастания и всхожести свидетельствует, что уровень их изменчивости под влиянием NaCl составляет 45,0 и 44%, соответственно, что значительно превышает нормальный порог.

В ходе исследования выявлено, что содержание АФК в клетках растений арабидопсиса в условиях солевого стресса повышалось. Наибольшая скорость образования АФК наблюдалась у мутанта *cla*, у мутантов *flavi* и *ass* повышение содержания колебалось от 36 до 46%, а у дикого экотипа *En* наблюдалось незначительное накопление АФК- 6%.

Повышение содержания АФК у дикой формы и мутантных линий коррелировало с понижением содержания хлорофиллов *a* и *b*, у дикой и мутантных форм арабидопсиса при воздействии NaCl наблюдается некоторое падение соотношения хлорофиллов *a* и *b*, а также содержания каротиноидов. Исключение составляет мутант *ass*, у которого содержание хлорофиллов и каротиноидов повысилось в условиях солевого стресса. Добавление в среду аскорбиновой кислоты и витамина Е (АК и Е) при солевом стрессе показало различия по уровню и соотношению хлорофиллов *a* и *b*, и каротиноидов. У дикого экотипа *En* в контроле при обработке растений антиоксидантами наблюдалось понижение содержания хлорофиллов и каротиноидов. В условиях солевого стресса обработка антиоксидантами привела к повышению хлорофиллов *a* и *b*.

Следует отметить, что добавление в среду витамина Е не оказывало такого же действия, как аскорбиновой кислоты, наблюдался меньший стимулирующий эффект. Уровень каротиноидов несколько повышался при добавлении витамина Е и комплекса АК+Е. То есть, витамин Е оказывал больший стимулирующий эффект как в контроле, так и при засолении. У мутанта *ass* имел место стимулирующий эффект  $\alpha$ -токоферола, а комплекс АК+Е в условиях засоления вызывал понижение содержания хлорофиллов и каротиноидов, в то время как в контроле такого эффекта не наблюдалось. У мутанта *flavi*, в контроле при обработке антиоксидантами наблюдалось падение содержания пигментов, а в условиях солевого стресса АК повышала содержание хлорофиллов и каротиноидов, а токоферол оказывал ингибирующее действие.

Таким образом, исследования показали, что в условиях и стрессорного воздействия NaCl, и в контроле добавление экзогенных антиоксидантов не всегда имеет стимулирующий эффект на содержание хлорофиллов и каротиноидов.

В свою очередь, содержание фотосинтетических пигментов, а именно хлорофиллов и каротиноидов тесным образом связано с активностью фотосинтетического аппарата растений, а фотосинтез коррелирует с продуктивностью растений, особенно в условиях стрессорного воздействия. Интенсивность фотосинтеза и фотосинтетический метаболизм углерода как в

нормальных условиях, так и при воздействии стрессовых факторов, таких как засоление почв, засуха, недостаток элементов минерального питания, высокие или низкие температуры воздуха и т.п., позволяют более полно охарактеризовать закономерности механизмов устойчивости и формирования адаптационного потенциала растений в неблагоприятных условиях. В частности, в Институте ботаники физиологии и генетики растений проводятся исследования по изучению фотосинтеза различных культур, произрастающих в разных экологических условиях. Исследованиями показано, что потенциальная интенсивность фотосинтеза и распределение продуктов фотосинтетического метаболизма углерода в листьях четырёх видов бобовых растений в фазе цветения в условиях хлоридного засоления и разных сортов мягкой пшеницы при почвенной засухи заметно меняется, и данное изменение связано с механизмами адаптации растений на физиологическом и биохимическом уровнях [12, 52].

Выявлено, что основные параметры фотосинтетического метаболизма углерода имеют генотипическую детерминированность и могут проявляться в условиях засухи и засоления. Исследованиями показано, что под влиянием факторов среды изменяется направленность фотосинтетического метаболизма углерода и соотношения продуктов фотосинтеза, что тесным образом связано с общими закономерностями роста и развития растений в норме и при стрессе [12, 52].

В наших исследованиях, изучение потенциальной интенсивности фотосинтеза (ПИФ) у различных генотипов арабидопсиса в норме и при хлоридном засолении, в условиях воздействия экзогенных антиоксидантов (аскорбиновой кислотой и  $\alpha$ -токоферола) по отдельности и в сочетании показало, что изменения ПИФ имеют разнонаправленный характер. Максимальные показатели ПИФ выявлены у мутантной формы *ass* в условиях водной среды, а у мутанта *cla* в условиях хлоридного засоления. Установлено, что ПИФ преобладает у растений дикой формы арабидопсиса *En* и у мутантной формы *cla* в условиях хлоридного засоления, над растениями контрольного варианта. Выявлена обратная закономерность у мутантных форм *flavi* и *ass* и показано, что

потенциальная интенсивность фотосинтеза у данных генотипов в условиях водной среды выше, чем у растений, в условиях хлоридного засоления. Стимулирующий эффект на ПИФ в условиях водной среды у дикой формы наблюдали у растений, обработанных антиоксидантами АК и Е, как в отдельности, так и в комплексе АК+Е, у мутантов *flavi* и *ass* стимулирующий эффект при данных условиях наблюдали у растений, обработанных антиоксидантом АК, а также у мутанта *cla*, обработанных комплексом АК+Е. Стимулирующий эффект на ПИФ в условиях хлоридного засоления выявлен у мутантной линии арабидопсиса *ass*, обработанной антиоксидантами Е и в комплексе АК+Е. В ходе исследования также установлено, что у дикой формы и мутанта *cla* ПИФ в условиях хлоридного засоления преобладает над растениями контрольного варианта, а у мутантов *ass* и *flavi* обнаружена обратная картина, т.е. ПИФ у этих форм арабидопсиса в контрольном варианте преобладает над растениями опытного варианта. Эти данные являются доказательством того, что ответная реакция на стресс зависит от генотипа растения.

Фотосинтетическую ассимиляцию  $\text{CO}_2$  и фотосинтетический метаболизм углерода можно отнести к тест-признакам в условиях стрессорного воздействия. Фотосинтез является обязательным компонентом продукционного процесса растений, который зависит от функционирования механизмов адаптации и формирования продуктивности растений, особенно в условиях стресса.

Исследования по распределению  $^{14}\text{C}$  среди продуктов фотосинтеза и суммы продуктов фотосинтетического метаболизма углерода в условиях хлоридного засоления у дикой формы и ряда мутантных линий арабидопсиса выявило, что у дикой формы *En* количество меченого углерода в условиях хлоридного засоления в составе сахаров, интермедиатов гликолатного пути (ИГП) и ФЭП-продукты преобладают по сравнению с растениями в условиях водной среды, и наоборот. По количеству сосредоточения  $^{14}\text{C}$  в составе интермедиатов восстановительного пентозофосфатного цикла (ИВПЦ) наблюдается обратная картина. В условиях солевого стресса ИВПЦ падает на 33%. Включения  $^{14}\text{C}$  в состав сахаров в условиях засоления увеличивается почти вдвое. У мутанта *flavi* в условиях

хлоридного засоления наблюдается стимуляция включения меченого углерода в ИВПЦ и суммы интермедиатов гликолатного пути (ИГП) по сравнению с растениями, адаптированными в условиях водной среды, а по скорости включения  $^{14}\text{C}$  состав сахаров и ФЕП-продуктов наблюдается обратная картина. У мутанта *cla* происходит увеличение сосредоточения  $^{14}\text{C}$  углерода в составе сахаров и небольшое увеличение в составе ИГП и ФЭП продуктов при засолении. У мутанта *ass* в условиях хлоридного засоления наблюдается стимуляция включения меченого углерода в состав сахаров, ИГП и ФЕП-продуктов по сравнению с контролем, а по накоплению меченого углерода в ИВПЦ у растений, в водной среде наблюдается обратная картина.

Сравнительный анализ продуктов ФЭП выявил разнонаправленный характер распределения продуктов фотосинтеза у дикой формы и мутантных линий арабидопсиса. Проявившееся многообразие фотосинтетического метаболизма  $^{14}\text{C}$  - углерода и его связь с другими метаболическими процессами наводят на мысль о существовании пути регуляции общей биохимической адаптации растений в различных стрессовых условиях среды.

Следует также отметить, что метаболизация продуктов  $^{14}\text{C}$  - углерода происходила менее интенсивно в контрольном варианте, чем при засолении. Такое явление наблюдается не у всех линий арабидопсиса (рис,14). Сумма интермедиатов гликолатного цикла (ИГП) не одинакова в условиях засоления.

Таким образом, изучение ПИФ и суммы продуктов фотосинтетического метаболизма углерода у дикой формы (*En*) и мутантных линий (*ass*, *flavi* и *cla*) арабидопсиса в условиях хлоридного засоления выявило изменения биохимических параметров, но в разной степени, что может свидетельствовать о различной адаптационной способности в условиях солевого стресса.

Исследование влияния экзогенной аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола на уровень содержания эндогенной аскорбиновой кислоты, синтезируемой растениями как в норме, так и в условиях стресса имеет важное значение для решения проблем регуляции механизмов устойчивости при стрессорном воздействии. Результаты изучения содержания аскорбиновой кислоты (АК) в

листьях 4-х генотипов растений арабидопсиса показали, что пул АК в листьях растений контрольного варианта неодинаков. Так у дикого типа арабидопсиса *En* и мутанта *ass* наблюдались более высокие показатели содержания АК, чем у мутантов *cla* и *flavi* ( $P < 0,05$ ). Добавление в водную среду NaCl привело к уменьшению содержания АК у дикого типа *En* и мутанта *ass* (на 10 и 37%) и к значительному увеличению у мутантов *cla* и *flavi* (в 3 и 7 раз, соответственно). По содержанию АК исследованные генотипы арабидопсиса можно условно разделить на две группы. Первая группа – дикий тип *En* и мутант *ass*, которые характеризовались высоким содержанием АК в контроле, а при добавлении в среду NaCl наблюдалось снижение пула АК на 10-37%. Вторая группа – мутанты *cla* и *flavi*, имела более низкий пул АК в контроле, который возрастал при добавлении в среду NaCl.

Известно, что некоторые компоненты в зависимости от концентрации и условий среды могут вести себя как антиоксиданты или прооксиданты, т.е., являются компонентами, облегчающими процессы ПОЛ. Результаты анализа участия аскорбиновой кислоты (АК) и  $\alpha$ -токоферола (Е) в процессах перекисного окисления липидов у дикой и мутантных форм арабидопсиса в условиях хлоридного засоления выявило их различное влияние на накопление МДА. Аскорбиновая кислота действовала как прооксидант, т.е. облегчала реакции окисления, а  $\alpha$ -токоферол резко ингибировал процессы ПОЛ. У дикой формы арабидопсиса *En* в условиях водной среды (контроль) наблюдается незначительное накопление МДА. При добавлении АК, Е, а также комплекса АК+Е наблюдается заметное изменение содержания МДА. При добавлении АК и Е, а также комплекса АК+Е содержание МДА уменьшается. В условиях солевого стресса, уровень МДА увеличивается почти в 2 раза от контроля (без NaCl), при добавлении АК и Е по отдельности содержание МДА продолжало повышаться, а действие комплекса АК +Е ингибировало процессы ПОЛ в два раза по сравнению с контролем. У мутанта *cla* влияние АК и Е кардинально различалось от дикой формы. В контроле и при засолении имело место снижение уровня накопления МДА при добавлении экзогенных антиоксидантов, как по отдельности, так и в

комплексе. У мутантной формы *ass* наблюдается такая же картина. У мутанта *flavi* имелись различия, уровень ПОЛ в контроле был незначительный, а добавление экзогенных антиоксидантов уменьшило содержание МДА. В условиях засоления содержание МДА резко возрастало. Добавление АК не понижало процессы ПОЛ, а Е значительно уменьшало содержание МДА. Комплексное добавление АК+Е также тормозило ПОЛ при засолении, что по всей вероятности происходит за счет синергизма двух компонентов АК и Е. Наличие положительной корреляции между уровнем восстановленной АК и содержанием МДА у генотипов арабидопсиса свидетельствует о том, что аскорбиновая кислота прямо или косвенно ингибирует ПОЛ и участвует в защите компонентов самой антиоксидантной системы.

Изучение активности ключевого фермента антиоксидантной системы растений супероксиддисмутазы (СОД) показало, что у дикой формы самая высокая активность СОД наблюдалась у растений, выращенных в условиях хлоридного засоления при концентрации 0,1 М NaCl, а минимальная – у растений в условиях хлоридного засоления (0,05 М NaCl) при добавлении антиоксиданта Е. Однако, у мутанта *flavi* максимальная активность СОД установлена у растений, выращенных в условиях водной среды с применением АК, а минимальная так же, как у дикой формы. У мутанта *ass* максимальное значение активности СОД наблюдается у растений в условиях хлоридного засоления при добавлении в комплексе (АК + Е), а минимальное - в условиях хлоридного засоления и хлоридного засоления с добавлением АК.

Активность каталазы в разных вариантах опыта в зависимости от условия эксперимента также имеют различия. У дикой формы *En* активность КАТ в условиях водной среды минимальная, а при добавлении антиоксидантов по отдельности АК и Е, так их в комплексе (АК + Е), данный показатель увеличивается. Такая же тенденция наблюдается в условиях хлоридного засоления с добавлением АК и АК + Е, но при добавлении витамина Е, наоборот, уменьшается.

Изучение активности КАТ у исследованных объектов выявило различия, так у мутанта *flavi* в условиях водной среды с добавлением экзогенных АК и Е по сравнению с растениями в таких же условиях без их применения содержание КАТ увеличивается, а при добавлении комплекса АК + Е, наоборот, существенно уменьшается. Однако, активность КАТ у мутанта *flavi* в условиях хлоридного засоления по сравнению с растениями в таких же условиях с добавлением как по отдельности антиоксидантов АК и Е, так и в комплексе (АК + Е) увеличивалась.

Активность КАТ у мутанта *ass*, выращенного в условиях водной среды по сравнению с растениями данной среды с использованием антиоксиданта АК существенно увеличивалась. Наоборот, существенное уменьшение активности каталазы установлено у мутанта, выращенного в условиях водной среды по сравнению с растениями при добавлении по отдельности антиоксиданта Е и в комплексе (АК + Е). В условиях хлоридного засоления повышение активности каталазы выявлено у мутанта, выращенного в данных условиях с добавлением антиоксиданта АК по сравнению со всеми изучаемыми вариантами опыта.

У мутанта *cla* в условиях водной среды активность каталазы по сравнению с растениями, выращенными в таких же условиях с добавлением антиоксиданта АК увеличивалась, а в других условиях эксперимента уменьшалась. То есть, по уровню изменения активности каталазы самым устойчивым оказалась дикая форма *En* и мутант *ass* как в условиях водной среды, так и в условиях хлоридного засоления без и с добавлением антиоксидантов.

Использование экзогенных антиоксидантов в зависимости от условий эксперимента по-разному оказывает влияние на содержание пролина. В условиях водной среды у дикой формы *En* и мутанта *cla* максимальное содержание пролина обнаружили у растений при обработке экзогенным антиоксидантом Е, а у мутанта *ass* - при использовании комплекса (Е+АК), у мутанта *flavi* обнаружены высокие показатели у растений, не обработанных антиоксидантом. В условиях водной среды минимальное содержание пролина выявлено у растений *En* и *ass*, обработанных АК, а у мутантов *flavi* и *cla* обработанных антиоксидантами Е и Е+АК, соответственно. В условиях засоления максимальное содержание пролина

наблюдалось у *En* и мутанта *ass*, обработанных E, а у *cla* и *flavi*, обработанных АК и АК+E. Минимальное содержание пролина установлено у растений *En* и *cla*, необработанных антиоксидантом, и в условиях хлоридного засоления, У мутантов *flavi* и *ass* - в условиях хлоридного засоления и обработанных антиоксидантом E и АК+E, соответственно. Из полученных результатов можно заключить, что при воздействии экзогенными антиоксидантами (АК, E и комплекса АК+E) на разные генотипы арабидопсиса в условиях хлоридного засоления проявляется их проантиоксидантная функция, которая подтверждается образованием свободного пролина, что, в свою очередь, указывает на генетическую детерминированность содержания пролина у различных форм арабидопсиса.

Таким образом, можно констатировать, что экзогенные антиоксиданты не всегда эффективны при воздействии стрессоров. Предполагалось, что экзогенные АК и E будут обладать регуляторными функциями при их добавлении в среду выращивания и тем самым участвовать в повышении адаптационной способности растений арабидопсиса. Однако, исследования показали, что влияние экзогенных антиоксидантов, а именно аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола, как по отдельности, так и в комплексе у изученных генотипов имеет разнонаправленный характер, так как в ходе исследования выявлены различия ответных реакций дикой формы и мутантных линий на солевой стресс. Использование аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола не оказало равнозначной защитной роли от АФК, по-разному влияло на образование МДА и перекисное окисление липидов в целом, а также на биосинтез пролина и антиоксидантных ферментов СОД и КАТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### (ВЫВОДЫ)

1. Проведён сравнительный анализ физиолого-биохимических показателей дикой формы и некоторых мутантов арабидопсиса в условиях солевого стресса. Показано, что растения проявляют различную адаптационную реакцию к действиям экзогенных антиоксидантов, которые не всегда имеют стимулирующий эффект. Обработка растений аскорбиновой кислотой и витамином Е при солевом стрессе обуславливает различия по содержанию и соотношению хлорофиллов *a* и *b* [A-1], [A-6], [A-8], [A-9], [A-11].
2. Изучение ПИФ и суммы продуктов фотосинтетического метаболизма углерода у дикой формы (*En*) и мутантных линий (*ass*, *flavi* и *cla*) арабидопсиса в условиях хлоридного засоления выявило изменения биохимических параметров, но в разной степени, что может свидетельствовать о различной адаптационной способности в условиях солевого стресса [A-4], [A-12], [A-14], [A-15], [A-17], [A-19].
3. Показано, что содержание эндогенной аскорбиновой кислоты у дикой расы арабидопсиса уменьшается при воздействии экзогенных АК и Е, а у мутантных линий наблюдаются различия, то есть наблюдается генетическая детерминированность ответных реакций на солевой стресс в условиях воздействия экзогенных антиоксидантов [A-3], [A-15], [A-17].
4. Выявлено, что влияние экзогенных антиоксидантов, как по отдельности, так и в комплексе у изученных генотипов имеет разнонаправленный характер, что свидетельствует о различной реакции дикой формы и мутантов на солевой стресс. Обнаружена положительная корреляция между содержанием восстановленной аскорбиновой кислоты и содержанием МДА, что свидетельствует о том, что аскорбиновая кислота ингибирует ПОЛ и участвует в защите компонентов антиоксидантной системы [A-2], [A-13].
5. Установлено, что у дикой формы арабидопсиса в условиях солевого стресса наблюдается повышение уровня СОД. Выявлено, что при воздействии экзогенных АК и Е по отдельности содержание СОД уменьшается, а при

воздействии комплекса АК+Е количество СОД незначительно увеличивается [А-5], [А-10], [А-11].

6. Выявлено, что по уровню изменения активности каталазы самым устойчивым генотипом является дикая форма *En* и мутант *ass*, как в условиях водной среды, так и в условиях хлоридного засоления без и с добавлением экзогенных антиоксидантов [А-14].
7. Установлено, что при воздействии экзогенными антиоксидантами, как в отдельности, так и в комплексе на разные линии арабидопсиса в условиях хлоридного засоления проявляется их прооксидантная функция, которая сопровождается образованием свободного пролина [А-16], [А-18].

## **РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Полученные результаты имеют важное практическое значение, так как выявленные в ходе исследования закономерности можно использовать при оценке рисков влияния факторов окружающей среды и поиске путей регуляции и предотвращения последствий различных стрессов в условиях глобального изменения климата.

Изученные параметры могут быть рекомендованы в качестве тест-признаков при подборе мер смягчения действия неблагоприятных условий среды, инициирующих образование активных форм кислорода (АФК) и создании сценариев адаптационных перестроек в растительных сообществах, в том числе в агробиоценозах, в условиях как засоления почв, так и других стрессорных факторов среды.

Полученные данные могут быть использованы и внедрены при подготовке учебно-методических пособий, а также при чтении лекций и спецкурсов по экофизиологии и биохимии растений в ВУЗ-ах биологического и сельскохозяйственного профиля.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1]. Абдрахимова, Й.Р. Стресс-индуцированные изменения содержания антиоксидантов в листьях растений разных видов [Текст] / Й.Р. Абдрахимова, Ю.А. Цветкова // Ученые записки Казанского государственного университета. Естественные науки. - 2007. - Т.149., кн.2. - С.75-83.
- [2]. Азимов, М.Л. Некоторые биохимические особенности устойчивых к NaCl растений картофеля *in vitro* и *in vivo*: дис.... канд. биол. наук [Текст] / М.Л. Азимов. – Душанбе. - 2013. –100 с.
- [3]. Бараненко, В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений [Текст] / В.В. Бараненко // Цитология. - 2006. - Т. 48, №6. - С. 465-474.
- [4]. Белан, Н.Ф. Разделение продуктов фотосинтеза методом хроматографии в тонких слоях [Текст] / Н.Ф. Белан, З.Н. Абдурахмонова // Доклады АН Тадж. ССР. - 1969. - Т. 12. - С. 6163.
- [5]. Бритиков, Е. А. О метаболизме пролина в подрастающей пыльце и тканях пестика [Текст] / Е.А. Бритиков, Н.А. Мусатова, С.В. Владимирцева // Физиология растений. – 1965. – Т. 12. – С. 953-957.
- [6]. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов [Текст] / Г. Бриттон // - М.: Мир, - 1986.— 422 с.
- [7]. Бухов, Н. Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза [Текст] / Н. Г. Бухов // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – С. 825-837.
- [8]. Васильев, Л.А., Е.В. Дзюбинская, Д.Б. Киселевский, А.А. Шестак, В.Д. Самуилов [Текст] // Биохимия. 2011.Т. 76. № 10. С. 1374–1386.
- [9]. Войтехович, М.А. L-аскорбиновая кислота как антиоксидант и сигнально-регуляторный агент в клетках высших растений[Текст] / М.А. Войтехович, В.А. Кучинская, И.Ю. Новосельский, П.В. Гриусевич, В.В. Самохина, В.С. Мацкевич, А.И. Соколик, В.В. Демидчик // Журнал Белорусского Государственного Университета. Биология. - 2018. - № 2. - С. 27-38.
- [10]. Гарифзянов, А.Р. Динамика активности антиоксидантных ферментов в органах *Triticosecslе* на фоне NaCl-засоления [Текст] / А.Р. Гарифзянов, Н.Н.

- Жуков, В.В. Иванищев // Изв. ТулГУ. Естественные науки. - 2012. - Вып. 2. - С. 285-291.
- [11]. Давлятназарова, З.Б. Механизмы устойчивости растений картофеля в условиях абиотического стресса [Текст] / Давлятназарова З.Б. // Дисс. Доктора биол. наук. Душанбе. – 2020. – 270 с.
- [12]. Джумаев, Б.Б. Фотосинтетический метаболизм углерода  $^{14}\text{C}$  в листьях бобовых растений в условиях засоления [Текст] / Б.Б. Джумаев, М.Х. Атоев, А. Абдуллаев // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. - 2020. - № 2 (209). - С. 29-37.
- [13]. Дзюбинская, Е.В., Ионенко И.Ф., Киселевский Д.Б., Самуилов В.Д., Самуилов Ф.Д. [Текст] // Биохимия. 2013. Т. 78. № 1. С. 92–99.
- [14]. Долгих, Ю.И. Засухоустойчивость растений кукурузы, полученных из устойчивых к осмотическому действию полиэтиленгликоля клеточных линий [Текст] / Ю.И. Долгих, С.Н. Ларина, З.Б. Шаминаи др. // Физиология растений. –1994. – Т. 41., №6. – С. 853-858.
- [15]. Достанова, Р.Х. Фенольный комплекс растений при засолении среды [Текст] / Р.Х. Достанова // Дис. ... д-ра биол. наук в форме научного доклада. – Новосибирск, 1994.
- [16]. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта [Текст] / Б.А. Доспехов // - М., Агропромиздат - 1985. – 350 с.
- [17]. Заленский, О.В. Методы применения радиоактивного углерода  $^{14}\text{C}$  для изучения фотосинтеза [Текст] / О.В. Заленский, О.А. Семихатова, В.А. Вознесенский // – М.: Изд-во АН СССР, 1955. - 90 с.
- [18]. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии растений [Текст] / Под ред. Павленовой О.А. - М.: Наука.- 1971. - С.185-197.
- [19]. Ипатова, В.И. Адаптация водных растений к стрессовым факторам среды [Текст] / В.И. Ипатова // – М.: Графикон-принт.- 2005. – 224 с.
- [20]. Карпец, Ю.В. Обоз-ный А.И. [Текст] / Ю.В. Карпец, Ю.Е. Колупаев, Т.О. Ястреб // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 3. С. 317–323.

- [21]. Киёмова, З.С. Активность супероксиддисмутазы у разнотолерантных растений-регенерантов картофеля в условиях солевого стресса [Текст] / З.С. Киёмова, З.Б. Давлятназарова, М.Х. Шукурова и др. // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед.наук. – 2013. – № 1 (182). – С. 40-46.
- [22]. Клышев, Л.К. Биохимические и молекулярные аспекты исследования солеустойчивости растений [Текст] / Л.К.Клышев // Проблемы солеустойчивости растений. – М., 1989. –195 с.
- [23]. Колупаев, Ю.Е. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в колеоптилях пшеницы при действии пероксида водорода и нагрева [Текст] / Ю.Е. Колупаев, Ю.В. Карпец // Физиология и биохимия культурных растений.- 2007. - Т.39, № 4. - С. 319-325.
- [24]. Колупаев, Ю.Е. Физиология растений [Текст] / Ю.Е. Колупаев, Г.Е. Акинина, А.В. Мокроусов // - 2005. Т. 52. № 2. С. 227–232.
- [25]. Колупаев, Ю.Е., Карпец Ю.В. [Текст] // Вісн. Харків. нац.аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2008. № 1 (13). С. 15–21.
- [26]. Колупаев, Ю.Е. Обозный А.И. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров [Текст] / Ю.Е. Колупаев, Ю.В Карпец // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. Вып. - 2011. - 1 (22). - С. 6-34.
- [27]. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Луговая А.А. [Текст] // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 4. С. 400–407.
- [28]. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Фирсова Е.Н. [Текст] // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 316–322.
- [29]. Колупаев Ю.Е., Фирсова Е.Н., Ястреб Т.О., Луговая А.А. [Текст] // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 5. С. 502–509.
- [30]. Колупаев Ю.Е., Фирсова Е.Н., Ястреб Т.О., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. [Текст] // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 1. С. 26–34.
- [31]. Колупаев, Ю.Е. Реакция растений *Arabidopsisthaliana*, дефектных по жасмонатному сигналингу на солевой стресс [Текст] / Ю.Е. Колупаев, Т.О.

- Ястреб, Н.В. Швиденко, А.А. Луговая, А.П. Дмитриев // Прикл. Биохимия и микробиология. - 2015. - Т. 51. № 4. - С. 412-416.
- [32]. Колупаев, Ю.Е. [Текст] // Успехи соврем.биологии. 2016. Т. 136. № 2. С. 181–198.
- [33]. Кузнецов, Вл.В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция [Текст] / Вл.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиол. растений. – 1999. – Т.46., вып. 2.– С. 305-320.
- [34]. Кузнецов, Вл.В. Физиология растений [Текст] / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. –2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2006. – 742 с.
- [35]. Кузнецов, Вл. В. Физиологические механизмы адаптации и создание стресс-толерантных растений. Проблемы экспериментальной биологии [Текст] / Под ред. Ламана Н. А. // – Минск: Тэхналогія, 2009. – 116 с.
- [36]. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и окислительные модификации макромолекул: польза, вред и защита [Текст] / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. –1999. –№1. –С.56-63.
- [37]. Ларина, С.Н. Клеточные линии и растения-регенеранты как модель для изучения солеустойчивости: автореф. дис. ... канд.наук [Текст] / С.Н. Ларина. – 1995. –24с.
- [38]. Лобанова, Т.Н. Динамика ответных реакций проростков тритикале на стресс, индуцируемый сульфатным и карбонатным засолением[Текст] / Т.Н. Лобанова, Н.Н. Жуков, О.И. Бойкова, В.В. Иванищев // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. - 2015. - № 4. - С. 273-282.
- [39]. Мамаева, А.С. Физиология растений [Текст] / А.С. Мамаева, А.А. Фоменков, А.В. Носов, И.Е. Мошков, Л.А.Дж. Мур, М.А. Холл, Г.В. Новикова // - 2015. Т. 62. № 4. С. 459–474.
- [40]. Мелехов, Е.И. Принцип регуляции скорости процесса повреждения клетки и реакция защитного торможения метаболизма (РЗТМ) [Текст] / Е.И. Мелехов // Журнал общей биол. – 1985. - № 46. – С.174-189.

- [41]. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительных клеток [Текст] / М. Н. Мерзляк // Итоги науки и техники. Сер. «Физиология растений». –М: ВИНТИ, 1989.–Т.6. –168 с.
- [42]. Мокросноп, В.М. Микроводоросли как продуценты токоферолов [Текст] / В.М. Мокросноп, Е.К. Золотарева // Biotechnol. acta. Vol. 7 - 2014. - № 2. – С.26-33.
- [43]. Норкулов, Н.Х. Биохимические показатели разнотолерантных генотипов картофеля при воздействии стрессоров: дис. ... канд.биол. наук: [Текст] / Н.Х. Норкулов // – Душанбе, 2017. – 120 с.
- [44]. Полесская, О.Г. Фотосинтетическая Фиксация CO<sub>2</sub> вторым листом пшеницы в зависимости от условий азотного питания [Текст] / О.Г. Полесская, Т.Г. Джигладзе, Е.И. Каширина, Н.Д. Алехина, Н.Г. Бухов // Физиология растений. - 2004. - Т. 51. - С. 366-372.
- [45]. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода [Текст] / О.Г. Полесская. – М.: КДУ. - 2007. – 140 с.
- [46]. Прадедова, Е.В. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений [Текст] / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Салаяев // Физиология растений. - 2011. - Т. 58. № 2. - С. 177-185.
- [47]. Прадедова, Е.В., О.Д. Нимаева, А.Б. Карпова, Н.В. Семенова, А.Л. Ракевич, В.Н. Нурминский, А.В. Степанов, Р.К. Салаяев [Текст] // Физиология растений. - 2018. Т. 65. № 2. С. 101–110.
- [48]. Прадедова, Е.В. Редокс-процессы в биологических системах [Текст] / Е.В. Прадедова, О.Д. Нимаева, Р.К. Салаяев // Физиология растений. - 2017. - Т. 64., № 6. - С.433- 445.
- [49]. Радюкина, Н.Л. Низкомолекулярные антиоксиданты в клетках цианобактерий и растений [Текст] / Н.Л. Радюкина, Л.Е. Михеева, Е.А. Карбышева // Успехи современной биологии. - 2019. Т. 139. №3. С. 254 – 266.

- [50]. Радюкина, Н.Л. Функционирование антиоксидантной системы дикорастущих видов растений при кратковременном действии стрессоров: дис... д-ра наук [Текст] / Н.Л. Радюкина // – М.–2015. – 207 с.
- [51]. Романов, Г.А. Гормон-связывающие белки растений и проблема рецепции фитогормонов [Текст] / Г.А. Романов // Физиология растений. - 1989. - Т. 36. - С. 166-177.
- [52]. Рустамов, А.Р. Фотосинтетический метаболизм углерода у полиплоидных форм мягкой пшеницы в условиях засухи [Текст] / А.Р. Рустамов, М.Х. Атоев, Б.Б. Джумаев, А. Абдуллаев, А. Эргашев // ДАН РТ. –2020. - Т. 63, № 3-4. - С. 256-262.
- [53]. Сахабутдинова, А.Р., Прикл. биохимия и микробиология [Текст] / А.Р. Сахабутдинова, Д.Р. Фатхутдинова, Ф.М. Шакирова // - 2004. Т. 40. № 5. С. 579–583.
- [54]. Соловченко, А.Е. Экранирование видимого и УФ излучения как механизм фотозащиты у растений [Текст] / А.Е. Соловченко, М.Н. Мерзляк // Физиология растений. - 2008. - Т. 55. - С. 803-822.
- [55]. Строганов, Б.П. Метаболизм растений в условиях засоления [Текст] / Б.П. Строганов // 33-е Тимирязевское чтение. – М. - 1973. – 51 с.
- [56]. Строганов, Б.П. Растения и засоление почвы [Текст] / Б.П. Строганов // – Изд-во АН СССР. – М.: - 1958. - 68 с.
- [57]. Тарчевский, И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы и их взаимодействие [Текст] / И.А. Тарчевский // Физиол. растений – 2000. –№ 47. – С. 321-331.
- [58]. Третьяков, Н.Н. Практикум по физиологии растений [Текст] / Н.Н. Третьяков // - М.: Агропромиздат, 1990, - 270 с.
- [59]. Удовенко, Г.В. Солеустойчивость культурных растений [Текст] / Г.В. Удовенко // – Л., 1977. – 216 с.
- [60]. Усманов, П.Д. Генотипическое гугенчивость признаков фотосинтетического аппарата высших растений [Текст] / П.Д. Усманов // Дисс. Доктора биол. наук. Душанбе. – 1984. – 406 с.

- [61]. Усманова, О.В. Генетическая коллекция арабидопсиса (*arabidopsis thaliana* (L.) heynh.). Атлас. редактор-составитель [Текст] / О.В.Усманова. // Душанбе, ООО "контраст". - 2010. - 96 с.
- [62]. Франко, О. Л. Осмопротекторы: ответ растений на осмотический стресс [Текст] / О. Л. Франко, Ф. Р. Мело // Физиология растений. – 2000. – Т.47., №1. – С. 152-159.
- [63]. Черенкевич, С.Н. Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. Біял. навук. [Текст] С.Н. Черенкевич, Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, И.В. Горудко, Е.В. Шамова // - 2013. № 1. С. 92–108.
- [64]. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений [Текст] / Т.В. Чиркова. – СПб: СпбГУ. - 2002. – 240 с.
- [65]. Шевякова, Н.И. Антиоксидантная роль пролина у галофита *Mesembryanthemum crystallinum* в ответ на краткосрочный супероксидный стресс, генерируемый паракватом [Текст] / Н.И. Шевякова, Е.А. Бакулина, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2009. – Т.56., № 5. – С. 1-7.
- [66]. Шевякова, Н.И., Физиология растений [Текст] / Н.И.Шевякова, У.А. Бакулина, Вл.В. Кузнецов. –2009.–Т.56.–С.736-742.
- [67]. Эргашев, А. Влияние естественной высокогорной УФ-радиации на фотосинтетическую ассимиляцию углерода [Текст] / А. Эргашев, З.Н. Абдурахмонова, В.К. Кичитов, Ю.С. Насыров // Фотосинтез и использование солнечной энергии. – Л.: Наука. - 1971. С. 226-231.
- [68]. Abogadallah, G. M. Antioxidative defense under salt stress [Text] / G. M. Abogadallah // Plant Signal Behav. – 2010. – Vol.5. – P. 369-74.
- [69]. Aeby, H. Catalase in vitro [Text] / H. Aeby // Methods Enzymol. - 1984. - Vol. 105. - P. 121-126.
- [70]. Afiyanti, M. J. Plant Physiol. [Text] / M. Afiyanti, H.J. Chen // - 2014.V. 171. № 2. P. 35–47.
- [71]. Ahmad, J. The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae [Text] / J. Ahmad, J.A. Hellebust // Plant Physiol. – 1988. – Vol. 88. – P.348-354.

- [72]. Alia, A. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage [Text] / Alia, P.P. Saradhi, P. Mohanty // J. Photochem. and Photobiol. – 1997. – Vol. 38. – P. 253-257.
- [73]. Arora D., Jain P., Singh N., Kaur H., Bhatla S.C. [Text] // Free Radical Res. - 2016. - Vol. 50. № 3. P. 291–303.
- [74]. Asada, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation excess photons [Text] / K. Asada // Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol. –1999. –Vol. 50. – P. 601-679.
- [75]. Astier, J., Lindermayr C. [Text] // Int. J. Mol. Sci. - 2012. - Vol. 13. № 11. P. 15193–15208.
- [76]. Banu, M.N.A., Hoque M.A., Watamable-Sugimoto M., Islam M.A., Uraji M., Matsuoka M., Nakamura Y., Murata Y. [Text] // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 2010. - Vol. 74. № 10. P. 2043–2049.
- [77]. Bartoli, C. G. Interrelationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves [Text] / C.G. Bartoli, J. Yu, F. Gomez, L. Fernandes, L. Meintosh, C.H. Foyer // J. Exp. Bot. – 2006. – Vol. 57. – P. 1621-1631.
- [78]. Bechtold, U., Richard O., Zamboni A., Gapper C., Geisler M., Pogson B., Karpinski S., Mullineaux P.M. [Text] //J. Exp. Bot. 2008. Vol. 59. № 2. P. 121–133.
- [79]. Beltran, B., Orsi A., Clementi E., Moncada S. [Text] // Br.J. Pharmacol. 2000. V. 129. № 5. P. 953–960.
- [80]. Blokhina, O. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review [Text] / O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt //Ann. Bot. –2003. – Vol. 91. – P. 179-194.
- [81]. Bouvier, F. Induction and Control of Chloroplast-Specific Carotenoid Genes by Oxidative Stress [Text] / F. Bouvier, R.A. Backhaus, B. Camara // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 273. -P. 30651-30659.

- [82]. Burkey, K.O. Effects of ozone on apoplast: cytoplasm partitioning of ascorbic acid in snap bean [Text] / K.O. Burkey // *Physiol. Plant.* – 1999. – Vol. 107. – P. 188-193.
- [83]. Chaki M., Valderrama R., Fernandez-Ocana A.M., Carreras A., Gomez-Rodriguez M.V., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. [Text] // *J. Exp. Bot.* - 2011. Vol. 62. № 6. P. 1803–1813.
- [84]. Cheeseman, J.M. Hydrogen Peroxide and Plant Stress: a Challenging Relationship [Text] / J.M. Cheeseman // *Plant stress. Global Science Books.* - 2007. - Vol. 1. - P. 4-15.
- [85]. Christou, A., Manganaris G.A., Papadopoulos I., Fotopoulos V. [Text] // *J. Exp. Bot.* - 2013. Vol. 64. № 7. P. 1953–1966.
- [86]. Cona A. Polyamine oxidase, hydrogen peroxide producing enzyme, up-regulated by light and down-regulated by auxin in the outer tissues of the maize mesocotyl [Text] / A. Cona, F. Cenci, M. Cervilli et al. // *Plant Physiol.* – 2003. - Vol. 131. - P. 803-813.
- [87]. Couee I., Sulmon C., Gouesbet G., Amrani A.E. [Text] // *J. Exp. Bot.* - 2006. Vol. 57. № 3. P. 449–459.
- [88]. Cramer, G.R. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective [Text] / G.R. Cramer, K. Urano, S. Delrot, M. Pezzotti, K. Shinozaki // *BMC Plant Biology.* – 2011. – Vol. 11. – P. 163.
- [89]. Cvetkovska M., Vanlerberghe G.C. [Text] // *Plant Cell Environ.* - 2013. Vol. 36. № 3. P. 721–732.
- [90]. Dabrowska, G. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family [Text] / G. Dabrowska, A. Kata, A. Goc, M. Szechynska-Hebda, E. Skrzypek // *Acta Biol.* – 2007. – Vol. 49. – P.7–17.
- [91]. DaSilva C.J., Modolo L.V. [Text] // *Acta Bot. Bras.* - 2018. Vol. 32. № 1. P. 150–160.

- [92]. Dat, J. Dual function of active oxygen species during plant stress responses [Text] / J. Dat, S. Vandenameele, E. Vranova', M. Van Montagu, D. Inze', F. Van Breusegem // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2000. – Vol. 57. – P. 779-795.
- [93]. Del Rio, L.A., Mitochondria and peroxisomal manganese superoxide dismutase: different expression during leaf senescence [Text] / L.A. Del Rio, L.M. Sandalio, D. Altomare // J. Exp. Bot. – 2003. – Vol. 54. – P. 923-933.
- [94]. Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B. [Text] // Plant Physiol. - 2006. - Vol. 141. № 2.P. 330–335.
- [95]. Delauney, A. J. Proline biosynthesis and osmoregulation in plant [Text] / A.J. Delauney, D. P. S. Verma // Plant J. – 1993. – Vol. 4. – P. 215-223.
- [96]. Deuschle, K. The role of delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation [Text] / K. Deuschle, D. Funk, G. Forlani, H. Stransky, A. Biehl, D. Leister, E. van der Graaf, R. Kunzee, W.B. Frommer // Plant Cell. – 2004. – Vol. 16. – P. 3413- 3425.
- [97]. Doke, N. Involvement of superoxide generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible Rose of Phytophthora intestines and Hyphul wall components [Text] / N. Doke // Plant physiol. Pathol. – 1983. –Vol. 23. – P. 345-357.
- [98]. Elthon, T.E. Proline oxidation in corn mitochondria: involvement of NAD, relationship to ornithine metabolism and sidedness on inner membrane [Text] / T.E. Elthon, C.R. Stewart // Plant Physiol. – 1982. – Vol.70. – P.567-572
- [99]. Finkel, T. and Holbrook, N.J. Review Article Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. [Text] Nature. –2000. – Vol. 408. - P. 239-247.
- [100]. Foyer, C. H. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context [Text] / C. H. Foyer, G. Noctor // Plant Cell Environ. – 2005. – Vol. 29. – P. 1056–1071.
- [101]. Foyer, Ch. H. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub1 [Text] / Ch. H. Foyer, G. Noctor // Plant Physiology. - 2011. - Vol. 155. – P. 2–18.

- [102]. Foyer, Ch. H. Defining robust redox signalling within the context of the plant cell [Text] / Ch. H. Foyer, G. Noctor // *Plant, Cell and Environment*. - 2015. – Vol. 38. – P. 239-239.
- [103]. Fu, J. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress [Text] / J. Fu, B. Huang // *Environ. Exp. Bot.* – 2001. – Vol. 45. – P. 105-114.
- [104]. Fu, P.N., Wang W.J., Hou L.X., Liu X. [Text] // *Acta Soc. Bot. Pol.* - 2013. - Vol. 82. № 4. P. 295–302.
- [105]. Gaber, A., Yoshimura K., Yamamoto T., Yabuta Y., Takeda T., Miyasaka H., Nakano Y., Shigeoka S. [Text] // *Physiol. Plant.* - 2006. - Vol. 128. № 2. P. 251–262.
- [106]. Gechev, T. S. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death [Text] / T. S. Gechev, F. Van Breusegem, J. M. Stone et al. // *BioEssays*. Wiley Periodicals Inc. – 2006. – Vol. 28. – P.1091–1101.
- [107]. Ghimire, B.K. Improved antioxidant activity in transgenic *Perillafrutescens* plants via overexpression of the  $\gamma$ -tocopherolmethyltransferase ( $\gamma$ -tmt) gene [Text] / B.K. Ghimire, E.S. Seong, C.O. Lee, J.G. Lee, C.Y. Yu, S.H. Kim, I.M. Chung // *Protoplasma*. – 2015. - Vol. 252. – P. 1285–1290.
- [108]. Giannopolitis, C.N. Superoxide dismutase. I. Occurrence in Higher plants [Text] / C.N. Giannopolitis S.K. Ries // *Plant Physiol.*–1977.–Vol. 59.–P. 309-314.
- [109]. Gill, S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [Text] / S. S. Gill, N. Tuteja // *Plant Physiol. And Biochem.* - 2010. – Vol. 48. – P. 909-930.
- [110]. Groß, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence response [Text] / F. Groß, J. Durner, F. Gaupels // *Frontiers in plant science*. – 2013. – Vol. 4. – P. 1-13.

- [111]. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life [Text] / B. Halliwell // *Plant Physiology*. - 2006. - Vol. 141. - P. 312–322.
- [112]. Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine* [Text] / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // Oxford: Clarendon Press. - 2015. 944 p.
- [113]. Hare, P.D. Metabolic implication of stress-induced proline accumulation in plant [Text] / P.D. Hare, W.A. Cress // *Plant Growth Regul.* - 1997. - Vol. 21. - P. 79-102.
- [114]. He, Y. Y. Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria [Text] / Y. Y. He, D.P. Häder // *J. Photochem. Photobiol.* - 2002. - Vol. 1 - P. 729-736.
- [115]. Hodges, D.M. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [Text] / D.M. Hodges, J.M. Delong, C.F. Forney, P.K. Prange. // *Planta*. - 1999. - Vol. 207. - P. 604-611.
- [116]. Hoque, M.A., Okuma E., Banu M.N.A., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. [Text] // *J. Plant Physiol.* - 2007. - Vol. 164. № 5. P. 553–561.
- [117]. Hossain, M.A., Fujita M. [Text] // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2010. - Vol. 16. № 1. P. 19–29.
- [118]. Hossain, M.A., Hoque M.A., Burritt D.J., Fujita M. [Text] / *Oxidative Damage to Plants Antioxidant Networks and Signaling* // Ed. P. Ahmad. Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo: Academic Press is an imprint of Elsevier, - 2014. P. 477–521.
- [119]. Hu, X., Jiang M., Zhang J., Zhang A., Lin F., Tan M. [Text] // *New Phytol.* - 2007. - Vol. 173. № 1. P. 27–38.
- [120]. Huang, A.H.C. Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves [Text] / A.H.C. Huang, A.J. Cavalieri // *Plant. Physiol.* - 1979. - Vol. 63. - P. 531-535.

- [121]. Huang, M. Responses of antioxidant system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity [Text] / M. Huang, Z. Guo // *Plant Biol.* – 2005. - Vol. 49. - P. 81-84.
- [122]. Huang, Z.-Q., Shao-Can Y.L., Hu L.-Y., Hu D. [Text] // *Proc.Natl. Acad. Sci., India, Sect. B: Biol. Sci.* - 2016. - Vol. 86. № 4. P. 887–895.
- [123]. Ignatova, Z. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant [Text] / Z. Ignatova, L.M. Gierasch // *PNAS.* – 2006. - Vol. 103. № 36. – P. 13357– 13361.
- [124]. Iyer, S. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice [Text] / S. Iyer, A. Capla // *Plant. Physiol.* – 1998. – Vol. 116. – P. 203 – 211.
- [125]. Jimenez-Del-Rio, M. The Bad, the Good, and the Ugly about Oxidative Stress [Text] / M. Jimenez-Del-Rio, C. Velez-Pardo // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* - 2012. - doi:10.1155/2012/163913.
- [126]. Jithesh, M.N. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress [Text] / M.N. Jithesh, S.R. Prashanth, K.R. Sivaprakash et al. // *J. of Genetics.* – 2006. - Vol. 85. - P. 237-254.
- [127]. Jones, D.P. [Text] // *Redox. Biol.* 2015. V. 5. P. 71–79.
- [128]. Kaul, S. Free radical scavenging potential of L proline: evidence from in vitro assay [Text] / S. Kaul, S.S. Sharma, I.K. Mehta // *Amino Acids.* – 2008. – Vol. 34. – P. 315-320.
- [129]. Kavi Kishor, P.B. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance [Text] / P.B. Kavi Kishor, S. Sangam, R.N. Amrutha, P.S. Laxmi, K.R. Naidu, K.R.S.S. Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, N. Sreenivasulu // *Curr. Sci.* – 2005. – Vol. 88. – P. 424-438.
- [130]. Kliebenstein, D.J. Superoxide dismutase in Arabidopsis. An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization [Text] / D.J. Kliebenstein, R.A. Monde, R.L. Last // *Plant Physiology.* – 1998. - Vol.118. – P. 637-650.

- [131]. Kohl, D.H. Proline accumulation, nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reducing) activity and activities of enzymes related to proline metabolism in drought-stressed soybean nodules [Text] / D.H. Kohl, E.J. Kennelly, Y. Zhu, K.R. Schubert, G. Shearer // J. Exp. Bot. – 1991. - Vol. 42. - P. 831-837.
- [132]. Kohl, D.H. Proline metabolism in N<sub>2</sub> fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis [Text] / D.H. Kohl, K.R. Schubert, M.B. Carter, C.H. Hageborn, G. Shearer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol. 85. – P. 2036-2040.
- [133]. Kolb, C.A. Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves [Text] / C.A. Kolb, M.A. Käser, J. Kopecký, G. Zotz, M. Riederer, E.E. Pfündel // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127. – P. 863-75.
- [134]. Kovacik, J. Variation of antioxidants and secondary metabolites in nitrogen-deficient Barley plantset [Text] / J. Kovacik, B. Klejdus, P. Babula, M. Jarošová // J.of Plant Physiol. – 2014. – Vol. 171. – P. 260-268.
- [135]. Krishnan, N. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress [Text] / N. Krishnan, M.B. Dickmanb, D. Beckera // Free RadicBiol Med. - 2008. – Vol. 44. № 4. –P. 671–681.
- [136]. Kristensen, C. Metabolic engineering of dhurrin in transgenic Arabidopsis plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome [Text] / C. Kristensen, M. Morant, C.E. Olsen, C.T. Ekstrom, D.W. Galbraith, B.L. Moller, S. Bak // ProcNatlAcadSci USA. – 2004. - 102:1779–1784.
- [137]. Kumar, G.N.M. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and freeradical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanumtuberosum*) seed-tubers [Text] / G.N.M. Kumar, N.R. Knowles // Plant. Physiol. – 1993. – Vol. 102. – P. 115-124.
- [138]. Kumar, N. Exogenous proline alleviates oxidative stress and increase vase life in rose (*Rosa hybrida* L. ‘Grand Gala’) [Text] / N. Kumar, M. Pal, A. Singh,

- R.S. Kumar, G.Ch. Srivastava // *Scientia Horticulturae*. – 2010. – Vol. 127. – P. 79–85.
- [139]. Kumar, V. *Managing Salt Tolerance in Plants. Molecular and Genomic Perspectives* [Text] / V. Kumar, V. Shriram, M.A. Hossain, P.B. Kavi Kishor // Boca Raton: Taylor & Francis Group, - 2016. P. 353–372.
- [140]. Kumari, G.J., Reddy A.M., Naik S.T., Kumar S.G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P. C., Chinta S. [Text] // *Biol. Plant.* - 2006. – Vol. 50. № 2. P. 219–226.
- [141]. Leisso, R.S. Chilling-related cell damage of apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit cortical tissue impacts antioxidant, lipid and phenolic metabolism [Text] / R.S. Leisso, D.A. Buchanan, J. Lee, J.P. Mattheis, C. Sater, I. Hanrahan, C.B. Watkins, N. Gapper, J.W. Johnston, R.J. Schaffer, M.L. Hertog, B.M. Nicolai, D.R. Rudell // *Physiol Plant.* – 2015. – Vol. 153. – P. 204-220.
- [142]. Liang, W., Wang M., Ai X. [Text] // *Sci. Hortic.* - 2009. – Vol. 123. № 1. P. 34–38.
- [143]. Liang, X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. [Text] // *Antioxid. Redox Signal.* - 2013. – Vol. 19. № 9. P. 998–1011.
- [144]. Li, Z.G., Gong M.J. [Text] // *J. Plant Biol.* - 2011. – Vol. 54. P. 358–364.
- [145]. Li, Z.G., Min X., Zhou Z.H. [Text] // *Front. Plant Sci.* - 2016. – Vol. 7: 1621.
- [146]. Logan, B.A. The role of antioxidant enzymes in photoprotection [Text] / B.A. Logan, D. Korniyev, J. Hardison, A.S. Holaday // *Photosynth Res.* – 2006. – Vol. 88. – P. 119–132.
- [147]. Lutts, S. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity tolerance as affected by proline and NaCl [Text] / S. Lutts, G. Guerrier // *Biologia Plantarum.* - 1995. - Vol. 37. № 4. - P. 577-586.
- [148]. Mackerness, S.A.H. Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280–320 nm) stress: What are the key [Text] / S.A.H. Mackerness // *Plant Growth Reg.* – 2000. - Vol. 32. - P. 27–39.

- [149]. Matysik, J. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plant [Text] / J. Matysik, B. Alia, B. Bhalu, P. Mohanty // *Curr.Sci.* – 2002. – Vol. 82. – P. 525-532.
- [150]. Middleton, E.M. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-b damage [Text] / E.M. Middleton, A.H. Teramura // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 103. – P. 741-752.
- [151]. Minocha, R. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship [Text] / R. Minocha, R. Majumbar, S. C. Minocha // *Frontiers in plant science.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1-17.
- [152]. Miret, J.A. Redox signaling and stress tolerance in plants: a focus on vitamin E [Text] / J.A. Miret, S. Munné-Bosch // *Ann N Y Acad Sci.* – 2015. - doi: 10.1111/nyas.12639.
- [153]. Mittova, V. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomalantioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersiconpennellii*. Plant [Text] / V. Mittova, M. Tal, M. Volokita, et al. // *Cell Envir.* – 2003. – P. 845-856.
- [154]. Miura, K. Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid [Text] / K. Miura, Ya. Tada // *Frontiers in plant science.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1-12.
- [155]. Molina, A. Involvement of endogenous salicylic acid content lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl [Text] / A. Molina, P. Bueno, M.C. Marlin, M.P. Rodriguez-Rosales, A. Belver, K. Venema, J.P. Danaire // - *New Phytol.* - 2002. – Vol. 156 - P. 409-415.
- [156]. Moschou, P. Plant polyaminecatabolism: the state of the art [Text] / P. Moschou, K. Paschalidisand, K. RoubelakisAngelakis // *Plant Signal. Behav.* – 2008. – Vol. 12. – P. 1061–1066.
- [157]. Mottioli, R. Proline accumulation in plants not only stress [Text] / R. Mottioli, G. Falasca, M. Trovato // *Plant Signaling and Behavior.* – 2009. – Vol. 4. – P. 1016-1018.

- [158]. Nakabayashi, R. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids [Text] / R. Nakabayashi, K. Yonekura-Sakakibara, K. Urano, M. Suzuki, Y. Yamada, T. Nishizawa, F. Matsuda, M. Kojima, H. Sakakibara, K. Shinozaki, A.J. Michael, T. Tohge, M. Yamazaki, K. Saito // *The Plant Journal*. – 2014. – Vol. 77. – P. 367–379.
- [159]. Nicolopoulos, D. Compatible solutes and in vitro stability of Salsola soda enzymes: proline incompatibility [Text] / D. Nicolopoulos, Y. Manetas // *Phytochemistry*. – 1991. – Vol. 30. – P. 411-413.
- [160]. Noctor, G. Asorbate and glutathione: keeping active oxygen under control [Text] / G. Noctor, C.H. Foyer // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* - 1998. – Vol. 49. – P. 249-279.
- [161]. Noctor, G., Mhamdi A., Foyer C.H. [Text] // *Plant Physiol.* - 2014. – Vol. 164. № 4. P. 1636–1648.
- [162]. Nounjan, N., Nghia P.T., Theerakulpisut P. [Text] // *J. Plant Physiol.* - 2012. – Vol. 169. № 6. P. 596–604.
- [163]. Passard, F. Two cell wall associated peroxidases from Arabidopsis influence root elongation [Text] / F. Passardi, M. Tognolli, M. De Meyer, C. Penel, C. Dunand // *Planta*. –2005. - Vol. 223. – P. 965-974.
- [164]. Paciolla, C., Paradiso A., de Pinto M.C. // *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses* [Text] / Eds. Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.J. Switzerland: Springer Inter. Pub. - 2016. P. 1–2.
- [165]. Phang, J.M. The Metabolism of Proline as Microenvironmental Stress Substrate [Text] / J.M. Phang, J. Pandhare, Y. Liu // *J Nutr.* – 2008. – Vol. 138., №10. – P. 2015 - 2030.
- [166]. Phang, J. M. The regulatory functions of proline and Δ<sup>1</sup>-pyrroline- 5-carboxylic acid [Text] / J. M. Phang // *Curr. Top. Cell. Regul.* – 1985. – Vol. 25. – P. 91-132.

- [167]. Pobedimskij, D.G. Mechanisms of antioxidant action in living organisms [Text] / D.G. Pobedimskij, E.B. Burlakova // Atmospheric oxidation and antioxidants. — Amsterdam. London. N. Y. Tokyo. - 1996. - Vol.3. — 578 p.
- [168]. Poljsak, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress [Text] / B. Poljsak // Oxidative medicine and cellular longevity // Hindawi Pub. Corp. — 2011. — Vol. 2011. — P. 1-15.
- [169]. Poljsak, B. The Neglected Significance of “Antioxidative Stress” [Text] / B. Poljsak, I. Milisav // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. — 2012. — Vol.10. - P. 1155.
- [170]. Qaisar, Mahmood Anjum Ascorbate and Glutathione: Protectors of Plants in Oxidative Stress [Text] / Mahmood Qaisar, Ahmad Raza, Sang-Soo Kwak, Rashid Audil, A. Naser // -2010. — P. 209-229.
- [171]. Rajendrakumar, C.S. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase [Text] / C.S. Rajendrakumar, B.V. Reddy, A.R. Reddy // Biochem Biophys Res Commun. — 1994. — Vol. 201. — P. 957-963.
- [172]. Ramel, F. [Text] / F. Ramel, C. Sulmon, M. Bogard, I. Couee, G. Gouesbet // BMC Plant Biol. 2009. — Vol. 9: 28.
- [173]. Ranieri, V.M. Mechanical Ventilation as a Mediator of Multisystem Organ Failure in Acute Respiratory Distress Syndrome [Text] / V.M. Ranieri, F. Giunta, P.M. Suter, A.S. Slutsky // JAMA. - 2000. — Vol. 284. — P. 43-44.
- [174]. Rao, M.V. [Text] / M.V. Rao, G. Paliyath, D.P. Ormrod, D.P. Murr, C.B. Watkins // Plant Physiol. 1997. — Vol. 115. № 1. P. 137–149.
- [175]. Rao, V.M. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana [Text] / V.M. Rao, G. Paliyath, P.D. Ormrod // Plant Physiol. — 1996. - Vol.110. - P.125-136.
- [176]. Rentel, M.C. [Text] / M.C. Rentel, M.R. Knight // Plant Physiol. - 2004. - Vol. 135. № 3. P. 1471–1479.

- [177]. Ri, L.A. Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes [Text] / L.A. Rio, L.M. Sandalio, F.J. Corpas, E. Lopez-Huertas, J.M. Palma, G.M. Pastori // *Physiologia Plantarum*. - 1998. - Vol. 104. - P. 673-680.
- [178]. Salwa, A. Protective role of  $\alpha$ -tocopherol on two *Vicia faba* cultivars against seawater-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of anti-oxidative system [Text] / A. Salwa T. Orabi Magdi, Abdelhamid // *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. - 2016. – Vol. 15., № 2. - P. 145-154.
- [179]. Samuel, D. Proline is a protein solubilizing solute [Text] / D. Samuel, R.K.S. Kumar, G. Jayaramoan, P.W. Yang, C. Yu // *Biochem. and Mol. Biology*. – 1997. - Vol. 41. – P. 235 – 242.
- [180]. Saradhi, A. Proline accumulation under heavy metal stress [Text] / A. Saradhi, P.P. Saradhi // *Journal of Plant Physiology*. – 1991. - Vol. 138. - P. 554–558
- [181]. Scebba, F. O<sub>3</sub> – induced changes in the antioxidant systems and their relationship to different degrees of susceptibility of two clover species [Text] / F. Scebba, I. Pucciarcli, G.F. Soldatini, A. Ranicri // *Plant Sci*. – 2003. - Vol. 165. - P. 583-593.
- [182]. Schobert, B. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins [Text] / B. Schobert, H. Tschesche // *BiochimBiophysActa*. – 1978. – Vol. 541. – P. 270-277.
- [183]. Shan, C. [Text] / C. Shan, S. Zhang, X. Ou // *Protoplasma*. - 2018. - Vol. 255. № 4. P. 1257–1262.
- [184]. Shan, C. [Text] / C. Shan, S. Zhang, Y. Zhou // *Cereal Res. Commun*. - 2017. - Vol. 45. № 3. P. 411–420.
- [185]. Shao, H.B. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells [Text] / H.B. Shao, L.Ye. Chu, Zh.H. Lu, C.M. Kang // *International Journal of Biological Sciences*. – 2008. – Vol. 4., №1 – P. 8-14.
- [186]. Shao, H.B. Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling [Text] / H.B. Shao, Z.S. Liang, M.A. Shao, B.C. Wang // *Biointerf*. – 2005. – Vol. 42. - P.107–113.

- [187]. Sharma, P. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes [Text] / P. Sharma, R.S. Dubey // *Plant Science*. – 2004. – Vol. 167. – P. 541-550.
- [188]. Shen, B. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals [Text] / B. Shen, R.C. Jensen, H.J. Bohnert // *Plant Physiology*. – 1997. - Vol. 115. -P. 527-532.
- [189]. Shi, H., [Text] / H. Shi, T. Ye, Z. Chan // *Plant Physiol. Biochem.* - 2014. - Vol. 74. P. 99–107.
- [190]. Shigeoka, S. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [Text] / S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, K. Yoshimura // *J. Exp. Bot.* - 2002. - Vol. 53.- P. 1305–1319.
- [191]. Siripornadulsil, S. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae [Text] / S. Siripornadulsil, S. Traina, D.P. Verma, R.T. Sayre // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14. – P. 2837-47.
- [192]. Slack, E.N. The isolation of mitochondria from dipteran flight muscle [Text] / E.N. Slack, E. Bursell // *BiochimBiophysActa*. – 1976. – Vol. 449. – P. 491-499.
- [193]. Smirnoff, N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society* [Text] / N. Smirnoff // *B: Biological Sciences*. - 2000. – Vol. 355. - P. 1455–1464.
- [194]. Smirnoff, N. Hydroxyl Radicals Scavenging Activity of Compatible Solutes [Text] / N. Smirnoff, Q.J. Cumes // *Phytochemistry*. - 1989. - Vol. 28. - P. 1057-1059.
- [195]. Stein, H. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants [Text] / H. Stein, A. Honig, G. Miller, O. Erster, H. Eilenberg, L.N. Csonka, L. Szabados, C. Koncz, A. Zilberstein // *Plant Science*. – 2011. – Vol. 181. – P. 140-150.
- [196]. Szarka, A. The Ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response [Text] / A. Szarka, B. Tomasskovics, G. Bánhegyi // *Int. J. Mol. Sci.* - 2012. – Vol. 13. – P. 4458-4483.

- [197]. Tanner, J.J. Structural biology of proline catabolism [Text] / J.J. Tanner // *Amino Acids*. – 2008. – Vol. 35. – P. 719-30.
- [198]. Verbruggen, N. Proline accumulation in plants: a review [Text] / N. Verbruggen, C. Hermans // *Amino Acids*. – 2008. – Vol. 35. – P.753-759.
- [199]. Verslues, P. E. Proline metabolism and its implications for plantenvironment interaction [Text] / P.E. Verslues, S. Sharma // *The Arabidopsis Book American Society of Plant Biologists*. – 2010. – P. 1-23.
- [200]. Yan Z., [Text] / Z. Yan, S. Guo, S. Shu, J. Jun, T. Tezuka // *Afr. J. Biotechnol.* - 2011. – Vol. 10. № 80. P. 18381–18390.
- [201]. Yang, T., Poovaiah B.W. [Text] / T. Yang, B.W. Poovaiah // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2002. – Vol. 99. № 6. P. 4097–4102.
- [202]. Yoshimura, K., [Text] / K. Yoshimura, Yu. Yabuta, T. Ishikawa, S. Shigeoka // *Plant Physiol.* -2000. – Vol. 123. № 1. P. 223–233.
- [203]. Zhang, A. [Text] / A. Zhang, M. Jiang, J. Zhang, H. Ding, S. Xu, X. Hu, M. Tan // *New Phytol.* - 2007. – Vol. 175. № 1. P. 36–50.

## Список публикаций соискателя учёной степени

### Статьи в рецензируемых журналах

1. **А. Хамроева, Х.М.** Сравнительное изучение ростовых процессов у мутантов и дикой формы арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* (L.)) при воздействии различной концентрации NaCl / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, О.В. Усманова, М.К. Гулов // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. - 2016. - № 1-2 (193). - С. 44-50.
2. **А. Хамроева, Х.М.** Влияние экзогенных антиоксидантов на перекисное окисление липидов у растений арабидопсиса в условиях засоления / Х.М. Хамроева, Н.Х. Норкулов, Б.Б. Джумаев // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. - 2018. - Т. 61. - № 3. - С. 307-312.
3. **А. Хамроева, Х.М.** Влияние экзогенных антиоксидантов на содержание аскорбиновой кислоты в растениях *Arabidopsis thaliana* L. при стрессе / Х.М. Хамроева, И.С. Каспарова, Б.Б. Джумаев // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. - 2021. - № 2 (213). - С. 44-50.
4. **А. Хамроева, Х.М.** Экзогенные антиоксиданты и фотосинтез в условиях хлоридного засоления у мутантных линий (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh). Вестник Бохтарского государственного университета имени Носира Хусрава (научный журнал) серия естественных наук, 2/4 (93), Бохтар-2021. - Стр. 102-108.
5. **А. Хамроева, Х.М.** Шаклҳои фаъоли оксиген ва системаи антиоксиданти дар организмҳои зинда / М.К. Гулов, Н.Х. Норкулов, Х.М. Хамроева, К. Партоев // Авҷи Зухал. №1. 2020с., ш. Душанбе, - С.195-203.

### Статьи и тезисы в сборниках научных конференций

6. **А. Хамроева, Х.М.** Изучение некоторых физиолого-биохимических параметров у разных мутантов Арабидопсиса (*ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.) под воздействием хлоридного засоления / Б.Б. Джумаев, Х.М. Хамроева, М. Нигмонов, З.Б. Давлятназарова, М.К. Гулов // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Иркутск, 12 – 15 сентября 2016г. С. 83-84.

7. **А. Хамроева, Х.М.** Изучение окислительного стресса у разных по устойчивости к NaCl растений картофеля INVITRO / З.Б. Давлятназарова, И.С. Каспарова, Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, К.А. Алиев // Материалы Всероссийской с международным участием научной конференции Саранск, ФГБОУ «МГУ им. Н.П. Огарёва», 15 – 18 мая 2016г. - С.103-105.
8. **А. Хамроева, Х.М.** Влияние экзогенных антиоксидантов на растения *Arabidopsisthaliana* (L.) Heynh при воздействии засоления / Б.Б. Джумаев, Х.М. Хамроева // Материалы XIII научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной «Году развития туризма и народных ремесел», том 2, Душанбе, 27 апреля 2018г. - С. 315.
9. **А. Хамроева, Х.М.** Экзогенные антиоксиданты и перекиное окисление липидов в условиях засоления у мутантной линии *Arabidopsisthaliana* (L.) Heynh / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, З.Б. Давлятназарова, К.А. Алиев // Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых. Иркутск, 10-15 июля 2018г. - С. 795-798.
10. **А. Хамроева, Х.М.** Экзогенные антиоксиданты и активность каталазы в условиях засоления у дикой формы и мутанта *Arabidopsisthaliana* (L.) Heynh / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев // Материалы XIV международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвящённой «Годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021)», Душанбе, 19 апреля 2019г. - С. 617.
11. **А. Хамроева, Х.М.** Влияние экзогенных антиоксидантов на содержание аскорбиновой кислоты в растениях Арабидопсиса при хлоридном засолении / З.Б. Давлатназарова, Х.М. Хамроева, И.С. Каспарова, Б.Б. Джумаев // Материалы Республиканской научной конференции «Адаптация живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды», Душанбе, 2019. - С. 20-21.
12. **А. Хамроева, Х.М.** Фотосинтетические параметры – индикаторы адаптации растений в условиях хлоридного засоления / Б.Б. Джумаев, М.Х. Атоев, Х.М. Хамроева, А. Абдуллаев // Материалы Республиканской научной конференции

- «Адаптация живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды», Душанбе, 2019. - С.22-24.
13. **А. Хамроева, Х.М.** Содержание аскорбиновой кислоты в условиях хлоридного засоления при обработке растений Арабидопсиса экзогенными антиоксидантами / Х.М. Хамроева, З.Б. Давлятназарова, Б.Б. Джумаев // Материалы международной научно-практической конференции (67-ой годичной) посвящённой 80-летию ТГМУ им. Абуали ибни Сино и «Годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021)», Душанбе, 29 ноября 2019г. - С. 305-306.
  14. **А. Хамроева, Х.М.** Влияние экзогенных антиоксидантов на интенсивность потенциального фотосинтеза растений *Arabidopsisthaliana* (L.) Heunh. в условиях хлоридного засоления / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, З.Б. Давлятназарова, И.С. Каспарова, О.В. Усманова // «Изучение, развитие, сохранение, перспективы эффективного использования биоразнообразия генофонда хлопчатника и других культур». Душанбе. 2019. - С.368-369.
  15. **А. Хамроева, Х.М.** Интенсивность потенциального фотосинтеза *Arabidopsisthaliana* (L.) Heunh. в условиях хлоридного засоления / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, З.Б. Давлятназарова, И.С. Каспарова, О.В. Усманова // Достижения современной биохимии в Таджикистане Материалы Республиканской конференции Душанбе, 2020г. - С.167-168.
  16. **А. Хамроева, Х.М.** Содержание пролина у Арабидопсиса в условиях хлоридного засоления при обработке экзогенным антиоксидантом / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, З.Б. Давлятназарова, И.С. Каспарова // Фундаментальные основы инновационного развития науки и образования. Материалы международной научно-практической конференции (68-ой годичной), посвященной «Годам развития села, туризма и народных ремёсел (2019-2021)», Том 3, 27 ноября 2020г. - С. 514-516.
  17. **А. Хамроева, Х.М.** Физиолого-биохимические параметры фотосинтеза у бобовых растений в условиях хлоридного засоления / М.Х. Атоев, Б.Б. Джумаев, Х.М. Хамроева, А. Абдуллаев // Материалы республиканской

- научной конференции «Боиразнообразие горных экосистем Памира в связи с изменением климата». Таджикистан, г. Хорог, 22-23 сентября 2021 г. Стр 16-17.
18. **А. Хамроева, Х.М.** Содержание пролина в листьях бобовых растений в стрессовых условиях / Б.Б.Джумаев, М.Х. Атоев, Х.М. Хамроева, А. Абдуллаев // Материалы IX-ой международной конференции “Экологические особенности биологического разнообразия», Таджикистан, г. Куляб, 7-8 октября 2021 г. Стр. 168-170.
19. **А. Хамроева, Х.М.** Влияние экзогенных антиоксидантов на метаболизм  $^{14}\text{C}$  у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. в условиях хлоридного засоления / Х.М. Хамроева, Б.Б. Джумаев, З.Б. Давлятназарова, И.С. Каспарова // Материалы II-ой республиканской научной конференции «Адаптация живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды», Душанбе, 24 сентября 2021 г. Стр. 76-79.