На правах рукописи



БОТАЛОВА КСЕНИЯ ИВАНОВНА

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА СОСТОЯНИЕ ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ И РАЗВИТИЕ *TRITICUM AESTIVUM* L., *SECALE CEREALE* L., *PISUM SATIVUM* L.

1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь, 2025

Работа выполнена на кафедре физиологии растений и экологии почв Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Научный руководитель: **Еремченко Ольга Зиновьевна,**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Загоскина Наталья Викторовна,**
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева (ИФР РАН), ведущий научный сотрудник, заведующая группой фенольного метаболизма растений.

Макарова Людмила Евгеньевна,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (СИФИБР СО РАН), ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией физиологии устойчивости растений.

Ведущая организация: Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН), г. Петрозаводск.

Защита диссертации состоится «06» февраля 2026 г. в 14.00 ч на заседании диссертационного совета 24.1.210.01 (Д 003.047.01), созданного при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений СО РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132.

Факс: (3952) 510-754, e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГБУН Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений СО РАН: http://www.sifibr.irk.ru/

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «____»_____ 2025 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук Коротаева Наталья Евгеньевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Адаптивная способность растений – один из основных факторов, определяющих ареалы распространения видов на планете, возможность их интродукции и культивирования [Духовский и др., 2003; Трунова, 2007; Gill, Tuteja, 2010; Давлатназарова, 2016]. Оценка адаптивного потенциала растений невозможна без знания физиологических основ их устойчивости.

Стрессор – сильнодействующий фактор внешней среды, способный вызвать в организме повреждение и даже привести к смерти, т.к. по силе превышает адаптивные возможности организма. Концепция стресса у растений до сих пор остается глубоко обсуждаемой и противоречивой. Перспективной стратегией для установления показателей стрессового состояния растений считают использование окислительно-восстановительных маркеров (окислительный стресс и антиоксиданты) [Jansen, Potters, 2017; Sousa et al., 2023].

Антиоксидантной защите растений при стрессе, вызванном механическими, физическими, химическими и биологическими факторами окружающей среды, посвящено множество современных работ, в том числе, обзорных [Demidchik, 2015; Noctor et al., 2015; Загоскина, Назаренко, 2016; Прадедова и др., 2017; Колупаев, Карпец, 2019; Dumanovic et al., 2020; Yang et al., 2021]. Одним из наименее изученных стрессов, по мнению ученых, остается стресс, обусловленный щелочной или кислой реакцией корневой среды [Latef, Tran, 2016; Zhang et al., 2017; Bhuyan et al., 2019; Sagervanshi et al., 2022].

Под воздействием кислой и щелочной реакции нарушаются строение и функции клеток корня растений [Ктиторова, Скобелева, 2008; Yang et al., 2008; Radi et al., 2012; Lv et al., 2014; Shavrukov, Hirai, 2016], что повышает риск возникновения стресса от засухи [Bhuyan et al., 2019]. При осмотическом стрессе в клетках растений концентрируются низкомолекулярные соединения, снижающие водный потенциал цитозоля [Guo et al., 2017; Arif et al., 2020; Yang et al., 2021]. В связи с этим представляет интерес участие осмопротекторных соединений в процессах адаптации растений к кислотному и щелочному стрессу.

Электрохимический градиент протонов служит движущей силой, обеспечивающей транспорт ионов и метаболитов через цитоплазматическую мембрану; под воздействием кислых и щелочных растворов эффективность процессов поддержки pH цитоплазмы может уменьшиться [Bhuyan et al., 2019; Sagervanshi et al., 2022]. Активизацию механизмов pH-гомеостаза в растениях в условиях стресса связывают с изменениями в метаболизме органических кислот [Lopez-Bucio et al., 2000; Liu, Shi, 2010; Shavrukov, Hirai, 2016].

В зависимости от стресс-фактора и генотипа качественно отличаются ответные реакции растений [Jansen, Potters, 2017; Wang et al., 2022; Wu et al., 2022]. К перспективным маркерам стрессового состояния растений относят содержание воды в тканях, антиоксидантную защиту, концентрацию пролина, восстановительное состояние аскорбата, концентрацию H_2O_2, уровень перекисного окисления липидов [Silveira, Sousa, 2024]. Наиболее подходит для изучения стрессового состояния лист, т.к. в нем представлена центральная часть метаболизма растений и системных реакций на эндогенные и внешние

возмущения [Souza, Cardoso, 2003; Jansen, Potters, 2017; Silveira, Sousa, 2024].

Цель работы. Целью данной работы было выявить ответные реакции пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.), ржи посевной (*Secale cereale* L.) и гороха посевного (*Pisum sativum* L.) на кислотность и щелочность корневой среды.

Задачи:

1. Определить скорость роста и прирост надземной массы пшеницы мягкой, ржи посевной и гороха посевного, содержание воды в листьях растений в условиях кислотного и щелочного стрессов.
2. Провести сравнительное изучение содержания пероксида водорода, пероксидазной и каталазной активностей, количества восстановленной аскорбиновой кислоты и проанализировать влияние низких и высоких значений pH корневой среды на про-/антиоксидантную систему листьев пшеницы, ржи и гороха.
3. Исследовать изменения в содержании пролина, флавоноидов и некоторых органических кислот (щавелевой, яблочной, лимонной, янтарной) в листьях и оценить их возможную роль в адаптации растений при кислотном и щелочном стрессах.

Объекты исследования – пшеница мягкая яровая (*Triticum aestivum* L.) сорта Горноуральская, рожь посевная озимая (*Secale cereale* L.) сорта Фаленская 4 и горох посевной (*Pisum sativum* L.) сорта Ямальский РС I.

Положения, выносимые на защиту:

1. На начальных этапах развития кислотного и щелочного стрессов активизируются про-/антиоксидантные системы листьев пшеницы мягкой, ржи посевной и гороха посевного.
2. Участие низкомолекулярных соединений (пролин, флавоноиды, органические кислоты) в защитных реакциях растений при кислотном и щелочном стрессах является видоспецифичным и зависит от направленности изменений pH корневой среды.

Научная новизна. Впервые на примере трех видов культурных растений установлена видоспецифичность системных реакций листьев в первые часы развития кислотного и щелочного стресса. За 24-48 часов стрессового состояния снизились прирост надземной части растений и содержание воды в листьях. Показано, что стресс-реакции пшеницы, ржи и гороха на низкие и высокие значения pH корневой среды проявились в изменении содержания пероксида водорода, повышении уровней активности антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидаз) и увеличении содержания восстановленной аскорбиновой кислоты в листьях. Установлено, что в условиях кислотного и щелочного стресса пролин и флавоноиды участвовали в защитных реакциях листьев злаков; горох отличился снижением уровня содержания этих многофункциональных соединений. Листья пшеницы по-разному аккумулировали пролин и флавоноиды в зависимости от направленности изменений pH корневой среды.

Впервые показано, что ответной реакцией растений на кислотность и щелочность корневой среды являлись изменения в метаболизме и содержании органических кислот в листьях. В листьях злаков при кислотном и щелочном

стрессах количество карбоновых кислот (яблочной, лимонной, янтарной) снизилось из-за возможного нарушения гликолиза. На примере гороха выявлено, что аккумуляция органических кислот в листьях при низких и высоких значениях pH имеет адаптационный характер и может быть направлена на поддержание осмотического баланса и pH-гомеостаза.

Достоверность научных положений и выводов подтверждена применением современных методов физиологии и биохимии растений. Для интерпретации полученных данных произведен анализ имеющейся литературы по теме исследований. Результаты исследований не противоречат имеющимся представлениям в современной и отечественной научной литературе. Применение статистического анализа полученных данных подтверждает достоверность выводов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Годичном собрании Общества физиологов растений России, научной конференции «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Крым, Судак, 2017), на Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), на IX Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019), на XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019» (Пермь, 2019), на Региональной студенческой научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии» (Пермь, 2020), на II Международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2020), XIII Международной конференции ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2022» (Пермь, 2022), на X съезде Общества физиологов растений России (Уфа, 2023).

Научно-практическая значимость работы. Результаты исследований расширяют фундаментальные представления о системном ответе листьев растений разного генотипа в условиях кислотного и щелочного стрессов. Выявленные маркеры стрессового состояния растений, связанные с про-/антиоксидантным метаболизмом листьев могут использоваться в целенаправленном подборе видов и сортов растений для селекционно-генетических программ и в интродукции растений, устойчивых к низким и высоким значениям pH.

Совокупность теоретических обобщений и полученных экспериментальных данных используется в курсах лекций «Физиология растений», «Физиология и биохимия устойчивости растений» в ПГНИУ.

Личный вклад автора в проведенные исследования. Определение направления диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем д.б.н. Еремченко О.З. Автором самостоятельно изучена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке и написании публикаций по диссертационной теме. Экспериментальная работа выполнена автором самостоятельно.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Работа выполнена в рамках специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений. Изучена роль антиоксидантной, осмопротекторной и pH-регулирующей систем, значение некоторых низкомолекулярных метаболитов в листьях пшеницы мягкой, ржи посевной и гороха посевного при кислотном и щелочном стрессах (соответствует пункту «Ответ растений на внешние воздействия, адаптация и устойчивость к абиогенным факторам окружающей среды»).

Структура диссертационной работы. Работа изложена на 171 страницах А4 и состоит из 3-х глав, включающих 28 рисунков и 12 таблиц. Глава 1 представляет собой обзор научной литературы, где приведены современные представления об окислительном стрессе, системе антиоксидантной защиты и механизмах pH-регуляции, а также о реакции растений на кислотность и щелочность корневой среды. Глава 2 описывает объекты, методы работы и ход экспериментальных исследований. Глава 3 излагает результаты работы, их сравнение и обсуждение. Список литературы состоит из 225 источников, в том числе 124 источника на иностранных языках. Работа включает 33 приложения.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в периодических журналах из Перечня ВАК РФ, 17 публикаций представлены тремя статьями в рецензируемых журналах и материалами конференций.

Благодарности. Автор диссертации выражает благодарность научному руководителю доктору биологических наук, профессору кафедры физиологии растений и экологии почв ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» О.З. Еремченко за многочисленные консультации при подготовке диссертации. Соискатель признателен за сотрудничество доцентам Р.В. Кайгородову и О.А. Четиной, благодарен всем преподавателям и студентам кафедры физиологии растений и экологии почв ФГАОУ ВО «ПГНИУ».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований были выбраны пшеница мягкая яровая, рожь посевная озимая и горох посевной. Выбор объектов связан с разной требовательностью растений к реакции почвенной среды [Вальков и др., 2004].

Предварительно замоченные семена злаков и гороха высаживали в умеренно увлажненный вермикулит в контейнеры размером 16 х 12 х 7 см. Растения злаков в течение 5 дней выращивали при температуре 25° С и длине светового дня – 18 часов в климатической камере. На 6-й день в корневую среду растений добавляли кислый или щелочной раствор; контрольный вариант поливали дистиллированной водой. Горох выращивали при таких же условиях, но в течение 14 дней; на пятнадцатый день в корневую среду растений внесли растворы с разной pH.

Кислую среду раствора (pH=3) создавали уксусной кислотой, щелочную среду раствора (pH=10) – глицин NaOH буфером. В составе щелочного буфера присутствует Na^+, его концентрация составляла 8,5 мМ, поэтому токсическим и осмотическим воздействием этого иона на растение решили пренебречь. Реакцию среды в вермикулите контролировали путем измерения на иономере в течение

двух суток; через 24 ч реакция корневой среды была устойчивой, через 48 ч кислотность и щелочность понизились примерно на 0,5 pH. Вермикулит Ковдорского месторождения способен поддерживать в питательной среде заданный уровень pH [Иванова, Иноземцева, 2010].

Длину и массу растений замеряли по вариантам опыта в 30-кратной повторности через 24 ч и 48 ч после изменения pH корневой среды. Распределение данных по длине и массе растений не отличалось от нормального распределения при уровне значимости P=0,055–0,706, характер распределения тестировали с помощью критериев Колмогорова и омега-квадрат. Значимость различий длины и массы растений в вариантах с pH 3 и pH 10 с показателями в контрольном варианте опыта определяли с помощью критерия Стьюдента; значимыми считали различия между сравниваемыми средними величинами с доверительной вероятностью 95% и выше (уровень значимости $P < 0,05$).

Для определения содержания воды через 24 ч и 48 ч после стресс-воздействия в каждом варианте опыта отбирали листья десяти растений в 6-кратной повторности. После их высушивания при температуре 60°C (до постоянного веса) по потере воды вычисляли оводненность в %.

Отбор растительных проб для биохимических исследований проводили через 0,5, 1, 2, 3, 4 и 24 ч после измененияpH корневой среды; пробы листьев отбирали равномерно по всей площади контейнера.

В сырой массе листьев растений измеряли содержание пероксида водорода, активности пероксидаз и каталазы, содержание восстановленной аскорбиновой кислоты. Содержание пролина, флавоноидов и некоторых органических кислот (щавелевой, лимонной, яблочной, янтарной) определяли в сухой массе растений. Содержание пероксида измеряли ферротиоцианатным методом [Sagisaka, 1976], активность пероксидаз – методом А.Н. Бояркина [1951] на фотоэлектроколориметре (КФК-3), каталазную активность – методом титрования [Королюк, 1988], содержание восстановленной аскорбиновой кислоты – методом Г.Н. Чупахиной [2000], количество пролина – по Bates [1973] на спектрофотометре (СФ-2000, Россия). Флавоноиды извлекали 70% раствором этанола; суммарное их содержание измеряли методом спектрофотометрии продуктов взаимодействия с 5% спиртовым раствором $AlCl_3$ при длине волны 415 нм. Водный экстракт органических кислот исследовали методом обращено-фазной высоко эффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией (ОФ ВЭЖХ УФ) на приборе: «Dionex, Ultimate 3000».

Биологическая и аналитическая повторность определения биохимических показателей – трехкратная. Значимость различий в содержании воды и биохимических показателей в листьях растений в вариантах pH 3 и pH 10 с показателями в контрольном варианте опыта рассчитывали дисперсионным непараметрическим методом с помощью критерия Крускал-Уоллиса с доверительной вероятностью 95% и выше (уровень значимости $P < 0,05$). Зависимость между биохимическими показателями растений рассчитывали методом непараметрической корреляции с помощью критериев Спирмена и Кенделла при $P < 0,05$.

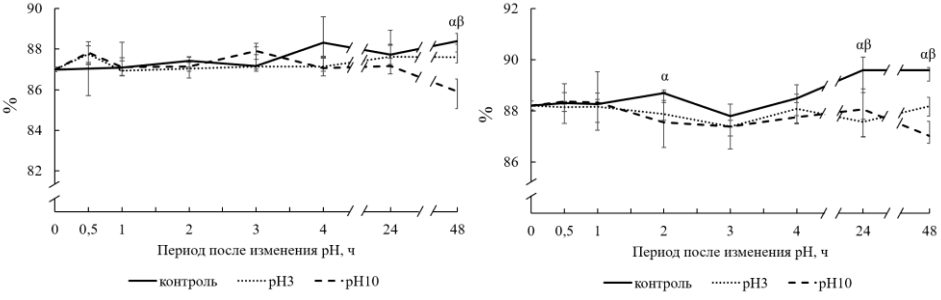
Математическую обработку данных проводили в программах Statistica 10

(StatSoft 7) и Past (версия 4.03).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Растения испытывали ингибирование ростовых процессов под воздействием растворов с высоким и, особенно, низким значением pH. Через 24 ч и 48 ч на фоне кислой реакции корневой среды наблюдали торможение роста надземной части пшеницы, ржи и гороха, а также снижение прироста массы ржи и гороха, по сравнению с контролем. При щелочной реакции корневой среды в эти периоды наблюдений отмечали уменьшение длины злаков и снижение массы надземной части ржи относительно контрольных растений.

Относительное содержание воды в листьях пшеницы снизилось на 1-2,5% через 48 ч после изменения pH корневой среды, по сравнению с содержанием в контрольных растениях (рис. 1). Такое же уменьшение количества воды в листьях ржи установили в два последних периода наблюдений (24 и 48 ч). В листьях гороха оводненность листьев снизилась на 1-1,5% только при развитии кислотного стресса.



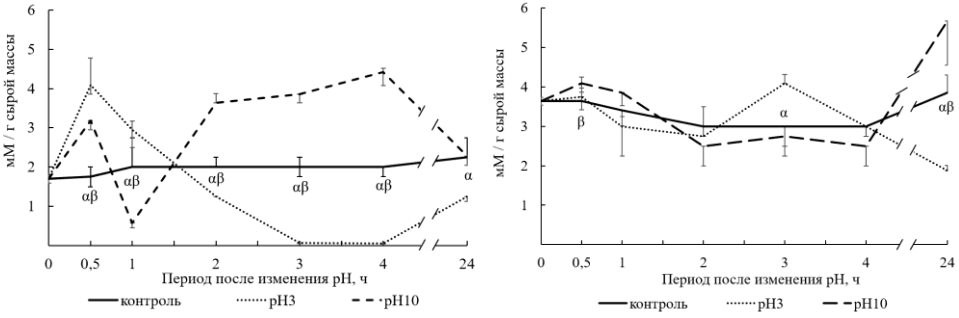
А Б

Рисунок 1 – Изменение оводненности листьев пшеницы (А) и ржи (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

В среде с избытком протонов и гидроксид-ионов нарушалась водопоглощающая функция корня [Захарин, Паничкин, 2005]. Снижение содержания воды в листьях растений в условиях кислотного и щелочного стрессов усиливает риск обезвоживания при засухе [Bhuyan et al., 2019]. При недостатке свободной воды в клетках растений продуцируется избыток АФК, против которых активизируются ферменты и синтезируются низкомолекулярные многофункциональные соединения [Yang et al., 2022]. При смене реакции корневой среды в листьях всех трех растений отмечали изменения в содержании пероксида водорода (рис. 2). В течение периода наблюдений увеличение концентрации H_2O_2 в листьях сменилось снижением его концентрации относительно контрольных величин.

Накопление H_2O_2 в растительной клетке не только указывает на развитие окислительного стресса, но и служит сигналом для экспрессии генов, регулирующих синтез антиоксидантных ферментов [Прадедова и др., 2017; Wu et al., 2022]. Однако это повышение концентрации АФК, как правило, кратковременное и локальное [Guo et al., 2015; Demidchik, 2015; Noctor et al., 2015; Четина и др., 2020].



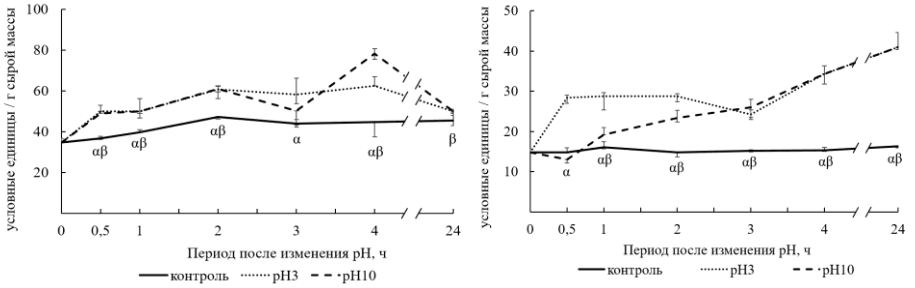
А Б

Рисунок 2 – Изменение содержания пероксида водорода в листьях пшеницы (А) и ржи (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

Активность пероксидаз в листьях злаков повышалась через 0,5 ч после изменения pH корневой среды (рис. 3), возможно, такая быстрая ответная реакция обусловлена присутствием запасного пула ферментов в мембранах и клеточных стенках [Минибаева, Гордон, 2003]. В листьях ржи повышенная активность пероксидаз прослежена в течение всего периода наблюдений. Эти данные соответствуют информации об активизации пероксидаз в растениях под влиянием кислой реакции среды и щелочного засоления [Zelinovf et al., 2010; Wang et al., 2014; Latef, Tran, 2016; Чернышева и др., 2024]. Пероксидазы участвуют в генерации супероксидного анион-радикала и H_2O_2 [Takahama, 2004]. В то же время при окислительном стрессе пероксидазы способны к элиминации нескольких АФК, с их активизацией связывают эффективность антиоксидантной системы растений [Прадедова и др., 2017; Wu et al., 2022]. Следовательно, значимые изменения концентрации пероксида водорода, а также повышение активности пероксидаз указывают на общее усиление про-/антиоксидантного метаболизма в листьях пшеницы и ржи.

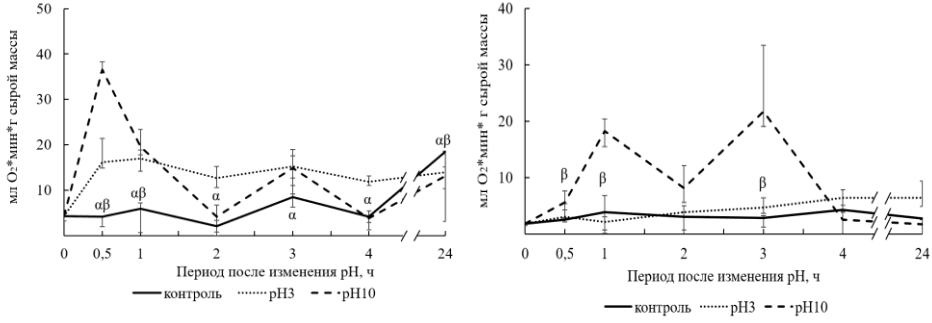
Усиление активности каталазы у пшеницы спустя 0,5-4 ч после изменения pH наблюдали в обоих вариантах опыта, а в листьях ржи – преимущественно при щелочной реакции среды (рис. 4). Каталаза быстро разлагает H_2O_2 до H_2O [Yang et al., 2021; Wu et al., 2022], одновременное повышение уровня активности каталазы и пероксидаз в первые часы развития кислотного и щелочного стресса можно считать маркером усиления антиоксидантной защиты листьев пшеницы.



А Б

Рисунок 3 – Изменение пероксидазной активности в листьях пшеницы (А) и ржи (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$



А Б

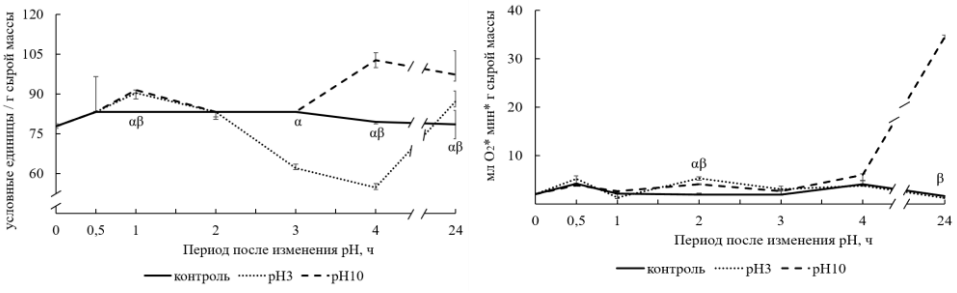
Рисунок 4 – Изменение каталазной активности в листьях пшеницы (А) и ржи (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

В листьях гороха в первые часы после изменения pH корневой среды повышенную пероксидазную и каталазную активности чаще отмечали в условиях щелочного стресса, чем при кислотном стрессе, особенно, к концу периода наблюдений (рис. 5).

Содержание аскорбиновой кислоты в растениях положительно коррелирует с их устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, т.к. аскорбиновая кислота прямо или косвенно снижает количество АФК [Foyer, 2017; Yang et al., 2021]. В пшенице в течение всего периода наблюдений концентрация восстановленной аскорбиновой кислоты была повышенной в обоих вариантах опыта с неблагоприятной pH, что указывает на активное ее участие в

антиоксидантной защите листьев (рис. 6).

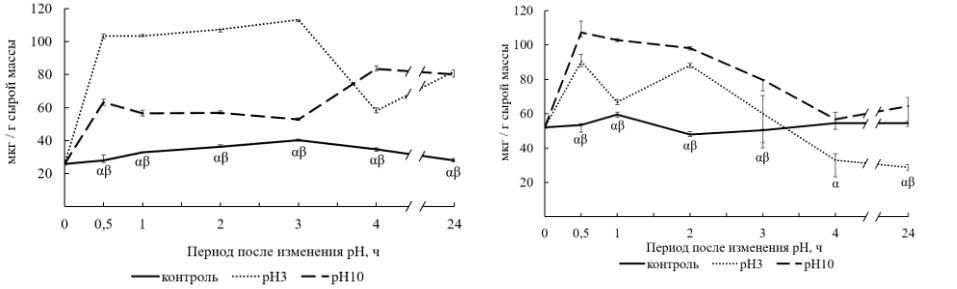


А Б

Рисунок 5 – Изменение пероксидазной (А) и каталазной (Б) активности в листьях гороха в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

В листьях ржи, а также в горохе (рис. 6) накопление аскорбиновой кислоты проявилось, преимущественно, в первые часы после стресс-воздействий, особенно в варианте с высоким значением pH. К концу наблюдений у этих растений концентрация восстановленной аскорбиновой кислоты была повышена лишь в условиях щелочного стресса. По-видимому, активное участие аскорбиновой кислоты в антиоксидантной защите характерно для начальной стадии развития окислительного стресса. M.H.M. Bhuyan с соавторами [2019] через 72 ч развития кислотного стресса (pH 4,0) наблюдали снижение содержания аскорбиновой кислоты в пшенице на 46%, а при щелочном стрессе (pH 8,5) – на 76%.



А Б

Рисунок 6 – Изменение концентрации восстановленной аскорбиновой кислоты в листьях пшеницы (А) и гороха (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

Существенное накопление пролина наблюдали в листьях пшеницы при кислотном стрессе, в листьях ржи – при кислотном и щелочном стрессах (рис. 7). Особенностью пшеницы при щелочном стрессе было снижение концентрации пролина в листьях в течение всего периода наблюдений. Содержание пролина в листьях ржи коррелировало с активностью пероксидаз (коэффициент корреляции R=0,75), что указывает на возможное его участие в антиоксидантной защите. Пролин уменьшает повреждающее действие АФК и стимулирует активность ферментов в растениях [Стеценко и др., 2011; Bhuyan et al., 2019; Yang et al., 2021]. Аккумуляция пролина в клетке также является ответной реакцией растений на дефицит воды [Guo et al., 2017; Arif et al., 2020].

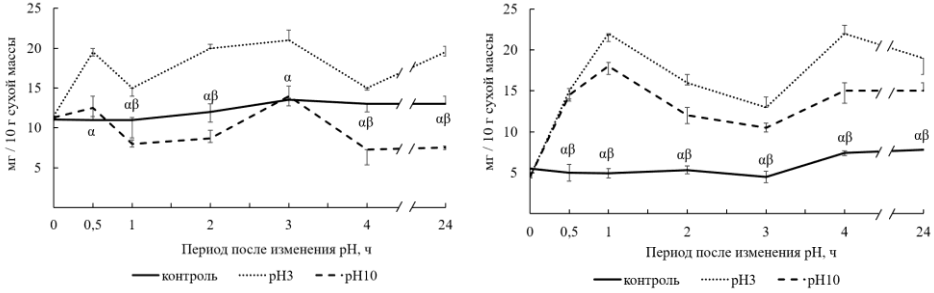


Рисунок 7 – Изменение содержания пролина в листьях пшеницы (А) и ржи (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

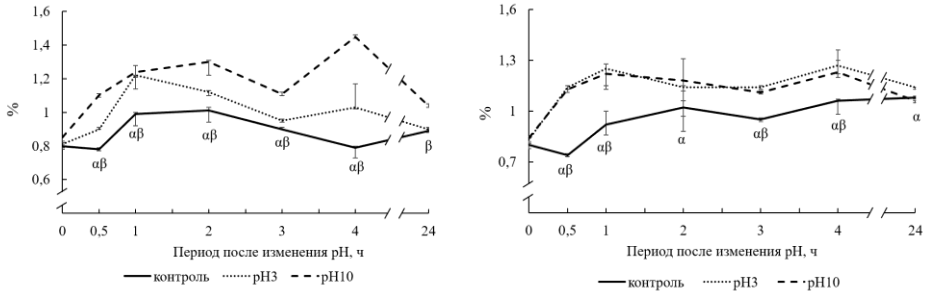
Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

При кислотном стрессе флавоноиды накапливались в листьях пшеницы в первые часы наблюдений, через 24 ч их содержание не отличалось от контрольных значений (рис. 8А). В условиях щелочной среды аккумуляция флавоноидов отмечена в течение всего периода наблюдений. Значимая корреляция между концентрацией флавоноидов и активностью пероксидаз (R=0,51) указывает на их возможное участие в антиоксидантной защите литьев пшеницы.

Ответная реакция ржи в первый час после изменения pH корневой среды проявилась в двукратном увеличении концентрации флавоноидов в листьях; аккумуляцию флавоноидов наблюдали и в течение последующих часов развития стрессов (рис. 8Б). Содержание флавоноидов в листьях ржи прямо пропорционально коррелировало с активностью пероксидаз (R=0,51) и содержанием пролина (R=0,85). Известно, что при окислительном стрессе флавоноиды участвуют в стабилизации мембран [Roohi et al., 2011; Brunetti et al., 2013].

В листьях гороха прослежена тенденция к снижению содержания пролина и

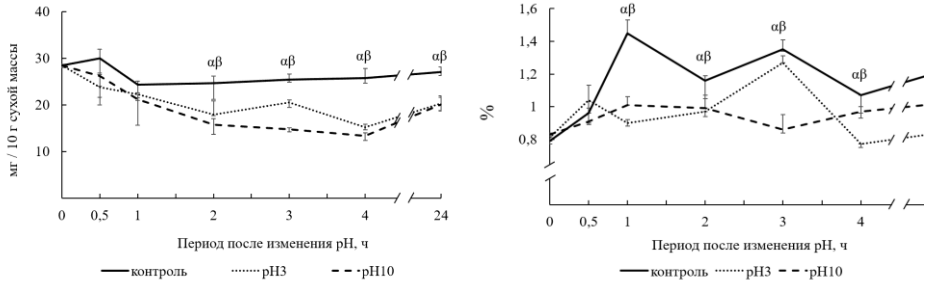
флавоноидов, что, исключает прямое их участие в защитных реакциях на начальной стадии развития кислотного и щелочного стрессов (рис. 9).



А Б

Рисунок 8 – Изменение содержания флавоноидов в листьях пшеницы (А) и ржи (Б) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$



А Б

Рисунок 9 – Изменение содержания пролина (А) и флавоноидов (Б) в листьях гороха в условиях кислотного и щелочного стрессов

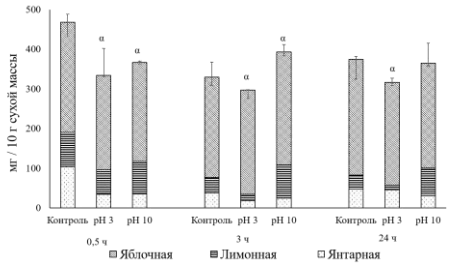
Примечание. Медиана, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили. α – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 3 и контроль, β – наличие значимых различий между вариантами опыта pH 10 и контроль; значимость различий рассчитана с помощью критерия Крускела-Уоллиса при $P < 0,05$

В листьях пшеницы при кислотном стрессе общее количество яблочной, лимонной и янтарной кислот по сравнению с контролем снизилось на 10-22% (рис. 10А). В условиях щелочного стресса снижение концентрации этих кислот у пшеницы отметили только в первый период наблюдений (0,5 ч); через 3 ч их количество увеличилось относительно контрольного уровня.

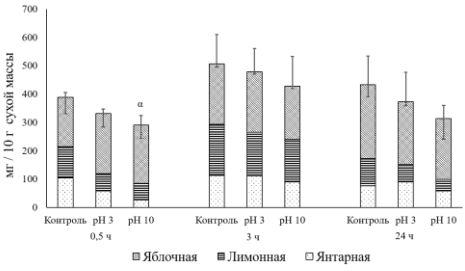
Между общим содержанием трех карбоновых кислот и концентрацией пролина, между содержанием этих кислот и концентрацией восстановленной аскорбиновой кислоты в листьях пшеницы установили отрицательную

корреляцию, R=-0,74 и R=-0,85 соответственно.

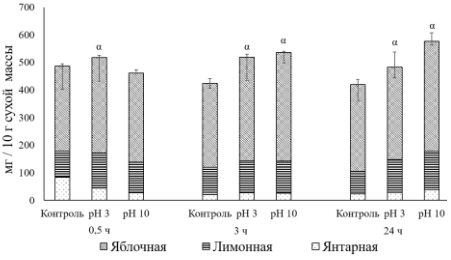
В листьях ржи при кислотном стрессе общее количество исследуемых органических кислот не изменилось (рис. 10Б). При щелочном стрессе проявилась тенденция к понижению концентрации карбоновых кислот; однако, значимые различия с контролем отмечены только в первый период наблюдений (0,5 ч) за счет уменьшения количества лимонной и янтарной кислот. Изменения в метаболизме органических кислот в стрессовых условиях связывают с нарушением гликолиза [Olmos, Hellin, 1996; Guoet al., 2015; Икконен и др., 2020].



А



Б



В

Рисунок 10 – Изменение общего содержания яблочной, лимонной и янтарной кислот в листьях пшеницы (А), ржи (Б) и гороха (В) в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. Медиана общего содержания кислот, планками погрешностей представлены 25% и 75% процентили; α – наличие значимых различий с контролем, значимость различий рассчитана с помощью критерия Краскела-Уоллиса при $P < 0,05$

Горох в условиях кислотного и щелочного стрессов отличился увеличением общего содержания яблочной, лимонной, янтарной кислот (рис. 10В). По мнению исследователей [Sagervanshi et al., 2022; Чернышева и др., 2024] повышенная концентрация органических кислот способствует восстановлению оводненности листьев растений при щелочном стрессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение 48 часов после изменения pH корневой среды нами прослежено угнетение исследуемых растений, выраженное в торможении роста и, в отдельных случаях, в снижении массы надземной части. Потенциал биохимических реакций, вызванных стрессорами, может варьироваться в бесконечно возможной степени в зависимости от внутренней организации различных организмов. Решающее значение для стрессового состояния имеет время реакции растения на неблагоприятный фактор окружающей среды [Jansen, Potters, 2017; Silveira, Sousa, 2024]. Наши исследования посвящены изменениям биохимических показателей в первые часы после стресс-воздействия в листьях

пшеницы яровой, ржи посевной и гороха посевного. Лист представляет собой центральную часть системных реакций на эндогенные и внешние возмущения, может служить объектом ранней диагностики стрессового состояния [Souza, Cardoso, 2003; Silveira, Sousa, 2024].

Динамика содержания воды в листьях злаков указывала на некоторое нарушение водного обмена при высоких и низких значениях pH корневой среды. К настоящему времени обнаружены большие различия в механизмах реагирования разных растений на нарушения водного баланса [Yang et al., 2021; Wu et al., 2022].

Со многими дисбалансами, вызванными биотическими и абиотическими стрессорами в растениях, тесно связан окислительно-восстановительный метаболизм [Wu et al., 2022; Sousa et al., 2023; Silveira, Sousa, 2024]. В наших экспериментах при резком подкислении и подщелачивании корневой среды быстрая реакция растений проявилась в изменении содержания пероксида водорода в листьях (рис. 11).

В стрессовом состоянии колебания H_2O_2 в обе стороны (превышения и понижения) относительно контрольных значений указывали как на сверхпродукцию АФК, так и на усиленную их элиминацию разными компонентами антиоксидантной защиты растений. Повышение содержания H_2O_2 в растительной клетке считают кратковременным и локальным явлением, которое служит сигналом для экспрессии генов, регулирующих синтез антиоксидантных ферментов [Guo et al., 2015; Demidchik, 2015; Noctor et al., 2015; Прадедова и др., 2017; Wu et al., 2022].

При неблагоприятной реакции корневой среды ответная реакция пшеницы проявилась в повышении антиоксидантной активности листьев (рис. 11). Каталаза быстро разлагает H_2O_2 до H_2O [Yang et al., 2021; Wu et al., 2022], а пероксидазы способны к восстановлению разных субстратов [Mehlhorn et al., 1996; Takahama, 2004], поэтому одновременное повышение уровня активности этих ферментов в первые часы развития кислотного и щелочного стресса можно считать маркером усиления антиоксидантной защиты листьев пшеницы.

Рожь отличилась усилением активности каталазы и пероксидаз в варианте опыта со щелочной средой, но при кислой реакции среды в листьях ржи чаще наблюдали повышение уровня активности только одних пероксидаз. При этом в листьях ржи в период наблюдений от 2 ч до 24 ч пероксида водорода в листьях меньше, чем в контрольном варианте опыта; возможно, это растение относительно толерантно к кислой реакции корневой среды.

В первые часы развития стресса, вызванного изменением pH корневой среды, в листьях растений, как правило, наблюдали аккумуляцию восстановленной аскорбиновой кислоты (рис. 11). Содержание аскорбиновой кислоты в растениях положительно коррелирует с их устойчивостью, т.к. аскорбиновая кислота прямо или косвенно снижает количество АФК [Yang et al., 2021]. Через 24 ч после стресс-воздействия в листьях ржи и гороха содержание этой кислоты существенно уменьшилось, возможно, из-за снижения ее роли в формировании адаптационных механизмов.

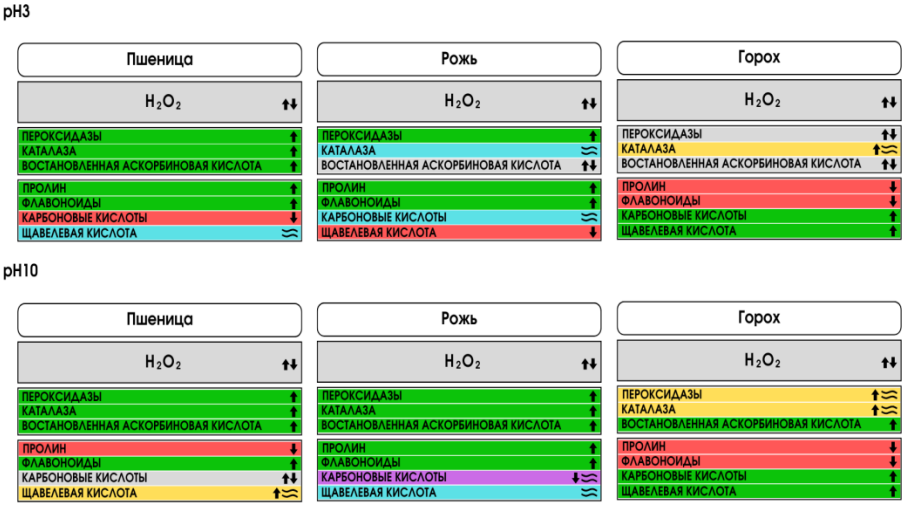


Рисунок 11 – Общая схема изменений биохимических показателей в листьях растений в условиях кислотного и щелочного стрессов

Примечание. ↑↓ – содержание / активность колебались в обе стороны от контрольных значений; ↑ – содержание / активность выше контрольных значений; ↓ – содержание ниже контрольных значений; ≈ – содержание / активность не имели значимых различий с контролем; ↓≈ – отдельные периоды понижения содержания / активности относительно контрольных значений; ↑≈ – отдельные периоды повышения содержания / активности относительно контрольных значений

Осморегулирующие вещества в растениях поддерживают нормальный уровень водного потенциала, защищают белковую активность и структуру клеточных мембран и т.д.; диапазон изменения веществ, регулирующих осмотическую активность, отличается у разных видов растений [Yang et al., 2021]. В нашем эксперименте у злаков проявилась видоспецифичность реакций, связанных с направленностью изменений pH. Рожь накапливала пролин и флавоноиды при обоих видах стресса, а пшеница – только при кислотном стрессе; при щелочном стрессе в ее листьях аккумулировались флавоноиды.

В условиях кислотного и щелочного стрессов аккумуляция пролина и флавоноидов в листьях злаков (рис. 11), по-видимому, направлена и на защиту от окислительного повреждения, т.к. их содержание коррелировало с активностью антиоксидантных ферментов и количеством восстановленной аскорбиновой кислоты.

В условиях кислотного и щелочного стрессов горох отличился от злаков снижением концентрации пролина и флавоноидов в листьях (рис. 11). Катаболизм этих соединений указывал на функционирование защитных механизмов, связанных с другими низкомолекулярными соединениями (растворимые белки, растворимые сахара, сорбит, глицинбетаин и др.), регулирующими осмотическую активность [Fang et al., 2021].

Динамика содержания щавелевой кислоты и карбоновых кислот цикла Кребса (яблочной, лимонной, янтарной) в листьях растений (рис. 10) указывала на изменение их метаболизма в условиях низких и высоких значений pH корневой среды. Снижение количества яблочной, лимонной и янтарной кислот в листьях злаков относительно контрольных уровней может быть связано с нарушением гликолиза; как это отмечено при щелочном засолении [Olmos, Hellin, 1996; Guo et al., 2015]. В условиях кислотного стресса снижение количества органических кислот в листьях также направлено на восстановление pH-гомеостаза.

Специфическая реакция гороха на изменение pH корневой среды проявилась в накоплении щавелевой кислоты и общего количества яблочной, лимонной, янтарной кислот (рис. 11). Ученые отмечали участие органических кислот в регуляции осмотического баланса растений [Wilkinson, 1999; Geilfus, 2017; Guo et al., 2020]. В листьях гороха аккумуляция органических кислот (на фоне снижения концентрации пролина) могла быть направлена на восстановление водного потенциала. В условиях щелочного стресса синтез органических кислот в горохе, возможно, связан и с восстановлением pH-гомеостаза. Например, под воздействием щелочного раствора концентрация цитрата в соке ксилемы *Vicia faba* возрастала в два раза [Sagervanshi et al., 2022]. Для компенсации дефицита неорганических анионов в корнях и листьях томатов усилен синтез органических кислот, таких как цитрат, формиат, лактат, ацетат, сукцинат, малат и оксалат [Wang et al., 2011].

Выделение маркеров стрессовых состояний растений может оказать помощь в генетико-селекционных исследованиях и в управлении «точным земледелием», особенно в неблагоприятных и экстремальных экологических условиях [Silveira, Sousa, 2024]. Наши исследования показали, что общими показателями стрессового состояния пшеницы яровой, ржи посевной и гороха посевного в первые часы после формирования неблагоприятной реакции корневой среды являлись изменения в показателях про-/антиоксидантного метаболизма, включая содержание H_2O_2, активности антиоксидантных ферментов (каталазы, пероксидаз), содержание восстановленной аскорбиновой кислоты в листьях. Эти результаты соответствуют ранее предложенным перспективным физиологическим показателей стрессовых состояний некоторых культурных растений, вызванных дефицитом воды, засолением, высокими и низкими температурами [Cardoso et al., 2023].

ВЫВОДЫ

1. Изменение pH корневой среды приводит к ингибированию ростовых процессов у злаков (пшеницы яровой, ржи озимой) и гороха. Кислая среда (pH 3) за период 48 часов снижает длину и сырую массу надземной части всех изученных видов растений, а щелочная среда (pH 10) уменьшает прирост надземной части только у злаков.

2. Изменение pH корневой среды в кислую и щелочную сторону приводит к снижению относительного содержания воды в листьях злаков (пшеницы яровой, ржи озимой) через 24-48 часов после начала стресс-воздействия, что возможно является одной из причин торможения ростовых процессов. У гороха

аналогичную реакцию наблюдали только в условиях кислотного стресса.

3. В первые часы воздействия высоких и низких значений pH корневой среды в листьях изученных видов растений одновременно с усиленными колебаниями концентраций пероксида водорода происходит активизация антиоксидантных ферментов (каталазы и, особенно, пероксидаз) и повышение содержания восстановленной аскорбиновой кислоты. Горох отличался от злаков меньшей активацией антиоксидантных ферментов.

4. Изменение pH корневой среды видоспецифичным образом изменяет содержание низкомолекулярных антиоксидантов пролина и флавоноидов в листьях растений. В условиях кислотного стресса в листьях пшеницы и ржи накапливаются оба антиоксиданта, тогда как при щелочном стрессе в листьях пшеницы – только флавоноиды, а у ржи аккумулируются и пролин и флавоноиды. В листьях гороха при изменении pH корневой среды содержание пролина и флавоноидов уменьшается, что указывает на функционирование иной системы низкомолекулярных протекторов.

5. Воздействие низких и высоких значений pH корневой среды вызывает видоспецифичные изменения в метаболизме органических кислот (щавелевой, яблочной, лимонной и янтарной) в листьях злаков и гороха. Наиболее значимые изменения обнаружены в условиях кислотного стресса: в листьях пшеницы снижается концентрация яблочной, лимонной и янтарной кислот, в листьях ржи – преимущественно щавелевой кислоты. В листьях гороха все изученные кислоты аккумулируются, что указывает на их участие в регуляции водного потенциала, а в условиях щелочной среды – и pH-гомеостаза.

6. В первые часы воздействия низких (pH 3) и высоких (pH 10) значений pH корневой среды общим маркером стрессового состояния растений пшеницы яровой, ржи посевной и гороха посевного является повышение уровня про-/антиоксидантного метаболизма в листьях. Участие пролина, флавоноидов и органических кислот в системном ответе листьев растений видоспецифично и зависит от направленности изменений pH корневой среды.

Список основных статей, опубликованных по материалам диссертации в журналах рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации:

1. Четина О.А., **Боталова К.И.**, Кайгородов Р.В. Влияние щелочности и кислотности корневой среды на состояние защитных систем *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. // Физиология растений. – 2020. – Т. 67, № 2. – С. 177–187.

2. **Боталова К.И.**, Еремченко О.З. Содержание органических кислот в *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L. и *Pisum sativum L*. при выращивании на кислой и щелочной почвах // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 4. – С. 35– 42.

3. **Боталова К.И.**, Еремченко О.З. Влияние щелочности и кислотности корневой среды на состояние защитных систем *Pisum sativum* L. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 3. – С. 26–33.

Список других статей по теме диссертации:

4. Чернышева А.К., Еремченко О.З., **Боталова К.И.** Накопление пролина, флавоноидов и органических кислот в листьях кресс-салата в условиях солещелочного стресса // Физиология растений. – 2024. – Т. 71, № 4. – С. 482– 490.

5. Четина О.А., **Боталова К.И.**, Мошева В.А., Лучникова К.И. Изменение активности каталазы и пероксидаз в листьях овса посевного под влиянием отдельного и комбинированного воздействия засоления и pH-уровня корневой среды // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2018. – Вып. 4. – С. 423–429.

6. **Боталова К.И.**, Еремченко О.З., Шестаков И.Е. Стратегии выживания растений в зоне воздействия солеотвалов г. Соликамска // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=19780 (дата обращения: 27.11.2024).

7. Четина О.А., Еремченко О.З., **Боталова** К.И., Середа А.М. Изменение в содержании пролина в растениях при воздействии NaCl-засоления и щелочности корневой среды // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=26034 (дата обращения: 27.11.2024).

Публикации в материалах научных конференций:

8. Лузина Е.В., Демакина К.И. (**Боталова К.И.**) Техногенное засоление и подщелачивание почвогрунтов, адаптация к ним растений // Материалы по изучению русских почв: сб. научных докладов / Под ред. Б.Ф. Апарина. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2014. – Вып. 8 (35). – С. 251–256.

9. **Боталова К.И.**, Четина О.А., Середа А.М. Накопление органических кислот в кресс-салате при ощелачивании и засолении корневой среды // Экспериментальнаябиология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. материалов докладов научной конференции. – Судак, 2017. – С. 117.

10. Четина О.А., Арисова А.К., **Боталова К.И.** Накопление аскорбиновой кислоты вкресс-салате как ответная реакция на совместное воздействие NaCl-засоления и щелочности корневой среды // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник материалов докладов научной конференции. – Судак, 2017. – С. 351.

11. **Боталова К.И.** Ответные реакции *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. на изменение pH корневой среды // Физиология растений – основа создания растений будущего: тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием. – Казань. – 2019. – С. 81.

12. **Боталова** К.И., Четина О.А. Динамика содержания пероксида и пероксидазной активности в листьях культурных злаков при изменении реакции корневой среды // Высокие технологии, определяющие качество жизни: материалы II Международной научной конференции. – Пермь, 2018. – С. 48–52.

13. **Боталова К.И.** Содержание хлорофилла *a* и *в* в растениях *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. в условиях кислой и щелочной почвенной среды // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – Пермь, 2019. – С. 212–213.

14. **Боталова К.И.**, Ванышева Н.Д. Накопление Na^+, K^+, Ca^{2+} в *Triticum aestivum* L., *Secale cere*ale L. и *Pisum sativum* L. при изменении реакции почвенной

среды // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: материалы региональной студенческой научной конференции с международным участием. – Пермь, 2020. – С. 35–37.

15. Правкова А.А., **Боталова К.И.** Динамика каталазной активности в листьях пшеницы обыкновенной и ржи посевной при кислотном и щелочном стрессе // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: материалы региональной студенческой научной конференции с международным участием. – Пермь, 2020. – С. 56–59.

16. Сомова А.А., **Боталова К.И.** Влияние pH почвы на пероксидазную активность влистьях гороха // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: материалы региональной студенческой научной конференции с международным участием. – Пермь, 2020. – С. 66–69.

17. **Боталова К.И**., Еремченко О.З. Влияние кислотности и щёлочности корневой среды на активность компонентов антиоксидантной защиты *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. // Современные методы и подходы в защите растений: материалы II международной научно-практической конференции. – Екатеринбург, 2020. – С. 138–139.

18. **Botalova K.I**., Eremchenko O.Z. Effect of Acidity and Alkalinity of Root Medium on Activity of Antioxidant Protection Components of *Triticum aestivum* L. and *Secale cereale* L. // AIP Conference Proceedings. – 2021. – Vol. 2388. – P. 040008.

19. **Боталова К.И.** Влияние кислотности и щелочности корневой среды на активность антиоксидантных ферментов *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. // Экобиотех 2021: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием. – Уфа, 2021. – С. 119–123.

20. **Боталова К.И.**, Черных А.Д., Боталов А.А. Влияние кислотности и щелочности корневой среды на некоторые показатели антиоксидантной активности *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus // Симбиоз Россия 2022: материалы VIII Международной конференции ученых-биологов. – Пермь, 2022. – С. 616–622.

21. **Боталова К.И.**, Пестренин В.В. Некоторые показатели антиоксидантной защиты тритикале при кислотном и щелочном стрессе // X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата»: тезисы докладов. – Уфа, 2023. – С. 74.