

На правах рукописи



СТОЛБИКОВА Александра Вячеславовна
ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАРЛИКОВЫХ
ФОРМ ЯБЛОНИ *MALUS VASSATA* (L.) BORKH.

1.5.21 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск, 2024

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

Рудиковский Александр Викторович,
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Шишова Мария Фёдоровна,
доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ Санкт-Петербургский государственный университет, доцент кафедры физиологии и биохимии растений биологического факультета.

Аксёнов-Грибанов Денис Викторович,
кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», заведующий лабораторией фармацевтической биотехнологии.

Ведущая организация:

Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Якутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБПК СО РАН – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ «ЯНЦ СО РАН»), г. Якутск.

Защита диссертации состоится «20» февраля 2025 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.210.01 (Д 003.047.01) на базе ФГБУН «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 СО РАН 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 » 202 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Коротаева Наталья Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одним из самых распространенных абиотических стрессоров в мире является засуха. Адаптация растений к засушливым условиям сводится к трем основным стратегиям – толерантность (англ. tolerance), убежание (англ. escape) и акклиматизация (англ. avoidance). В природных условиях, как в многофакторной системе, растения прибегают к нескольким стратегиям одновременно (Yildirim, Kaya, 2017). Основной целью этих стратегий является ограничение потери воды (Mittler et al., 2001; Chaves et al., 2003). Стратегия толерантности к определенной степени обезвоживания является самой распространенной и выражается в осмотическом регулировании через накопление низкомолекулярных водорастворимых веществ и экспрессию LEA-белков. Стратегия убежания основана на корректировке переходных процессов развития. Она выражается в увеличении продолжительности покоя семян и укорачивании жизненного цикла растения до наступления засушливого периода. Стратегия акклиматизации направлена на поддержание уровня воды в тканях через сокращение растяжения и деления клеток, которое выражается в уменьшении листовой поверхности, замедлении роста ствола и веток. Все это может существенно повлиять на ростовые процессы растения и стать причиной формирования его карликовости, при этом карликовость может быть закреплена на генетическом уровне. В условиях умеренной длительной засухи карликовые деревья способны не только сохранить все стадии вегетации, но и приобрести устойчивость к ряду сопутствующих стрессоров, например воздействию солей и сильных ветров (Foster et al., 2007). Эта особенность древесных растений позволяет использовать их в растениеводстве в качестве подвоев.

Для Прибайкалья, в частности респ. Бурятия характерно большое разнообразие климатических условий, которое является естественной лабораторией для создания новых экологических форм растений. В результате поисковых экспедиционных работ, проводимых сотрудниками СИФИБР СО РАН, на территории Селенгинской Даурии (республика Бурятия) были найдены популяции яблони сибирской карликовой и высокорослой формы. По морфологическим признакам карликовые деревья отличаются низким ростом, по сравнению с высокорослой яблоней, и кустовой формой; более узкими листьями и меньшим их количеством на побегах. Для этих яблонь были проведены генетические исследования по которым установили, что карликовая и высокорослая яблони – это экологические формы *Malus baccata* var. *sibirica*, обладающей, как известно, большой морфологической пластичностью. По числу хромосом обе формы являются диплоидными. Однако по степени генетической дифференциации быстро эволюционирующих микросателлитных маркеров деревья отличаются значительно (Рудиковский и др., 2014). Полученные данные позволяют предположить, что найденные карликовые яблони являются «крайними» популяциями *Malus baccata* (L.) Borkh. (Рудиковский и др., 2014). По-видимому, перенос яблони сибирской из характерных мест обитания (по берегам рек) в зону контакта леса и степи вызвал процессы, связанные с уменьшением размеров деревьев и формированием кустовидной формы. Считается, что эти признаки являются начальным этапом экологического видообразования (Foster, 2007; Рудиковский и др., 2014). Из трех стратегий адаптации растений стратегия убежания для карликовой формы, не характерна, поскольку различий в периодах вегетации и покоя семян по сравнению с высокорослой яблоней не наблюдается. Вероятнее всего, эти деревья используют стратегии толерантности и акклиматизации.

Известно, что адаптивные реакции любого организма, в том числе растительного, сопровождаются изменениями в физиологических и биохимических процессах, протекающих в их тканях. Особенно чувствителен к водному дефициту фотосинтез, как основной процесс, обеспечивающий накопление биомассы растения. Баланс фитогормонов также может быть показателем адаптационных процессов, так как засуха вызывает значительное накопление абсцизовой кислоты, влияющей на механизм закрывания устьиц и индуцирующей синтез стрессовых белков. Наряду с этим может

происходить снижение уровня ауксинов и гиббереллинов, регулирующих рост растения. Кроме этого, липидный и жирнокислотный состав тканей, в том числе степень ненасыщенности жирных кислот, является характерным показателем стрессоустойчивости растений. Изменения в этих показателях характеризуют пластичность клеточных мембран, они индуцируют запуск адаптивно-приспособительных реакций. Известно, что свободные аминокислоты являются низкомолекулярными осмолитами, в частности, показано, что содержание пролина в условиях водного дефицита резко возрастает. Поэтому содержание свободных аминокислот, в том числе, пролина, может служить маркером стрессового состояния изучаемых растений, вызванного засухой. Комплексное изучение вышеназванных параметров позволит приблизиться к пониманию физиолого-биохимических путей формирования карликовости у яблони сибирской, вызванной условиями произрастания.

Поэтому **целью** данной работы был анализ особенностей физиолого-биохимических процессов в тканях яблони сибирской (*Malus baccata* (L.) Borkh.), произрастающей в условиях контакта леса и степи на территории Селенгинского района республики Бурятия, в связи с их способностью влиять на формирование карликовости у этого вида.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать климатические условия и провести анализ влагоемкости почвы в местах произрастания карликовых и высокорослых форм яблони (зона контакта леса и степи, с. Ягодное) и сравнить их с соответствующими условиями на территории экспериментального участка СИФИБР СО РАН (г. Иркутск), куда были перенесены упомянутые формы;
2. Провести сравнительную оценку динамики роста карликовой и высокорослой яблони, перенесенных на территорию экспериментального участка СИФИБР СО РАН (г. Иркутск);
3. Провести сравнительный анализ качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов мембран хлоропластов и оценить эффективность работы ФС II в листьях двух изучаемых форм яблони;
4. Провести сравнительный количественный анализ содержания эндогенных регуляторов роста: абсцизовой и индолилуксусной кислот в верхушечных почках, коре (флоэма+камбий) и плодах у карликовой и высокорослой яблони на стадии активного роста;
5. Экспериментально проверить являются ли ростовые процессы карликовой яблони сибирской гиббереллинозависимыми.
6. Провести сравнительный анализ содержания липидных компонентов, в том числе жирных кислот, в листьях, корнях и плодах карликовой и высокорослой яблони;
7. Провести сравнительный количественный анализ содержания свободных аминокислот, в том числе так называемых «стрессовых», в листьях карликовой и высокорослой яблони.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенностью карликовой формы яблони сибирской является снижение интенсивности физиологических и биохимических процессов в ее тканях. Относительная скорость электронного транспорта в листьях дикорастущей карликовой яблони достоверно ниже, чем в высокорослой форме. Ткани карликовой формы содержат меньшее количество суммарных липидов и фосфолипидов, фотосинтетических пигментов, свободных аминокислот по сравнению с высокорослой формой. Гормональная регуляция ростовых процессов у карликовой формы яблони сибирской осуществляется за счет снижения синтеза индолилуксусной кислоты в апексах, приводящего к низкому росту и загущенной кроне карликовых деревьев.

2. В условиях почвенной и воздушной засухи оптимальной стратегией адаптации для яблони сибирской является стратегия акклиматизации, которая выражается в уменьшении ассимилирующей поверхности, снижении интенсивности физиологической и биохимической активности.

Научная новизна. Впервые проанализированы основные физиолого-биохимические параметры тканей *Malus baccata* (L.) Borkh., которые участвуют в регуляции ростовых процессов у деревьев под воздействием засушливых условий контактной зоны леса и степи в республике Бурятия. Выявлено, что в листьях карликовой формы *M. baccata* снижено общее содержание хлорофиллов и каротиноидов, по сравнению с высокорослой формой, а также снижена относительная скорость электронного транспорта. Впервые комплексно изучен жирнокислотный состав листьев, корней и плодов двух форм яблони сибирской. Установлено, что индекс ненасыщенности жирных кислот, корней и листьев в карликовой яблоне ниже, чем в высокорослой. Впервые показано, что низкорослые формы *M. baccata* являются гиббереллин-чувствительными, а в молодых разворачивающихся листьях карликовой формы *M. baccata* содержание индолилуксусной кислоты в три раза ниже, чем в высокорослой, на фоне одинакового содержания абсцизовой кислоты. Установлено, что содержание свободных аминокислот, суммарных липидов и фосфолипидов в листьях карликовых форм яблони ниже по сравнению с высокорослой формой. На основании полученных данных предложен возможный путь биохимической адаптации *Malus baccata* (L.) Borkh. к умеренной длительно действующей почвенной и воздушной засухе.

Методология и методы исследования. В работе были использованы следующие методы и подходы: газовая хроматография (жидкий вкол) с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС), колоночная хроматография, тонкослойная хроматография (ТСХ), флуориметрический анализ, спектрофотометрический анализ, биотесты. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Sigma-Plot 12.5 и Microsoft Office Excel 2010.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты анализа липидного и жирнокислотного состава тканей яблони сибирской, а также аминокислотного состава листьев и содержания фотосинтетических пигментов дают важную информацию для понимания биохимических путей адаптации древесных растений к длительно действующей умеренной засухе. Полученные данные по составу и содержанию фитогормонов в листьях *M. baccata* расширяют современные представления об участии абсцизовой и индолилуксусной кислот в формировании карликовости у растений яблони в условиях длительно действующего умеренного водного дефицита.

Полученная информация может быть использована при отборе новых низкорослых холодостойких и засухоустойчивых подвоев яблони для климатических зон Сибири, Дальнего Востока и северных территорий России.

Экспериментальные данные, полученные в настоящей работе, могут быть использованы при написании учебных пособий для лекционных курсов по физиологии растений, читаемых студентам биологических факультетов в университетах и сельскохозяйственных вузах.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на VI съезде общества физиологии растений России «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (г. Сыктывкар, 2007); Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (г. Улан-Удэ, 2010); II Международной научной конференции «Разнообразие почв и биоты северной и центральной Азии» (г. Улан-Удэ, 2011); Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (г. Иркутск, 2016); Всероссийской конференции «Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии» (Иркутск - Кырэн, 2017);

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ, некоторые из которых входят в базу Web of Science.

Личное участие автора. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, представлении их на конференциях, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором и его научным руководителем совместно с сотрудниками лабораторий физико-химических методов исследования и физиолого-биохимической адаптации растений, а также отдела биоразнообразия и биологические ресурсы СИФИБР СО РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования.

Объекты исследования. Объектами исследования служили карликовые и высокорослые деревья *M. baccata*, произрастающие на территории республики Бурятия в Селенгинском районе. Одна из форм яблони представляет собой суперкарликовое растение, которое произрастает в долине реки Загустай у подножья южного склона Хамбинского хребта Гусиноозерской котловины в окрестностях сёл Загустай и Ягодное. Популяция очень малочисленна и насчитывает всего 12 растений. Возраст самого высокого растения (110 см) составляет 22 года к моменту проведения исследований, диаметр ствола – 2,2 см. Высокорослая яблоня, произрастающая также в районе с. Ягодное, ранее входила в группу искусственных насаждений, однако со временем одичала и, размножаясь корнеотпрысками, образовала куртину, которую принимают за дикорастущую заросль. Средняя высота деревьев составляет 3 м. Возраст растений 30 лет (на момент времени обнаружения 2003 г), диаметр ствола 19–25 см (Рудиковский и др., 2008). Изучали каждую из этих форм яблони, произрастающих на территории экспериментального участка СИФИБР СО РАН, г. Иркутска, куда они были пересажены в 2003 г.

Методы исследования. Данные по климатическим показателям на период исследования были взяты с интернет портала www.rp5.ru (Расписание погоды [сайт], 2004).

Влагоемкость почвы измеряли по стандартному методу трубок (Козлова, 2009).

Исследование параметров роста яблони сибирской в процессе вегетации проводили на карликовых и высокорослых деревьях, пересаженных на территорию экспериментального участка СИФИБР СО РАН г. Иркутск. Все пересаженные деревья росли без полива и в первые два года их обрезали для формирования одноствольного дерева с вертикальным стволом. Морфометрические измерения проводили на трехлетних растениях.

Извлечение общих пигментов и β -каротина из листьев проводили ацетоном и петролейным эфиром по методу (Туманов, Чирук, 2007) с использованием центрифуги Allegra 64 R (Wesman, США). Содержание хлорофиллов и каротиноидов оценивали спектрофотометрическим методом на спектрофотометре СФ-56 (Чехия) в диапазоне длин волн 350–750 нм. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot_11 по методу расчета спектрального распределения максимумов гауссовых пиков (GPS) (Kupper et al., 2007).

Измерение флуоресценции хлорофилла *a* проводили на листьях с помощью портативного импульсного флуориметра РАМ-2500 (“Walz, Effelrich”, Германия).

С помощью биотеста «биологическая проба на гиббереллины» оценивали содержание в листьях эндогенных гиббереллинов на семенах гороха согласно методике (Бояркин, Дмитриева, 1966). Опыт по установлению гиббереллин-зависимости

карликовой формы яблони сибирской проводили на карликовых деревьях с помощью экзогенного нанесения гиббереллина на конусы нарастания.

Для количественного анализа индолилуксусной и абсцизовой кислот проводили экстракцию биологически-активных соединений из верхушечных почек и молодых разворачивающихся листьев, молодой коры и завязи с помощью 80% метилового спирта. Дополнительно для извлечения использовали УЗ-ванну (Сапфир, Россия) со льдом в затемненных условиях и центрифугу с охлаждением Allegra 64 R (Becman, США). Экстракт очищали методом твердофазной экстракции (ТФЭ) с помощью сдвоенного патрона Sep-Pak C18 (Waters, Ирландия). Для концентрации и выделения фитогормонов использовали патрон Oasis MAX 6cc (Waters, США), остаток дериватизировали с помощью бис(триметилсилил)ацетамида (Sigma-Aldrich, Швейцария) и гексаметилдисилоксана (Sigma, Германия). Анализ триметилсилильных (ТМС) производных фитогормонов проводили методом газовой хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора 5973/6890NMSD/DS Agilent Technology (США). Идентификацию фитогормонов проводили по характерным масс-спектрам стандартных соединений в библиотеке NIST 08.

Для определения липидного и жирнокислотного состава в тканях листьев, корней и плодов карликовой и высокорослой яблони сибирской экстракцию липидов проводили по классическому методу Фолча (Folch et al., 1957). Получение метиловых производных жирных кислот проводили с помощью кислотного катализа (Christie, 1993). От пигментов, фталатов и других примесей избавлялись с помощью препаративной тонкослойной хроматографии в камере с бензолом в качестве подвижной фазы (Morrison, Smith, 1964). Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили методом газовой хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора 5973/6890NMSD/DS Agilent Technology (США). Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили по временам удерживания компонентов стандартной смеси FAME mix C8–C24 Supelco (США) и библиотеке масс-спектров NIST 08.

Для качественного подтверждения состава нейтральных липидов в листьях и корнях яблони использовали метод тонкослойной хроматографии (Кейтс, 1975), в качестве элюэнта использовали систему для разделения - гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (80:20:1). Для визуализации зоны липидов пластинки обрабатывали 10% раствором серной кислоты в этаноле. Идентификацию липидов осуществляли путем сравнения R_f полученных пятен с R_f пятен стандартов. Для разделения липидного экстракта на основные классы липидов, использовали метод колоночной хроматографии (Кейтс, 1975), поочередно смывая нейтральные липиды, гликолипиды и фосфолипиды хлороформом, ацетоном и метанолом соответственно. Количественное содержание липидов определяли весовым способом.

Экстракцию аминокислот проводили с добавлением горячего (60°C) 80% этанола. Очищали от пигментов с помощью хлороформа, дериватизировали сухой остаток N,O-(бистриметилсилил)трифторацетамид (BSTFA)/триметилхлорсиланом (TMCS) 1% (Fluka, Швейцария). ТМС-производные аминокислот анализировали методом газовой хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора 7000/7890A Triple Quad Agilent Technology (США). Идентификацию пиков проводили по временам удерживания стандартных соединений аминокислот и с помощью библиотеки масс-спектров NIST 8.0.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов MS Excel, SigmaPlot и R-статистика. Результаты оценивали с помощью методов параметрической статистики (критерий Стьюдента) и непараметрической статистики: рассчитывали нормальность распределения выборки (критерий Шапиро-Уилка) и достоверность различий сравниваемых средних значений (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Условия произрастания *Malus baccata* (L.) Borkh.

Климат Гусиноозерской котловины резко-континентальный восточносибирский с низкими зимними температурами, небольшим количеством осадков и сухостью воздуха (Дегтярева, 2017а). Весна характеризуется большой сухостью, холодными и сильными северо-западными ветрами, а также заморозками, бывают пыльные бури (Воинков, 2007). Лето в Гусиноозерской котловине короткое, в первой половине засушливое с отдельными суховеями. Местность произрастания изучаемых растений находится в зоне контакта двух коренных формаций: сухой степи и горной тайги. Исследование агрофизических свойств почвы выявило, что в местах произрастания карликовой формы яблони плодородный слой занимает всего 10 см, за ним следует дресьва (продукт выветривания горных пород), которая характеризуется слабой водоудерживающей способностью. В результате исследования влагоудерживающих свойств почвы было установлено, что в с. Ягодное влажность почвы (в процентах от полной полевой влагоемкости ППВ) в местах произрастания карликовой яблони составила $64,7 \pm 0,7\%$, а высокорослой яблони – $73,2 \pm 1,3\%$. Известно, что оптимальная увлажненность почвы, обеспечивающая наиболее благоприятное развитие для яблони, составляет 70–80% от полной полевой влагоемкости (Алферов и др., 2012). Как видно из полученных данных, популяция карликовых растений существует в условиях неоптимальной влагообеспеченности. Такое содержание влаги в почве можно охарактеризовать, как умеренную засуху.

Территория г. Иркутска выбрана нами, как территория с более благоприятными климатическими условиями, по сравнению с местами произрастания яблони в Селенгинском районе. Установленная нами влажность почвы на территории экспериментального участка СИФИБР СО РАН (г. Иркутск) составила $78,1 \pm 1,1\%$ от ППВ, что соответствует оптимальным значениям влажности.

Параметры роста карликовой и высокорослой яблони.

В результате измерения параметров интенсивности роста у исследуемых форм (г. Иркутск) в течение летнего сезона 2009 г. было установлено, что достоверных изменений длины прироста и диаметра штамба у карликовой формы не было, в то время, как у высокорослых деревьев длина годового прироста составляла $12,1 \pm 0,8$ см, при среднем увеличении штамба в 1 мм (рис. 1). К концу сезона вегетации по основным признакам, характеризующим ростовые параметры дерева, высокорослая яблоня также существенно опережала карликовую (табл. 1).

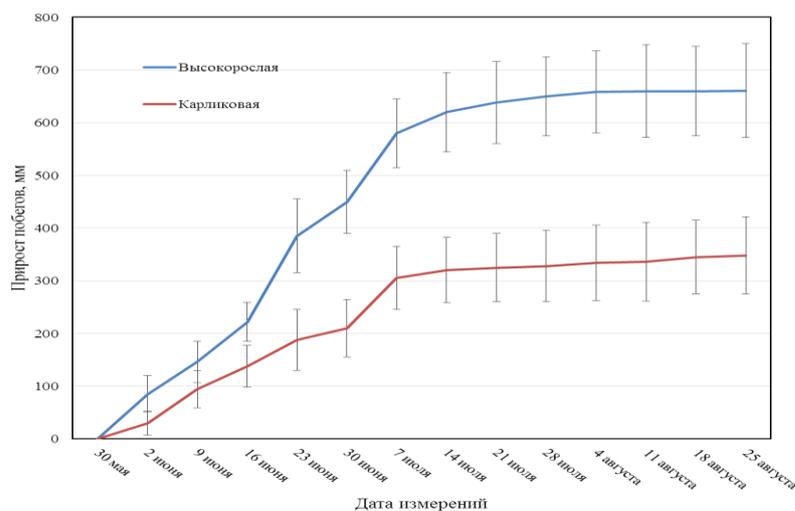


Рисунок 1. Динамика прироста побегов карликовых и высокорослых форм *M. baccata* в период вегетации (г. Иркутск).

Таблица 1

Особенности роста и морфологические признаки деревьев *M. baccata*

Признак	Карликовое Дерево	Высокорослое Дерево
Высота дерева, м	1,34 ± 0,25	2,39 ± 0,44*
Диаметр штамба, см	1,92 ± 0,20	3,15 ± 0,40*
Число междоузлий на однолетнем приросте, шт	20 ± 3	25 ± 3
Длина однолетнего прироста, см	35,6 ± 4,5	67,3 ± 5,1*
Скелетные ветви меньше 5 см, шт	1,2 ± 0,2	8,9 ± 0,6
Скелетные ветви больше 5 см, шт	7,3 ± 0,5	1,5 ± 0,2
Длина междоузлия, см	2,2 ± 0,7	2,5 ± 0,8*
Толщина однолетнего прироста, мм	0,34 ± 0,10	0,44 ± 0,12*

Где n=30

*Различия параметров между карликовой и высокоорослой яблоней достоверны по критерию Стьюдента при $P < 0,05$;

Как видно из графика и табличных данных, замедленные темпы роста и нарушение апикального доминирования в карликовых деревьях *M. baccata* сохраняются и при переносе в более благоприятные климатические условия на территорию экспериментального участка СИФИБР СО РАН в г. Иркутск (Rudikovskii et al., 2019).

Основные фотосинтетические параметры карликовой и высокоорослой яблони.

Было установлено, что суммарное содержание хлорофиллов (Хл $a+b$) существенно отличалось у карликовых и высокоорослых форм яблони, произрастающих в естественных условиях. Так, карликовые деревья содержали примерно в два раза меньше хлорофиллов ($1,79 \pm 0,17$ мг/г сухого веса), чем высокоорослые ($4,30 \pm 0,64$ мг/г сухого веса) (табл. 2). Уменьшение суммарного содержания хлорофилла a и хлорофилла b в карликовых дикорастущих деревьях может быть одним из приспособительных механизмов карликовой яблони в условиях водного дефицита (Слемнев и др., 2012; Иванов и др., 2013). Карликовая и высокоорослая формы яблони, перенесенные в г. Иркутск, по суммарному содержанию зеленых пигментов достоверно между собой не различались, однако наблюдается разница по этому показателю в сравнении с дикорастущими деревьями (табл. 2). Меньшее содержание хлорофиллов в дикорастущей высокоорослой яблоне, по сравнению с ее перенесенной формой, свидетельствует о более неблагоприятных условиях произрастания в с. Ягодное по сравнению с г. Иркутском.

Таблица 2

Содержание фотосинтетических пигментов и их соотношения в листьях карликовой и высокоорослой *M. baccata*

Параметр	с. Ягодное		г. Иркутск	
	Карликовая форма	Высокорослая форма	Карликовая форма	Высокорослая форма
Хл $a+b$, мг/г сухого веса*	1,79±0,17**	4,30±0,64	5,60±0,47	6,97±1,39
Соотношение Хл a/b	2,87±0,22	2,71±0,08	3,45±0,19	2,82±0,28
Доля Хл в ССК	0,57±0,03	0,60±0,01	0,50±0,02	0,59±0,04
Кар, мг/г сухого веса*	0,40±0,04**	0,76±0,13	1,11±0,06	1,31±0,26
Соотношение Хл/Кар	4,53±0,42	5,75±0,52	4,93±0,19	5,39±0,28

*данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок

**различия между карликовой и высокоорослой формой в с. Ягодное достоверны по критерию Манна-Уитни, $p \leq 0,01$

Считается, что показателем стресса у растения является не только снижение суммарного содержания хлорофиллов, но и соотношение содержаний Хл a и Хл b , которое косвенно связывают с величиной мобильной антенны, содержащей хлорофилл b (Слемнев и др., 2012). В листьях *M. baccata* соотношение между хлорофиллами варьировало в пределах 2–3 (табл. 2), по-видимому, такой индекс Хл a/b характерен для

яблони, как для вида, в целом. Нами было установлено, что у карликовой и высокорослой форм яблони сибирской (с. Ягодное) соотношение хлорофиллов в листьях достоверно не различалось (табл. 2). Возможно, это связано с уменьшением содержания обоих типов хлорофиллов в листьях карликовой формы. У карликовой и высокорослой форм *M. baccata*, пересаженных в г. Иркутск, достоверных различий в значении индекса Хл a/b не обнаружено.

Известно, что хлорофилл *b* служит вспомогательным светособирающим пигментом, на долю которого приходится 15–20% от общего содержания хлорофиллов (Beale, 1999; Тютерева и др., 2017). Доля хлорофилла *b* в ССК I и ССК II составляет примерно 22% и 43% от суммарного количества хлорофиллов соответственно, причем 50% энергопередачи на хлорофилл *a* поступает именно с хлорофилла *b* (Voitsekhovskaja, Tyutereva, 2015). Так как основная функция пигментов ССК состоит в поглощении и передаче энергии квантов света в реакционные центры, то снижение светопоглощающих свойств фотосинтетического аппарата может стать маркером стрессового состояния растений в засушливых условиях. В результате наших исследований было установлено, что для карликовой и высокорослой формы характерны высокие содержания хлорофиллов в ССК (>55% от общего пула зеленых пигментов), однако достоверных отличий между яблонями не обнаружено (табл. 2).

Известно, что в засушливых условиях произрастания в листьях растений увеличивается количество каротиноидов, которые выполняют не только акцепторную функцию, но и напрямую подавляют триплетный хлорофилл, защищая фотосинтетические ткани хлоропласта от окислительного повреждения (Navaux, 1998; Farooq et al., 2009). В результате анализа пигментного состава листьев карликовой и высокорослой формы (с. Ягодное) установлено, что в листьях карликовой яблони суммарное содержание каротиноидов (Кар) достоверно ниже, чем в листьях высокорослой (табл. 2). Достоверных различий в количестве каротиноидов между формами яблони, перенесенными в г. Иркутск, не наблюдали, однако заметна значительная разница по этому показателю в сравнении с дикорастущими деревьями. В высокорослой яблоне г. Иркутска содержание каротиноидов выше, чем в высокорослой форме из с. Ягодное (табл. 2).

Для оценки отклика ФСА растений на стрессовое воздействие часто используют параметр соотношения суммарных содержаний хлорофиллов к каротиноидам, отражающий состав фотосинтетической антенны. Поэтому Хл/Кар может быть характерным показателем пластичности ФСА яблони при недостатке влаги. В результате анализа было показано, что карликовые и высокорослые формы по этому параметру достоверно не различались независимо от места произрастания (табл. 2).

Для регистрации первичных изменений в клеточных структурах под действием стресса целесообразно использовать биофизические методы, например индукцию флуоресценции хлорофилла (ИФХ). Результаты флуоресцентного анализа показали, что между всеми изучаемыми формами яблони по измеренной в темноте фоновой флуоресценции F_0 различий нет (табл. 3). Показатели реальной квантовой эффективности ФС II (видимого квантового выхода) достоверно не различались между дикорастущими формами (в среднем 0,12), однако этот показатель достоверно ниже, чем в формах яблони, перенесенных в г. Иркутск, (в среднем 0,18). Меньший квантовый выход ФС у дикорастущих яблонь, по сравнению с интродуцированными, может свидетельствовать о большей потере энергии возбуждения при ее переносе к реакционным центрам.

При изучении работы ФС II методом индукции флуоресценции хлорофилла, параметр нефотохимического тушения излучения (NPQ) может отражать процессы светорассеивания. В наших экспериментах было установлено, что по коэффициенту NPQ карликовая и высокорослая формы (с. Ягодное) не различались. Однако при сравнении с деревьями, пересаженными в г. Иркутск, этот показатель был достоверно выше (табл. 3). Повышенное значение коэффициента NPQ в деревьях *M. baccata*, произрастающих в

республике Бурятия, может свидетельствовать об адаптации ФСА этих растений к более засушливым условиям по сравнению с г. Иркутском.

Показатели флуоресценции у карликовой и высокорослой яблони, произрастающих в естественных условиях, отличались только в отношении скорости электронного транспорта (ETR) (табл. 3). Так, у высокорослых форм яблони значение ETR достигало $61,8 \pm 8$ мкмоль/($m^2 \cdot c$), что было примерно на 30% выше, чем у карликовых деревьев ($38,7 \pm 3,5$ мкмоль/($m^2 \cdot c$)). Исходя из литературных данных более низкое значение ETR у карликовой формы может быть связано с повышением интенсивности фотодыхания – физиологического процесса, защищающего ФСА от избытка световой энергии при почвенной и воздушной засухе (Рибейро и др., 2008). Деревья, растущие в г. Иркутске, по данному коэффициенту достоверно не различались.

Таблица 3

Основные параметры флуоресценции хлорофилла в ФСII в листьях карликовой и высокорослой *M. baccata*

Параметр	с. Ягодное		г. Иркутск	
	Карликовая форма	Высокорослая форма	Карликовая форма	Высокорослая форма
Фоновая флуоресценция, F0, отн. ед.	0,11±0,00	0,12±0,02	0,11±0,00	0,12±0,01
Максимальная фотохимическая эффективность ФС II, Fv/Fm, отн. Ед	0,76±0,01	0,76±0,02	0,78±0,02	0,77±0,01
Реальная квантовая эффективность ФС II, Y(II), отн. ед.	0,12±0,01	0,12±0,01	0,17±0,03	0,20±0,03
Нефотохимическое тушение, Y(NPQ), отн. ед.	0,63±0,01	0,62±0,03	0,52±0,04	0,51±0,04
Скорость электронного транспорта, ETR, мкмоль/($m^2 \cdot c$)	38,7±3,5*	61,8±8,8	49,5±6,2	54,4±8,3

Примечание: данные представлены в виде средних значений 5–10 биологических повторностей и их стандартных отклонений;

* различия между карликовой и высокорослой формой в с.Ягодное достоверны по критерию Манна-Уитни, $p \leq 0,01$

Фитогормональный статус карликовой и высокорослой яблони.

Выявление гиббереллинозависимости ростовых процессов карликовой яблони. Опыт проводили на карликовых деревьях, пересаженных в г. Иркутск. В ходе эксперимента при нанесении гибберелловой кислоты (ГК₃) на конусы нарастания карликовых деревьев наблюдали более интенсивное (на 50%) удлинение конусов нарастания по сравнению с контрольными растениями: $30,75 \pm 3,22$ см и $20,50 \pm 3,21$ см, соответственно (рис. 2). Повторный эксперимент подтвердил эту тенденцию, скорость роста обработанных конусов в этом случае увеличивалась на 30 %: $16,14 \pm 1,20$ см – контроль, $20,92 \pm 1,91$ см – опыт (рис. 2). Таким образом, после нанесения экзогенной ГК₃ на апикальные части побегов карликовой формы *M. baccata* мы наблюдали значительное увеличение роста этих побегов по сравнению с таковыми у побегов без применения ГК₃ (Столбикова и др., 2018). Чувствительность к этому гормону, которая проявляется у карликовых деревьев *M. baccata*, может быть обусловлена его сниженным эндогенным содержанием из-за нарушений в биосинтезе ГК₃, или из-за накопления репрессоров передачи сигналов ГК₃ – белков DELLA (Hao et al., 2019).

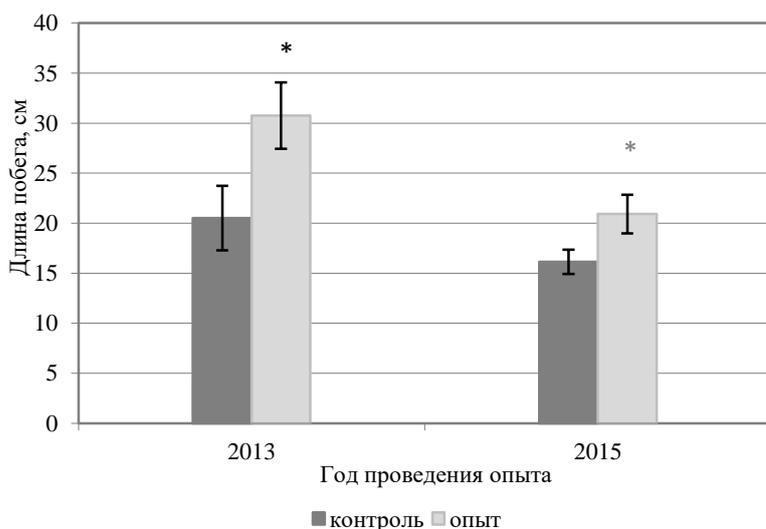


Рисунок 2. Длина побегов карликовой яблони после экзогенного нанесения гибберелловой кислоты

Примечание: контроль обрабатывали 10 мкл водного раствора Твин-20, опыт – 10 мкг гибберелловой кислоты в водном растворе Твин-20.

*Достоверность различий сравниваемых средних значений длины побегов контрольных и опытных растений оценивали с помощью t-критерия ($P \leq 0,05$)

Для качественного определения эндогенного содержания гиббереллина в листьях обеих форм яблони сибирской оценивали способность растительного экстракта, содержащего фитогормоны, увеличивать рост карликового гороха сорта Шустрик. В результате опыта стандартный раствор ГК₃ усиливал рост карликового гороха Шустрик пропорционально концентрации гиббереллина. Суммарные гормональные экстракты из листьев высокорослой и карликовой яблони достоверно не увеличивали рост гороха по сравнению с контролем. Так как формы *M. baccata*, произрастающие в республике Бурятия, имеют явные отличия в росте (карликовые деревья высотой до 110 см, высокорослые 200–250 см) (Рудиковский и др., 2008), то вполне очевидно, что высокорослая яблоня имеет нормальный гиббереллиновый статус. Поскольку гормональные вытяжки ни из листьев карликовой, ни из листьев высокорослой яблони не смогли нивелировать карликовость у гороха, логично предположить, что полученные экстракты содержат, помимо гормональной компоненты, вещества, имеющие ретардантные свойства, другими словами, угнетающие ростовые процессы (Yildirim et al., 2016; Zhou et al., 2019).

Содержание АБК и ИУК. В результате проведенных исследований показано, что содержание АБК и ИУК в верхушечных почках и молодых разворачивающихся листьях карликовой и высокорослой *M. baccata* в с. Ягодное различалось и это соотношение сохранялось при переносе обеих форм на территорию экспериментального участка СИФИБР (рис. 3). Так, содержание ауксина в дикорастущей карликовой яблоне достигало $0,12 \pm 0,01$ мкг/г сухого веса, а в высокорослой – было втрое выше $0,35 \pm 0,06$ мкг/г сухого веса. Содержание АБК было примерно одинаковым в обеих изучаемых формах: в высокорослых $0,21 \pm 0,04$ мкг/г сухого веса и в карликовых деревьях $0,21 \pm 0,02$ мкг/г сухого веса. В деревьях, перенесенных в более благоприятные условия по водообеспеченности (г. Иркутск), наблюдали схожие значения (рис. 3). В показателях содержания АБК для карликовой и высокорослой яблони достоверных различий не наблюдали, значения составляли $0,22 \pm 0,04$ мкг/г сухого веса и $0,18 \pm 0,02$ мкг/г сухого веса соответственно. Известно, что недостаток ИУК в молодых листьях и семядолях может привести к нарушению апикального доминирования (Nayat et al., 2019), поэтому установленное в данной работе меньшее содержание ИУК в апексах карликовой яблони может обуславливать у нее более интенсивный рост скелетных ветвей второго порядка и сильное загущение кроны.

Известно, что функциональное взаимовлияние фитогормонов имеет большое значение для роста и развития растений, особенно в условиях абиотического стресса (Porco et al., 2010). В связи с подобным плейотропным эффектом использование отношения ИУК/АБК в качестве показателя, характеризующего скорость роста растения,

представляется логичной. Индекс соотношения гормонов-антагонистов ИУК/АБК для карликовой и высокорослой яблони при переносе деревьев в г. Иркутск не изменялся и составлял 1,7–1,8 для высокорослой формы и 0,5 – для карликовой (рис. 3). По-видимому, высокая скорость роста у *M. baccata*, обычная для высокорослых деревьев, может быть охарактеризована соотношением ИУК/АБК > 1 (Rudikovskii et al., 2019) и этот показатель может использоваться в качестве диагностического признака карликовости для этого вида яблони.

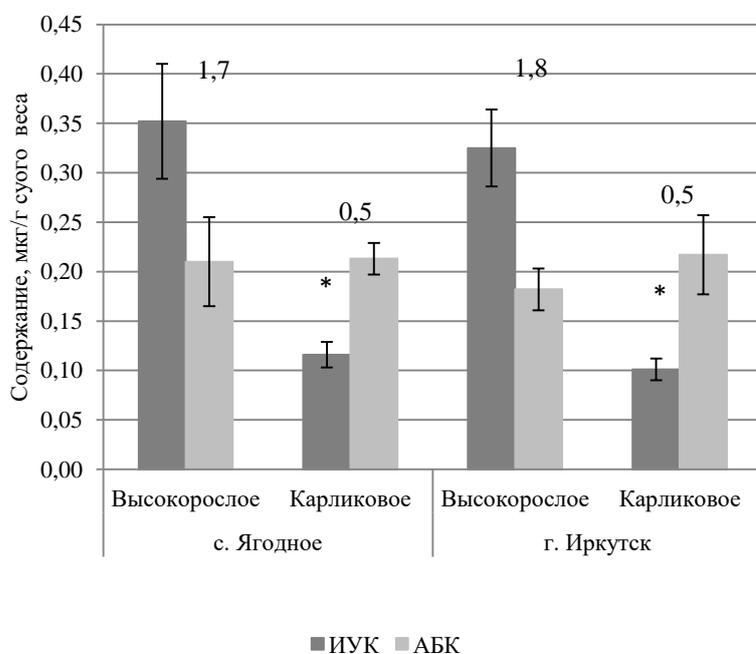


Рисунок 3. Содержание индолилуксусной и абсцизовой кислот в верхушечных почках и молодых разворачивающихся листьях карликовой и высокорослой *M. baccata*, произрастающей в с. Ягодное и г. Иркутске

Примечание: ИУК – индолилуксусная кислота, АБК – абсцизовая кислота; цифрами указаны соотношения ИУК/АБК в каждой форме; однородность выборки из 4-5 повторностей.

*Достоверность различий сравниваемых средних значений содержания ИУК в карликовой и высокорослой яблоне оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($P \leq 0,05$).

В результате анализа содержания ИУК, АБК в коре и завязи были найдены заметные различия в содержаниях этих фитогормонов в карликовой и высокорослой формах яблони (г. Иркутск), в отношении завязей, но не коры. (рис. 4). Было показано, что в коре достоверных различий в содержании ИУК между высокорослой яблоней и карликовой нет, содержание АБК также достоверно не различалось. Индекс соотношения ИУК/АБК в коре яблони также практически не различался между формами, он составил 1,2 в высокорослой яблоне и в карликовой яблоне – 1,3 (рис. 4). Равномерное распределение основных гормонов, регулирующих рост в коре *M. baccata*, может обуславливаться функциональными особенностями вторичной коры в стволе дерева, которая играет в основном проводящую роль (Michalczuk, 2002).

В результате анализа гормонального состава завязей двух форм яблони сибирской установили, что содержание ИУК между ними достоверно различалось: в высокорослой яблоне содержание этого гормона составляло $14,62 \pm 3,49$ мкг/г сухого веса, а в карликовой $3,53 \pm 0,90$ мкг/г сухого веса (рис. 4). В содержании АБК достоверных различий между высокорослой и карликовой формами не установлено, количество этого гормона составляло $0,58 \pm 0,16$ мкг/г сухого веса и $0,37 \pm 0,10$ мкг/г сухого веса, соответственно (рис. 4). Соотношение индекса ИУК/АБК, характеризующего функциональное взаимодействие фитогормонов, между карликом и высокорослым деревом составило 9,6 и 25,0 соответственно (рис. 4).

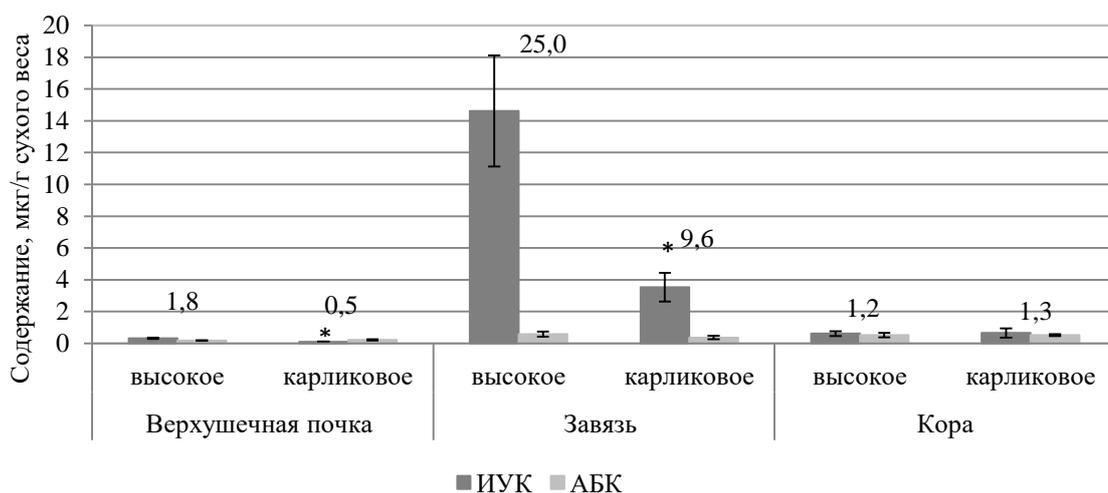


Рисунок 4. Содержание индолилуксусной и абсцизовой кислот в молодых разворачивающихся листьях, завязи и молодой коре карликовой и высокорослой форм *M. baccata*, произрастающей в г. Иркутске

Примечание: ИУК – индолилуксусная кислота, АБК – абсцизовая кислота; цифрами указаны соотношения ИУК/АБК в каждой форме; однородность выборки из 5 повторностей;

* Достоверность различий сравниваемых средних значений содержания ИУК в карликовой и высокорослой яблоне оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($P \leq 0,05$).

Полученные данные подтверждают, что еще на начальных этапах формирования плода (опыление и последующее оплодотворение) происходит значительное изменение гормонального баланса, в первую очередь это касается ослабления ингибирующего действия АБК (Обручева, 2014). Меньшее содержание ауксина в молодых плодах карликовой *M. baccata*, по сравнению с плодами высокорослой яблони, хорошо согласуется с данными об интенсивности плодоношения этих форм. Карликовые деревья закладывают небольшое количество мелких каплевидных плодов с малым числом выполненных семян, тогда как для высокорослой яблони характерны высокая урожайность и более крупный размер плодов (Рудиковский и др., 2008).

Липидный и жирнокислотный профиль карликовой и высокорослой яблони

В результате анализа липидного профиля листьев карликовой и высокорослой яблонь (с. Ягодное) были установлены значимые различия в содержании, как суммарных липидов, так и фосфолипидов. В листьях высокорослой и карликовой форм яблони относительное содержание суммарных липидов составляет соответственно $10,0 \pm 0,5\%$ и $7,0 \pm 0,3\%$ от сухой массы образца. При этом, большую часть от общего содержания липидов составляют фосфолипиды: ткани листьев высокорослой яблони содержат $58,0 \pm 1,4\%$, а карликовой яблони – $48,0 \pm 0,9\%$ от общего количества липидов соответственно. Установленное нами меньшее содержание суммарных липидов и фосфолипидов в листьях карликовой яблони может означать снижение интенсивности липидного метаболизма под воздействием почвенной засухи совместно с частыми ветрами (Новицкий и др., 2015).

По данным тонкослойной хроматографии нами выявлены органоспецифические отличия в составе суммарных липидов листьев и корней. Качественный анализ липидного состава показал, что особенностью листьев является наличие восков. Общеизвестно, что воска входят в состав кутикулярного слоя листа и принимают участие в защите от бактериальных и грибковых повреждений, а также от излишней потери воды (Samuels et al., 2008). В корнях, в отличие от листьев, присутствуют жирные альдегиды, которые могут ингибировать прорастание семян и обладают антибиотическими свойствами (Zhuang et al., 1996).

В связи с изучением адаптации *M. baccata* к условиям почвенной засухи и воздействию частых ветров, особый интерес представляет анализ жирнокислотного (ЖК) состава корней, листьев, а также плодов яблони, произрастающей в с. Ягодное. В результате проведенных исследований установили, что особенности ЖК состава имеют закономерные органоспецифические различия. В связи с разными условиями увлажненности почвы в местах произрастания двух форм, наибольшие отличия в жирнокислотном составе обнаружили в корнях.

Как видно из табл. 4, жирнокислотный состав суммарных липидов корней представлен 18 кислотами с числом углеродных атомов C14–C23. Основными кислотами корней яблони сибирской являются пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая. Основные насыщенные кислоты у обеих форм - пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0).

Жирная кислота		Массовая доля кислоты, %	
Название (тривиальное или IUPAC)	Формула	Карликовая Форма	Высокорослая форма
Миристиновая	14:0	1,14±0,06*	0,88±0,16
Пентадекановая	15:0	0,93±0,10*	0,53±0,07
Пальмитиновая	16:0	20,6±1,04	21,12±0,81
Гексадеценовая	16:1 ω9	4,33±0,76*	1,7±0,49
Пальмитолеиновая	16:1 ω7	1,22±0,01*	0,38±0,04
Гексадеценовая	16:1 ω5	0,77±0,08*	0,3±0,01
Гексадекановая	15-m-16:0i	0,44±0,12	-
Гексадекановая	14-m-16:0a	0,3±0,05	0,49±0,28
Маргаритиновая	17:0	0,34±0,12*	0,95±0,09
Гептадекановая	17:0i	0,20±0,1	-
Стеариновая	18:0	9,37±1,60*	6,6±0,34
Олеиновая	18:1 ω9	14,58±2,08*	5,74±0,99
Цис-вакценовая	18:1 ω7	2,48±0,43*	1,2±0,30
Линолевая	18:2 ω6	22,69±1,96*	40,87±0,21
α-Линоленовая	18:3 ω3	12,66±0,44	12,99±1,20
Арахидиновая	20:0	2,51±0,66	2,41±2,41
Генэйкоциловая	21:0	0,52±0,04*	0,75±0,12
Бегеновая	22:0	4,02±0,99	2,49±0,83
Трикоциловая	23:0	1,11±0,40	0,62±0,15
НЖК		41,48±1,42*	36,84±1,01
ПНЖК		58,73±2,04*	63,18±0,41
ПНЖК/НЖК		1,42±0,03*	1,71±0,05
ИДС		1,07	1,30

Таблица 4
Жирнокислотный состав суммарных липидов корней карликовой и высокорослой формы *M. baccata* (с. Ягодное), а также интегральные параметры

жирнокислотного состава
Примечание: НЖК – сумма насыщенных жирных кислот, ПНЖК – сумма ненасыщенных жирных кислот, ИДС – индекс ненасыщенности жирнокислотного состава.

*Достоверность различий сравниваемых средних значений содержания жирных кислот в карликовой и высокорослой яблоне оценивали с помощью t-критерия (P<0,05)

Характерной особенностью корней является наличие некоторого количества изомеров кислот с нечетным числом атомов углерода C15–C17, при этом их содержание не превышает 1% от суммы всех кислот. Следует отметить, что корни яблони сибирской наряду с неразветвленными жирными кислотами содержат в небольшом количестве их изомерные формы (изо- и анти- изоациды). В составе жирных кислот корней карликовой и высокорослой форм яблони преобладают ненасыщенные жирные кислоты. Их содержание относительно суммы кислот составило 58,73±2,04% и 63,17±0,41% соответственно. Среди ненасыщенных жирных кислот идентифицированы моноеновые, диеновые и триеновые кислоты, в основном образующие ω9-, 2ω6- и 3ω3- семейства жирных кислот с *цис*-конфигурацией двойных связей. Среди моноеновых кислот обнаружены в небольшом количестве кислоты семейства ω7-. Преобладающей среди моноеновых кислот у обеих форм была олеиновая. Ее содержание составило 14,58±2,08% от суммы кислот у карликовой и 5,74±0,99% – у высокорослой. Содержание стеариновой и олеиновой кислот в корнях карликовой формы заметно выше, чем в корнях

высокорослой. Как видно из табл. 4, параметры, характеризующие степень ненасыщенности жирных кислот – индекс ненасыщенности (ИДС) и отношение количества ненасыщенных и насыщенных кислот ПНЖК/НЖК, у двух типов яблони заметно отличаются. У высокорослой формы оба показателя достоверно выше. Так, индекс ненасыщенности жирных кислот в корнях карликовой и высокорослой форм яблони составил 1,07 (самый низкий показатель из всех исследуемых тканей) и 1,30, соответственно. Индекс ПНЖК/НЖК в корнях карликовой формы составил $1,42 \pm 0,03$, в высокорослой – $1,71 \pm 0,05$. Логично предположить, что липидная адаптация корней к дефициту воды у карликовой формы яблони связана со снижением синтеза линолевой кислоты и индукцией синтеза длинноцепочечных насыщенных кислот C22–23 ряда.

Общеизвестно, что мембранный бислой фотосинтезирующих клеток определяется составом глико- и фосфолипидов, а устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям в первую очередь связана с изменением количественного состава липидов клеточных мембран листьев и их жирных кислот (Dörmann, Hölzl, 2009). Поэтому следующей задачей исследования был сравнительный анализ относительного содержания жирных кислот в фосфолипидах листьев карликовой и высокорослой форм, произрастающей в с. Ягодное. В результате такого анализа (табл. 5) установлено, что в фосфолипидах карликовой формы яблони содержание насыщенной пальмитиновой кислоты выше, что отразилось в сумме НЖК. Интегральные параметры ПНЖК/НЖК и ИДС у высокорослой формы заметно выше, чем у карликовой. В целом индекс ненасыщенности для листьев обеих форм высокий: 2,18 для высокорослой формы и 1,93 для карликовой, что обусловлено большим содержанием полиненасыщенных кислот. Разница между двумя экологическими формами яблони по этому параметру в фосфолипидной фракции закономерно более выражена, чем во фракции суммарных липидов. У обеих форм наблюдается присутствие некоторого количества изомеров мононенасыщенных кислот ряда C16:1 и C18:1, а также длинноцепочечных ненасыщенных кислот ряда C20, относительное содержание которых при этом не превышает 0,5%.

Жирная кислота		Массовая доля кислоты, %	
Название (тривиальное или IUPAC)	Формула	Карликовая Форма	Высокорослая Форма
Миристиновая	C14:0	0,32±0,18	0,18±0,08
Пальмитиновая	C16:0	20,87±3,19*	15,68±1,50
Гексадеценовая	C16:1 ω9	0,10±0,05	0,18±0,06
Пальмитоолеиновая	C16:1 ω7	0,17±0,06	0,25±0,02
Гексадеценовая	C16:1 ω5	3,78±1,26	2,88±0,43
Маргариновая	C17:0	0,22±0,04	0,20±0,02
Гексадекатриеновая	C16:3 ω3	0,21±0,10*	0,64±0,21
Стеариновая	C18:0	3,52±0,50*	2,64±0,28
Олеиновая	C18:1 ω9	3,53±0,72	3,11±0,18
Цис-вакценовая	C18:1 ω7	0,33±0,04	0,31±0,04
Линолевая	C18:2 ω6	10,42±1,30	8,66±1,46
α-Линоленовая	C18:3 ω3	50,36±6,65*	63,49±3,10
Арахидиновая	C20:0	0,60±0,15	0,50±0,09
Гондовая	C20:1 ω9	0,24±0,09	0,14±0,03
Скиадоновая	C20:3 ω3	0,20±0,04*	0,36±0,04
Бегеновая	C22:0	0,30±0,09	0,32±0,04
Трикоциловая	C23:0	0,08±0,04	0,07±0,01
НЖК		26,02±2,01*	19,74±1,95
ПНЖК		74,01±2,11*	80,26±1,74
ПНЖК/НЖК		2,84±0,15*	4,06±0,23
ИДС		1,93	2,18

Таблица 5
Жирнокислотный состав фосфолипидов листьев карликовой и высокорослой форм *M. baccata*, произрастающей в с. Ягодное, а также интегральные параметры жирнокислотного состава
 Примечание: НЖК – сумма насыщенных жирных кислот, ПНЖК – сумма ненасыщенных жирных кислот, ИДС – индекс ненасыщенности жирнокислотного состава
 *Достоверность различий сравниваемых средних значений содержания жирных кислот в карликовой и высокорослой яблоне оценивали с помощью t-критерия (P<0,05)

В результате анализа жирнокислотного состава суммарных липидов плодов высокорослой и карликовой форм *M. baccata*, произрастающей в с. Ягодное, установлено, что основными насыщенными кислотами в плодах обеих форм являются пальмитиновая и стеариновая. Также была обнаружена в небольших количествах среднецепочечная C12:0 (лауриновая) кислота. Мононенасыщенные представлены олеиновой, *цис*-вакценовой (C18:1 ω 7) и следовыми количествами пальмитоолеиновой (C16:1 ω 7) кислоты. Основными полиненасыщенными кислотами являются диеновая линолевая и триеновая α -линоленовая. Обращает на себя внимание соотношение содержания линолевой и линоленовой кислот. Если у высокорослой формы содержание линолевой кислоты заметно выше, чем линоленовой (42,20 \pm 1,41% и 26,98 \pm 2,11% соответственно), то у карликовой содержание этих кислот практически одинаково (33,82 \pm 1,14% и 32,18 \pm 2,11% соответственно). Известно, что в ЖК статусе плодов яблони основной вклад вносят семена, для которых характерно более высокое содержание линолевой кислоты по сравнению с α -линоленовой (Dadwal et al., 2018; Abbas et al., 2019). Одинаковое содержание линолевой и α -линоленовой кислот в плодах карликовых яблонь, возможно, является способом сохранения генеративного аппарата в условиях недостаточной влагообеспеченности в местах произрастания таких яблонь.

Профиль свободных аминокислот карликовой и высокорослой яблони

Был проведен сравнительный анализ аминокислотного состава листьев яблони обеих форм, перенесенных в г. Иркутск. Профиль свободных аминокислот листьев яблони (табл. 6) представлен десятью протеиногенными кислотами: аланин, валин, глицин, изолейцин, пролин, серин, треонин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, – и непротеиногенной пироглутаминовой кислотой (5-оксопролин). Выявлены значимые отличия в аминокислотном составе между формами яблони, а также установлены изменения содержания некоторых кислот в листьях в течение летних месяцев (июнь–июль).

Таблица 6

Аминокислотный профиль листьев карликовой и высокорослой форм *M. baccata*, произрастающей в г. Иркутске, в июне–июле 2017г.

Аминокислота	Содержание, мкг/г сухого веса			
	Июнь		Июль	
	Карликовая	Высокорослая	Карликовая	Высокорослая
Аланин	175,6 \pm 38,3	166,7 \pm 20,2	126,6 \pm 35,0	195,1 \pm 44,2
Валин	29,5 \pm 6,5	38,7 \pm 0,0	217,5 \pm 70,4	96,1 \pm 28,0*
Глицин	54,0 \pm 4,5	74,2 \pm 13,6*	122,7 \pm 17,8	116,5 \pm 22,7
Лейцин	27,8 \pm 6,9	22,1 \pm 6,6	10,9 \pm 1,4	14,1 \pm 2,3
Изолейцин	8,6 \pm 0,8	11,3 \pm 2,9	25,3 \pm 6,0	26,4 \pm 6,1
Пролин	49,6 \pm 8,2	47,8 \pm 8,9	1,0 \pm 0,1	1,5 \pm 0,6
Серин	38,0 \pm 8,4	53,5 \pm 1,1*	63,7 \pm 7,9	84,0 \pm 21,4
Треонин	49,3 \pm 8,8	67,9 \pm 14,4	43,2 \pm 11,8	63,8 \pm 20,3
5-Оксопролин	26,0 \pm 4,7	21,0 \pm 3,2	28,8 \pm 3,6	21,9 \pm 4,4
Аспарагиновая кислота	113,7 \pm 27,6	159,7 \pm 10,5	168,9 \pm 21,0	312,5 \pm 57,0*
Глутаминовая кислота	193,6 \pm 28,1	274,3 \pm 5,9*	643,0 \pm 55,4	678,6 \pm 96,9
Суммарно аминокислот	616,1 \pm 123,2	958,3 \pm 66,8*	1365,1 \pm 182,8	1607,0 \pm 292,8

*Достоверность различий сравниваемых средних значений содержания аминокислот в карликовой и высокорослой яблоне оценивали с помощью критерия Манна-Уитни

Доминирующей аминокислотой в листьях яблони обеих форм была глутаминовая кислота. Вероятно, это объясняется тем, что она является предшественником пролина и его производных, и некоторых других протеиногенных и непротеиногенных аминокислот. В июне содержание глутаминовой кислоты у высокорослой формы было заметно выше (274,3 \pm 5,9 мкг/г сухого веса), чем у карликовой (193,6 \pm 28,1 мкг/г сухого веса). В июле между формами яблони достоверных различий не наблюдали, однако её содержание было

в три раза выше по сравнению с июньскими пробами (табл. 6). Содержание пролина в карликовой и высокорослой яблоне достоверно не различалось. Однако в июньских пробах его количество на порядок было выше, чем в июльских. Увеличение пролина в листьях в июне коррелирует с уменьшением содержания глутаминовой кислоты, что может быть связано с более активными процессами синтеза пролина и его производных в раннелетний период. Активный синтез осмопротектора возможно связан с более засушливым июнем, когда средняя температура месяца составила 18,4 °С (максимальная 33,6 °С) при низком значении количества осадков в месяц 15 мм, тогда как в июле эти показатели составляли 19,3 °С и 69 мм, соответственно. Известно, что при действии угнетающих факторов (влияющих на понижение водного потенциала в клетках растений) количество пролина увеличивается в несколько десятков раз (Кузнецов, Шевякова, 1999; Matysik et al., 2002; Келес, Онсел, 2004; Гаджиева и др., 2010). В нашем случае, десятикратное увеличение пролина в обеих формах яблони в июне также может свидетельствовать о неблагоприятных условиях произрастания, связанном с недостаточной увлажненностью почвы.

Проведенный анализ содержания свободных аминокислот в листьях обеих форм *M. baccata* и их суммарного содержания, показал, что карликовая яблоня в июне содержит на 30% меньше аминокислот, чем высокорослая. Меньшее содержание суммы аминокислот в карликовой яблоне по сравнению с высокорослой сохраняется и в июле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Карликовая и высокорослая формы *M. baccata*, являющиеся объектом этого исследования, произрастают в лесостепной зоне (близ с. Ягодное республики Бурятия). При этом условия произрастания этих форм значительно отличаются по водообеспеченности. Если высокорослые деревья растут в подлеске хвойного леса по берегам ручья, то карликовые яблони обнаружены на открытом пригорке, на значительном удалении от источников воды. Анализ климатических показателей показал, что для данной местности (с. Ягодное) характерны более высокие температуры и низкая влажность воздуха по сравнению с контрольной территорией (г. Иркутск). Кроме того, частые ветра со скоростью 10–14 м/с, характерные для Гусиноозерского района, также могут оказывать губительное иссушающее действие на растения, повышая тем самым транспирацию. Эти показатели могут быть стрессовыми факторами для обеих форм яблони сибирской. В результате сравнительной оценки почвы, где произрастают обе формы, и ее полевой влагоемкости было установлено, что карликовая форма *M. baccata* произрастает на более тонком плодородном слое почвы, по сравнению с высокорослыми деревьями. Дресва, располагающаяся в этих местах под плодородным слоем, не позволяет удерживать воду, что затрудняет доступ к почвенной влаге для карликовых форм. Таким образом, обе формы *Malus baccata* (L.) Borkh. произрастают в условиях умеренной воздушной засухи, усиленной ветрами, при этом карликовая яблоня подвергается дополнительно воздействию почвенной засухи.

В результате исследования фотосинтетических пигментов установили более низкое содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях карликовой яблони, по сравнению с листьями высокорослой формы, а также более низкую относительную скорость электронного транспорта в листьях карликов. Это может свидетельствовать о снижении фотосинтетической эффективности у низкорослых деревьев. Возможно, это является одной из причин уменьшения количества листьев на побегах карликовых яблонь и изменения формы листовой пластинки (у карликов она уже и короче). Изучение основных параметров флуоресценции хлорофилла показало, что на фоне повышенного индекса нефотохимического тушения в листьях высокорослой дикорастущей яблони (с. Ягодное) реальный квантовый выход ФСII ниже, чем у высокорослых деревьев, произрастающих в контрольных условиях г. Иркутска. По нашему мнению, такие различия объясняются

неблагоприятными природными условиями произрастания *M. baccata*, связанными с действием воздушной засухи.

В результате проведенных исследований фитогормонов было установлено, что содержание АБК в листьях яблони было сходным у обеих изучаемых форм, произрастающих в природных условиях (с. Ягодное) и на контрольной территории (г. Иркутск). Это может свидетельствовать о неоднозначной функции АБК в процессах адаптации растений к длительно действующей умеренной почвенной засухе. Нами было выявлено меньшее содержание ИУК в листьях карликовой яблони сибирской, по сравнению с высокорослыми формами. Полученные данные коррелируют с установленным ранее более высоким разнообразием молекулярных форм пероксидазы у карликовых особей *M. baccata*, произрастающих в республике Бурятия (Кузнецова, 2010), которая, как известно, участвует в деградации ИУК. Недостаток ИУК, в свою очередь, мог привести к нарушению апикального доминирования и снижению скорости роста яблони.

Проведенный нами анализ липидного состава в листьях показал, что карликовая яблоня содержит на 3% меньше суммарных липидов и на 10% меньше фосфолипидов по сравнению с высокорослой формой. Известно, что уменьшение липидов при длительном стрессовом воздействии, как структурного компонента мембран в клетке, может свидетельствовать об уменьшении количества хлоропластов, митохондрий и общей площади цитоплазматических мембран (Новицкий и др., 2015). Исходя из этого, обнаруженное нами более низкое общее содержание липидов в листьях карликовой яблони коррелирует со сниженным содержанием фотосинтетических пигментов по сравнению с высокорослой формой и может означать снижение интенсивности метаболизма у карликовой формы *M. baccata*.

В результате исследования жирнокислотного состава листьев, корней и плодов двух форм яблони было показано, что профиль жирных кислот закономерно органоспецифичен. В связи с разными условиями увлаженности почвы в местах произрастания двух форм яблони сибирской, наибольшие отличия в жирнокислотном составе обнаружили в корнях. В целом, ЖК-состав корней характеризовался большим содержанием насыщенных и моноеновых ненасыщенных кислот по сравнению с надземными органами. Кроме того, выявляются определенные различия в содержании насыщенных и ненасыщенных кислот полярных липидов листьев исследуемых форм. Более низкие значения индексов ненасыщенности у карликовой яблони по сравнению с высокорослой формой обусловлены меньшим содержанием α -линоленовой кислоты. Было доказано, что под воздействием абиотических факторов, влияющих на осмотику растительной клетки, в мембранах тилакоидов снижается содержание кислоты C18:3 ω , как основного компонента гликолипидов, и увеличивается содержание кислоты C16:0 (Chen et al., 2018; Liu et al., 2019; Sebastiana et al., 2019). Поэтому снижение содержания ненасыщенных жирных кислот, в частности α -линоленовой, в листьях карликовых деревьев может также свидетельствовать о реакции на более засушливые по сравнению с высокорослыми яблонями условия произрастания.

В результате проведенного нами анализа различий в содержании пролина между двумя формами яблони сибирской установлено не было. При этом была выявлена особенность профиля свободных аминокислот у карликовой *M. baccata*, которая заключалась в более низком содержании общего их количества в листьях этой формы почти на 30%, по сравнению с высокорослыми деревьями. Это также может быть характерным признаком замедления метаболических процессов, связанных с адаптацией к неблагоприятным условиям произрастания.

По результатам, полученным в данной работе, можно сделать следующее заключение: умеренная длительно действующая почвенная засуха, воздушная засуха, усиленная частыми ветрами, тонкий плодородный слой почвы и ее слабая способность к водоудержанию оказали плейотропное воздействие на рост и развитие *M. baccata* в с. Ягодное (республика Бурятия). По всей видимости, для деревьев яблони сибирской,

которые оказались в этих условиях, центральной стратегией адаптации к засухе стала стратегия акклиматизации. В процессе исследования нами не обнаружено увеличение содержания свободного пролина в карликовых формах *Malus baccata* (L.) Borkh., которое могло бы свидетельствовать о наличии стратегии толерантности. Однако полностью отвергать эту стратегию адаптации у *M. baccata* не следует, так как не изучено содержание белков теплового шока и полиаминов.

Стремление к сокращению обезвоживания тканей выразилось в замедлении всех метаболических процессов, а именно:

1. В снижении содержания фотосинтетических пигментов и относительной скорости электронного транспорта в ФСЦ.
2. В снижении содержания фитогормонов, ответственных за рост.
3. В снижении содержания суммарных и полярных липидов листьев и ненасыщенности их жирных кислот.
4. В уменьшении количества свободных аминокислот

Замедление этих процессов, по-видимому, привело к уменьшению роста деревьев. По всей видимости, такая невысокая кустарниковая форма яблони позволяет ей более успешно адаптироваться к длительному периоду умеренной засухи и более успешно входить в генеративную фазу.

Литературные данные и полученные в работе сведения о влиянии климатических факторов и физиолого-биохимических путях формирования карликовости у *Malus baccata* (L.) Borkh., произрастающей в с. Ягодное (республика Бурятия), можно обобщить в виде следующей схемы (рис. 5).



Рисунок 5. Схема путей физиолого-биохимической адаптации *Malus baccata* (L.) Borkh. к климатическим условиям произрастания в республике Бурятия, приводящей к формированию карликовости.

Примечание: красным цветом обозначены параметры, установленные в рамках данного исследования.

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. Карликовый статус яблони формируется под влиянием совместного действия умеренной почвенной и воздушной засухи в весенне-летний период, усиленной частыми ветрами, характерными для степных зон республики Бурятия.
2. При переносе растений в более благоприятные условия по водообеспеченности (г. Иркутск) наблюдали интенсификацию роста у карликовых деревьев. Однако замедленные темпы роста по сравнению с высокорослыми яблонями и нарушение апикального доминирования в карликовых деревьях сохранялись.
3. В листьях дикорастущей (с. Ягодное) карликовой яблони наблюдали более низкое общее содержание хлорофиллов и каротиноидов, по сравнению с высокорослой формой. Установлено, что относительная скорость электронного транспорта в листьях дикорастущей карликовой яблони была достоверно ниже, чем в высокорослой форме. Реальный квантовый выход ФСII в листьях обеих форм дикорастущей яблони был ниже, чем у деревьев, произрастающих в более благоприятных по водообеспеченности условиях (г. Иркутск).
4. Эксперименты с эндогенным нанесением гиббереллина на верхушечные почки яблони показали выраженную гиббереллин-чувствительность карликовой формы
5. В результате сравнительного анализа количественного содержания эндогенных абсцизовой и индолилуксусной кислот в верхушечных почках, коре (флоэма+камбий) и плодах на стадии активного роста установлено, что содержание этих гормонов органоспецифично и определяется функциями тканей. Более выраженное различие между карликовой и высокорослой формой яблони по содержанию индолилуксусной кислоты было обнаружено в молодых листьях. Оно было в три раза ниже в листьях карликовой яблони, чем в листьях высокорослой, на фоне одинакового содержания абсцизовой кислоты.
6. Сравнительный анализ липидного состава листьев карликовой и высокорослой дикорастущей яблони показал, что у карликовой формы содержание суммарных липидов ниже на 3%, а содержание фосфолипидов на 10% относительно высокорослой формы. Показано, что индекс ненасыщенности жирных кислот корней и листьев у карликовой формы яблони был ниже, чем у высокорослой.
7. В результате сравнительного анализа содержания аминокислот в листьях карликовой и высокорослой яблони в июне-июле было установлено увеличение содержания пролина у обеих форм в ответ на засуху в июне. На протяжении этих летних месяцев наблюдали тенденцию к снижению суммарного содержания аминокислот в тканях карликовой яблони по сравнению с высокорослой.
8. У яблони сибирской, произрастающей в республике Бурятия, в условиях длительной умеренной почвенной и воздушной засухи, усиливающейся частыми ветрами, по-видимому, наблюдается давление генетически детерминированного отбора в пользу карликовых форм. Деревья этой формы значительно отличаются от высокорослой не только по морфологическим признакам (рост, загущенность кроны, уменьшение количества и размера листьев), но и по основным физиолого-биохимическим параметрам: меньшее содержание фотосинтетических пигментов, суммарных липидов и свободных аминокислот, а также характерный фитогормональный и жирнокислотный составы. На основании полученных данных, можно заключить, что адаптация карликовой яблони к засушливым условиям произрастания сводится к стратегии акклиматизации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Рудиковский А. В., **Столбикова А. В.**, Дударева Л. В., Рудиковская Е. Г., Побежимова Т. П. *Сравнительный анализ содержания индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот в побегах карликовой и высокорослой форм яблони сибирской в природных условиях и при интродукции* / Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология /Иркутск: изд. ИГУТ, Т.: 6 , №2, 2013г., С.: 34 – 42.
2. Rudikovskii A. V., Dudareva L. V., **Stolbikova A. V.**, Rudikovskaya E. G., Potemkin O. N. *Effect of growth conditions on lipid and fatty acid composition of dwarf and tall forms of siberian crabapple (Malus baccata L.)/ Contemporary problems of ecology/ Pleiades Publishing Ltd. (Плеядес пэблишинг Лтд.) (Род-Таун), V. 6, №: 4, 2013, P. 434-440*
3. **Столбикова А. В.**, Шишпаренок А. А., Рудиковский А. В., Рудиковская Е. Г., Дударева Л. В. *Возможное участие гиббереллинов в образовании карликовых форм яблони сибирской Malus baccata (L.) Bork.* / Сибирский лесной журнал. 2018. №1. С. 59-64/doi: 10.15372/SJFS20180106
4. Alexandr V. Rudikovskii, **Alexandra V. Stolbicova**, Elena G. Rudikovskaya, Luybov V. Dudareva. *Role of phytohormones in the formation of dwarf and tall siberian crabapple (Malus baccata L. Bork) / Zemdirbyste-Agriculture. 2019, vol. 106, No. 2, p. 167–172/ doi: 10.13080/z-a.2019.106.022*
5. **Столбикова А. В.**, Дударева Л. В., Рудиковский А. В., Ставицкая З. О., Копытина Т. В., Рудиковская Е. Г. *Особенности состава и содержания ауксинов в тканях яблони сибирской Malus baccata L. Borkh. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 4. С. 620-626. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-4-620-626>.: 01.06.2024*

Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

1. Рудиковский А. В., Дударева Л. В., Рудиковская Е. Г., Соколова Н. А., **Назарова А. В.** *Особенности биохимического состава тканей карликовой и высокорослой форм яблони сибирской Malus baccata (L.) Borkh/* Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем»/ Институт биологии Коми НЦ Уро РАН (Сыктывкар), Часть I, 2007 г., с.:358 -359
2. **Назарова А. В.**, Дударева Л. В., Рудиковский А. В. *Влияние условий произрастания на липидный и жирнокислотный состав карликовой и высокорослой форм яблони сибирской (malus baccata l.)/* Материалы всероссийской конференции «устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» г. Иркутск, 2009. С. 306-309.
3. **Столбикова А. В.**, Рудиковский А. В., Дударева Л. В. *Сравнительный анализ содержания пигментов фотосинтетического аппарата карликовой и высокорослой форм яблони сибирской /* материалы всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Глобальные и региональные процессы» Бурятский государственный университет (Улан-Удэ), 2010 г., с. 109 – 111.
4. Рудиковский А. В., Рудиковская Е. Г., **Столбикова А. В.**, Дударева Л. В. *Биохимические особенности формирования карликового статуса яблони сибирской/* Материалы II международной научной конференции: Разнообразие почв и биоты северной и центральной Азии / Издательство Бурятского научного центра СО РАН (Улан –Удэ), 2011 г., Т.1, с.: 250-252
5. **Столбикова А. В.**, Рудиковский А. В., Дударева Л. В. *Влияние условий произрастания на фотосинтетический аппарат яблони сибирской (malus baccata l. bork.)/* Материалы всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» г. Иркутск, 2013. С. 426-429.
6. **Столбикова А. В.**, Шишпаренок А. А., Рудиковский А. В., Рудиковская Е. Г., Дударева Л. В. *Роль гиббереллинов в образовании карликовых форм яблони*

сибирской (Malus baccata (L.) Borkh) в условиях лесостепного экотона/ Всеросс. Научн. Конф.: Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде/ Издательство института географии им. Сочавы СО РАН (Иркутск), 2016 г., с. 166 -167.

7. **Столбикова А. В.**, Рудиковский А. В., Шишпаренок А. А., Рудиковская Е. Г., Дударева Л. В. *Физиолого-биохимические аспекты формирования карликовости malus baccata (L.) Borkh на территории лесостепного экотона / материалы всероссийской конференции «Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии»* г. Иркутск, 2017. С. 208-211.