

ВЛИЯНИЕ ПРАЙМИНГА СЕМЯН 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА АДАПТАЦИЮ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ К ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ

Т. Г. КУРЬЯНЧИК¹⁾, Н. В. КОЗЕЛ²⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

²⁾Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей»,
222202, д. Сосновая, Озеричко-Слободской с/с,
Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

Аннотация. Показано, что прайминг семян 5-аминолевулиновой кислотой существенно влияет на адаптационные механизмы фотосинтетического аппарата листьев растений ячменя сорта Аванс при действии почвенной засухи. Предварительная обработка семян 5-аминолевулиновой кислотой в условиях стресса снижает накопление в листьях активных форм кислорода и оказывает стабилизирующее действие на пигментный аппарат, поддерживая высокое содержание β-каротина. Кроме того, прайминг семян 5-аминолевулиновой кислотой приводит к увеличению количества белка Lhca2 светособирающего комплекса фотосистемы I, но не оказывает существенного влияния на количество белков фотосистемы II как при засухе, так и при нормальном поливе, что может способствовать перераспределению энергии поглощенных квантов света в пользу фотосистемы I и является эффективным защитным механизмом, снижающим фотоповреждение фотосистемы II при окислительном стрессе. Предпосевная обработка семян 5-аминолевулиновой кислотой стабилизирует фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя в условиях засухи, уменьшая при этом подавление регулируемой составляющей нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла как важного защитного механизма при стрессе.

Ключевые слова: почвенная засуха; 5-аминолевулиновая кислота; прайминг семян; окислительный стресс; активные формы кислорода; фотосинтетический аппарат; ячмень.

Образец цитирования:

Курьянчик ТГ, Козел НВ. Влияние прайминга семян 5-аминолевулиновой кислотой на адаптацию фотосинтетического аппарата растений ячменя к почвенной засухе. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;3:10–21. EDN: NBNVNW

For citation:

Kuryanchyk TG, Kozel NV. Influence of seed priming with 5-aminolevulinic acid on adaptation of the photosynthetic apparatus of barley plants to soil drought. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;3:10–21. Russian. EDN: NBNVNW

Авторы:

Татьяна Геннадьевна Курьянчик – научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.
Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; главный технолог.

Authors:

Tatsiana G. Kuryanchyk, researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
t.kuryanchyk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7727-3451>
Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; chief technologist.
koz.el.mikalai@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

INFLUENCE OF SEED PRIMING WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID ON ADAPTATION OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF BARLEY PLANTS TO SOIL DROUGHT

T. G. KURYANCHYK^a, N. V. KOZEL^b

^a*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

^b*Peasant (farm) economy «Serebryanyj ruchej», Sasnovaja 222202,
Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus*

Corresponding author: T. G. Kuryanchyk (t.kuryanchyk@gmail.com)

Abstract. It has been shown that seed priming with 5-aminolevulinic acid significantly affects the adaptation mechanisms of the photosynthetic apparatus of leaves of barley plants of the Avans variety under the influence of soil drought. Pre-treatment of seeds with 5-aminolevulinic acid under stress conditions reduces the accumulation of reactive oxygen species in leaves and has a stabilising effect on the pigment apparatus, maintaining a high β -carotene content. Priming of seeds with 5-aminolevulinic acid leads to an increase in the content of the protein Lhca2 of the light-harvesting complex of photosystem I against the background of the absence of a significant effect of 5-aminolevulinic acid on the content of photosystem II proteins both under drought conditions and under normal watering, which can contribute to the redistribution of the energy of absorbed light quanta in benefits photosystem I and is an effective protective mechanism that reduces photodamage to photosystem II under oxidative stress. Seed priming with 5-aminolevulinic acid stabilises the photochemical activity of barley leaf photosystems under drought conditions, while reducing the suppression of the regulated component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence as an important protective mechanism under stress.

Keywords: soil drought; 5-aminolevulinic acid; seed priming; oxidative stress; reactive oxygen species; photosynthetic apparatus; barley.

Введение

Глобальное изменение климата отрицательно сказывается на сельскохозяйственном производстве во многих регионах планеты [1; 2]. Сопутствующая климатическим изменениям засуха является сегодня наиболее значимым стрессовым фактором, способным приводить к образованию в клетках растений активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный молекулярный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал ($\text{OH}^\bullet$) и пероксид водорода (H_2O_2), которые обладают высокой реакционной способностью и цитотоксичностью. Накопление в клетках избыточных количеств АФК, в свою очередь, служит причиной повреждения биологически важных макромолекул и вызывает нарушение ключевых физиолого-биохимических процессов в растительном организме. В таких условиях изменяется метаболический и окислительный гомеостаз растительной клетки, что в конечном итоге может привести к ее гибели. Кроме того, чрезмерное накопление АФК в листьях растений может вызвать их старение из-за распада фотосинтетических пигментов [3]. Степень повреждения растительной клетки в результате действия факторов абиотического стресса, в том числе засухи, зависит от продолжительности воздействия, вида и сорта растения, его стрессоустойчивости [4].

При засухе ключевую роль играют адаптивные механизмы, которые позволяют растению преодолевать стрессовое воздействие [5]. Важным аспектом повышения эффективности сельскохозяйственного производства в условиях стремительного изменения климата, в том числе при частых засухах, является разработка экологически безопасных регуляторов роста и антистрессоров, позволяющих снизить негативное воздействие факторов биотического и абиотического стресса. Экзогенное применение различных небольших молекул или регуляторов роста – хорошо известный метод повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [6]. Среди множества идентифицированных гормонов, регуляторов роста и развития или малых сигнальных молекул 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) является эффективной против пагубных последствий, вызываемых у растений абиотическим стрессом, в частности засухой [7].

Ранее нами было показано, что обработка листьев растений ячменя сорта Аванс, характеризующегося относительно низкой засухоустойчивостью, АЛК методом опрыскивания приводит к более интенсивному развитию окислительного стресса в растениях данного сорта при действии почвенной засухи, чем в растениях засухоустойчивого сорта Бровар [8], это указывает на сортоспецифичность действия АЛК при

опрыскивании и неэффективность такого способа обработки для неустойчивых к засухе сортов. Одним из предполагаемых механизмов, определяющих снижение эффективности данного регулятора роста, является усиление в клетках растений менее засухоустойчивых сортов фотоокислительного стресса, который наряду со стабилизирующим действием может инициировать АЛК, попадая непосредственно в листья при опрыскивании.

Однако в работах лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси было показано, что альтернативным способом повышения стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур с использованием АЛК является предпосевная обработка (прайминг) семян растворами этого естественного метаболита растительной клетки [9]. Авторы настоящей статьи предполагают, что прайминг семян ячменя сорта Аванс АЛК позволит увеличить устойчивость растений этого сорта к действию почвенной засухи путем снижения уровня АФК в клетках растительного организма и, как следствие, уменьшения окислительного повреждения основных структурных компонентов фотосинтетического аппарата (ФСА), а также стабилизации фотохимической активности фотосистем в условиях засухи. Такие исследования позволят получить дополнительную информацию о механизмах действия АЛК, что в перспективе может лечь в основу разработки новых подходов к повышению урожайности сельскохозяйственных культур при засухе, основанных на применении АЛК как эффективного экологически безопасного стрессопротектора и стимулятора роста растений.

Таким образом, актуальной задачей представляется изучение использования прайминга семян АЛК, являющейся препаратом естественного происхождения, для повышения продуктивности растений в стрессовых условиях, в том числе при засухе, за счет более быстрого развития защитных реакций. Целью данной работы было исследование влияния прайминга семян АЛК на адаптацию ФСА растений ячменя к засухе.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования в данной работе использовали проростки растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Аванс, выращенные в строго контролируемых лабораторных условиях в режиме 14 ч света (интенсивность 6 тыс. лк; люминесцентные лампы Philips TL-D 36W/765 (Германия)) и 10 ч темноты при температуре $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $(35 \pm 2)\%$ при ежедневном поливе водопроводной водой и при засухе (растения не поливали с момента посадки). Предпосевную обработку семян ячменя проводили в дистиллированной воде ($\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$) или растворе АЛК с концентрацией 10 мг/л при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 20 ч.

Выращивание растений, определение всхожести семян и морфометрических показателей проростков. Исследование влияния засухи на зеленые проростки ячменя проводили с использованием культуры, выращенной в почве. Для этого семена ячменя предварительно проращивали на пластиковых асептически обработанных сетках при температуре $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 сут. Затем отобранные по размеру корней семена высаживали в сосуды, заполненные 300 г почвогрунта «Восторг» (ООО «Карио», Беларусь) с начальной массовой долей воды $(50 \pm 1)\%$, которая на 7-е сутки выращивания в условиях засухи снижалась в среднем на $(13 \pm 1)\%$. Варианты экспериментов были следующими:

- 1) контроль (растения, обработанные методом прайминга семян $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$, ежедневный полив водопроводной водой из расчета 25 мл воды на 300 г влажного грунта);
- 2) АЛК + H_2O (растения, обработанные методом прайминга семян АЛК, ежедневный полив водопроводной водой);
- 3) засуха (растения, обработанные методом прайминга семян $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$, без полива);
- 4) АЛК + засуха (растения, обработанные методом прайминга семян АЛК, без полива).

Всхожесть семян определяли визуально по наличию либо отсутствию первого листа на 1-е сутки после высадки семян в грунт. Длину зеленых проростков измеряли от зерновки через 7 сут после посадки в почву.

Определение сухой массы листьев растений ячменя, или массовой доли воды. Сухую массу листьев, или массовую долю воды, определяли согласно методу, описанному в работе [10]. Навески листьев растений ячменя массой 1 г помещали в стеклянные бюксы, масса которых предварительно была измерена на аналитических весах CE224-C (ООО «Сартогосм», Россия). Бюксы с навесками листьев помещали в вакуумный сушильный шкаф VacuCell 111 Standard (MMM Medcenter Einrichtungen, Германия) и высушивали образцы при температуре 100°C и давлении 0,05 атм в течение 2 ч. Через 1,0; 1,5 и 2,0 ч от начала сушки бюксы с навесками листьев взвешивали, чтобы зафиксировать сухую массу, которая в последних двух измерениях не менялась, что свидетельствовало о полной потере воды образцами. Массовую долю воды рассчитывали по разнице между начальной и конечной массой бюксов с образцами.

Определение общего содержания АФК. Общее содержание АФК определяли *in vitro* с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлорфлуоресцеина диацетата (ДХФ-ДА), который после деацетилирования окисляется до флуоресцентного соединения ДХФ такими АФК, как H_2O_2 , $OH^\bullet$, пероксирадикалы ($ROO^\bullet$) и др. [11].

Для получения экстракта навески листьев растений ячменя массой 0,2 г помещали в фарфоровую ступку и, приливая 1,6 мл 0,2 н. $HClO_4$, растирали до получения гомогената, который затем центрифугировали 10 мин при ускорении 17 000 g и температуре 4 °С, используя центрифугу с охлаждением Sigma 1-15K (Германия). Нейтрализацию кислотного значения pH до 7,5–7,6 осуществляли с помощью 4 моль/л КОН. Затем все пробы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 20 мин.

Определение общего количества АФК проводили, регистрируя флуоресценцию ДХФ ($\lambda_{возб} = 496$ нм, $\lambda_{набл} = 524$ нм). Среда измерения содержала 0,15 моль/л буфер трис-HCl (pH 7,5), нейтрализованный супернатант и 0,5 ммоль/л раствор ДХФ-ДА. Контролем служила проба, состоящая из 0,15 моль/л буфера трис-HCl (pH 7,5) и 0,5 ммоль/л раствора ДХФ-ДА [12]. Флуориметрический анализ проводили с использованием спектрофлуориметра Solar CM2203 (Беларусь). По количеству образовавшегося в ходе реакции ДХФ судили о накоплении АФК. Концентрацию ДХФ рассчитывали в относительных единицах в пересчете на сухую массу растений, контрольный вариант принимали за единицу.

Определение содержания H_2O_2 в листьях растений ячменя. Содержание пероксида водорода в экстрактах листьев растений ячменя определяли с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии H_2O_2 , катализируемая пероксидазой хрена [13].

Навески листьев растений ячменя (0,2 г) помещали в фарфоровую ступку и, приливая 1,6 мл 0,2 н. $HClO_4$, растирали до гомогената, который затем центрифугировали в течение 10 мин при ускорении 17 000 g и температуре 4 °С с использованием центрифуги Sigma 1-15K. Для нейтрализации кислотного значения pH супернатанта добавляли 4 моль/л КОН и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000 g и температуре 4 °С.

Определение содержания H_2O_2 проводили, регистрируя убыль флуоресценции скополетина ($\lambda_{возб} = 370$ нм, $\lambda_{набл} = 464$ нм) на спектрофлуориметре Solar CM2203. Среда измерения содержания H_2O_2 состояла из 0,1 моль/л буфера трис-HCl (pH 7,0), раствора пероксидазы хрена (200 ед. на 1 мл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Реакцию запускали добавлением нейтрализованного супернатанта. Первым контролем служила проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера трис-HCl и супернатанта, вторым контролем – проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера трис-HCl, раствора пероксидазы хрена (5 ед. на 10 мкл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Концентрацию пероксида водорода рассчитывали в относительных единицах в пересчете на сухую массу растений, контрольный вариант принимали за единицу [14].

Определение содержания хлорофиллов (Хл), феофитинов (Фео) и каротиноидов (Кар). Содержание Хл а и Хл b, Фео а и Фео b, а также Кар в листьях растений ячменя определяли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа (ВЭЖХ) Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия) по методике, разработанной в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно работам [15; 16].

Экстракцию пигментов из растений осуществляли с помощью 100 % ацетона. Разделение пигментов на колонке проводили с использованием раствора А (ацетонитрил 90,0 %, вода 9,9 %, триэтиламин 0,1 %) и раствора Б (этилацетат 100 %) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония) в диапазоне длин волн 200–800 нм. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при длине волны 440 нм (для Хл а и Хл b, а также Кар) и 410 нм (для Фео а и Фео b). Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы и коэффициенты, полученные для каждого пигмента с помощью стандартов. Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} \cdot F_{\text{пигм}} \cdot V}{V_{\text{аликв}} \cdot m},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при длине волны 440 нм (410 нм для Фео); $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета; V – объем супернатанта, мкл; $V_{\text{аликв}}$ – аликвота, мкл; m – масса навески, г.

В работе были использованы следующие реагенты: ацетон квалификации «х. ч.» ($\geq 99,8$ %) производства АО «Экос-1» (Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9$ %) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7$ %) производства компании Honeywell (Германия), триэтиламин ($\geq 99,5$ %) производства фирмы AppliChem (Германия), стандарты фотосинтетических пигментов производства компании Sigma-Aldrich (Германия).

Определение содержания белковых компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистем с помощью вестерн-блоттинга. Выделение из растений белков, их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг выполняли, как описано в работе [17]. Навеску листьев растений ячменя массой 0,1 г растирали в жидком азоте до порошка, переносили в пробирку типа «эппендорф», приливали среду выделения, содержащую 56 ммоль/л дитиотреитола, 56 ммоль/л Na_2CO_3 , 12 % сахарозы, 2 ммоль/л этилендиаминтетраацетата, 2 % додецилсульфата натрия, и тщательно перемешивали, используя вортекс Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries*, США). После этого пробы в течение 10 мин инкубировали при температуре 80 °C на термошейкере TS-100 (*Biosan*, Латвия). Затем снова перемешивали и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000 g на центрифуге Biofuge Pico (*Thermo Fisher Scientific*, США). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Брэдфорда [18] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции в целях выравнивания в них содержания белка.

Разделение белков выполняли с помощью денатурирующего гель-электрофореза на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN Tetra System (*Bio-Rad*, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей. После разделения белков осуществляли их электроперенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану фирмы *Bio-Rad* с порами размером 0,45 мкм. Для этого гель помещали на мембрану и укладывали на поверхность системы турбоблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*) между слоями хроматографической бумаги, предварительно смоченной в анодном буфере.

Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, проводили с помощью поликлональных антител фирмы *Agrisera* (Швеция) к белку D1 реакционного центра (РЦ) фотосистемы II (ФС II) (PsbA), а также к белкам светособирающего комплекса (ССК) фотосистемы I (ФС I) (Lhca2) и ФС II (Lhcb2 и Lhcb4). Количество белков рассчитывали денситометрически в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу *TotalLab* (версия 2.01).

Измерение индукции флуоресценции Хл и редокс-состояния первичного донора ФС I (P700). Фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя регистрировали с помощью измерительного комплекса Dual-PAM-100 (*Heinz Walz*, Германия) с модулем регистрации флуоресценции ФС II и двухволновым (830 и 875 нм) модулем регистрации сигнала P700 [19]. Параметры активности ФС I и ФС II листьев растений ячменя рассчитывали согласно работе [20]. Темновую адаптацию листьев осуществляли в течение 15 мин. Интенсивность измерительного света составляла 0,048 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с ($\lambda_{\text{возб}} = 460 \text{ нм}$), интенсивность актиничного (фотосинтетически активного) света – 131 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с, интенсивность насыщающих вспышек – 10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с. В качестве актиничного света использовали излучение с длиной волны 635 нм. Регистрировали фоновую флуоресценцию Хл после темновой адаптации (F_0) и при включении актиничного света (F_0'), максимальный уровень флуоресценции (F_m), а также изменение интенсивности флуоресценции с уровня F до уровня F_m' после насыщающей вспышки на фоне действия актиничного света. Рассчитывали вариабельную флуоресценцию ($F_v = F_m - F_0$), потенциальный квантовый выход фотохимии ФС II ($\frac{F_v}{F_m}$), эффективный квантовый выход фотохимии ФС II ($Y(\text{II}) = \frac{F_m - F}{F_m'}$), коэффициент фотохимического ($qP = \frac{F_m' - F}{F_m' - F_0}$) и не-

фотохимического ($qN = \frac{F_m - F_m'}{F_m - F_0}$) тушения флуоресценции Хл, а также скорость транспорта электронов ($\text{ETR}(\text{I}) = Y(\text{I}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0,5$, $\text{ETR}(\text{II}) = Y(\text{II}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0,5$, где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации (131 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с); c – часть поглощенного света (84 %); 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на одну фотосистему [21; 22]). Параметр NPQ, который является мерой нефотохимического тушения флуоресценции, отражающей подавление ФС II как защитный механизм от избыточной интенсивности света, рассчитывали по формуле $\text{NPQ} = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$ [23].

Для оценки редокс-состояния РЦ ФС I регистрировали сигнал P700 (P), который представляет собой разницу между интенсивностями модулированного измерительного света с длинами волн 875 и 830 нм ($\Delta(I_{875} - I_{830})$), достигающего фотодетектора, и может варьировать от минимального (P700 полностью восстановлен) до максимального (P700 полностью окислен) уровня. Значение P_m (P700 полностью окислен) было определено с помощью насыщающей вспышки (10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 за 1 с) после предварительного освещения листа дальнекрасным светом (730 нм), поглощаемым ФС I. Значение P_m' определяли аналогично значению P_m , но с использованием в качестве фонового актиничного света (635 нм)

вместо дальнекрасного. Эффективный квантовый выход фотохимии ФС I ($Y(I) = \frac{P'_m - P}{P_m}$) определяется долей от общего количества P700, который в данном состоянии был восстановлен независимо от акцепторной стороны. Значение $Y(ND) = \frac{P}{P_m}$ представляет собой долю от общего количества P700, окисленного в данном состоянии. Значение $Y(NA) = \frac{P_m - P'_m}{P_m}$ представляет собой долю от общего количества P700, который не может быть окислен насыщающей вспышкой в данном состоянии из-за отсутствия окисленных акцепторов [22].

Световые кривые для ETR(I) и ETR(II) регистрировали при интенсивностях актиничного света 11; 18; 27; 58; 100; 131; 221; 344; 536 и 830 мкмоль квантов на 1 м² за 1 с (длина интервала между насыщающими вспышками составляла 30 с).

Статистическая обработка полученных результатов. Для статистической обработки экспериментальных данных и регистрации полученных результатов использовали программы *Excel 2019 (Microsoft)* и *SigmaPlot* (версия 12.5) (*Systat Software*), а также статистические методы, принятые в области биологических исследований¹. Основными статистическими характеристиками служили среднее значение ($\bar{x}$), среднеквадратическое отклонение (s), ошибка средней величины (S_x). На графиках и в таблицах приведены средние значения и ошибки средней величины ($\bar{x} \pm S_x$). Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и данного числа степеней свободы (df). Все описанные в работе эксперименты проводили в 3–7-кратной биологической повторности на 7-е сутки после высадки пророщенных семян в почву.

Результаты и их обсуждение

Влияние прайминга семян АЛК на морфофизиологические показатели проростков ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. В рамках проведенных опытов было проанализировано воздействие почвенной засухи на всхожесть семян, морфометрические показатели растений и содержание воды в проростках ячменя в случае предпосевной обработки семян АЛК в концентрации 10 мг/л.

Так, в ходе исследования была выявлена высокая (более 95 %) всхожесть семян сорта Аванс независимо от условий выращивания и праймирования (табл. 1). Достоверных различий между всхожестью семян в экспериментальных и контрольных вариантах не зафиксировано.

Таблица 1

Всхожесть семян ячменя сорта Аванс,
обработанных АЛК методом прайминга

Table 1

Germination of barley seeds of the Avans variety treated
with 5-aminolevulinic acid (ALA) using the priming method

Вариант	Общее количество семян	Количество взошедших семян	Всхожесть, %
Контроль	130	126	96,9 ± 1,4
АЛК + H ₂ O	130	126	96,9 ± 1,4
Засуха	130	124	95,4 ± 1,9
АЛК + засуха	130	124	95,4 ± 1,9

Изучение морфометрических показателей первого листа растений ячменя, определяемых по длине проростков от зерновки, показало, что дефицит воды приводит к достоверному уменьшению длины проростков (в среднем на 13 %) у необработанных и обработанных АЛК методом прайминга семян растений ячменя сорта Аванс по сравнению с длиной проростков у контрольных растений (табл. 2).

Анализ массовой доли воды в проростках ячменя показал незначительное, но достоверное снижение этого показателя в условиях засухи (в среднем на 2 % по сравнению с растениями, выращенными при нормальном поливе (см. табл. 2)).

¹Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика : учеб. пособие для биол. фак. ун-тов. 3-е изд., испр. Минск : Выш. шк., 1973. С. 28–50.

Таблица 2

Изменение длины 7-дневных проростков ячменя сорта Аванс, а также массовой доли воды в них под влиянием почвенной засухи

Table 2

Changes in the length of 7-day-old barley seedlings of the Avans variety, as well as the mass fraction of water in them under the influence of soil drought

Вариант	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %
Контроль	15,1 ± 0,2	91,9 ± 0,2
АЛК + H ₂ O	15,3 ± 0,2	91,9 ± 0,1
Засуха	13,1 ± 0,2*	90,0 ± 0,1*
АЛК + засуха	13,3 ± 0,2*	90,1 ± 0,2*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Отметим, что прайминг семян АЛК не оказывает существенного влияния на морфометрические показатели растений ячменя сорта Аванс как при почвенной засухе, так и при нормальном водообеспечении.

Влияние прайминга семян АЛК на накопление АФК в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. Для оценки степени стрессового воздействия на растения ячменя почвенной засухи было проанализировано накопление в листьях опытных и контрольных вариантов АФК (их общее количество и содержание H₂O₂ в отдельности).

Установлено, что предпосевная обработка семян ячменя сорта Аванс раствором АЛК с концентрацией 10 мг/л приводит к снижению общего уровня АФК на 13 % по сравнению с контролем для варианта «АЛК + H₂O» и на 19 % по сравнению с вариантом «засуха» для варианта «АЛК + засуха» (рис. 1, а), это указывает на снижение степени окислительного стресса в растительной клетке и способствует повышению устойчивости растений ячменя к засухе, чего не наблюдалось при обработке растений АЛК методом опрыскивания [8].

При анализе данных накопления H₂O₂ в растениях ячменя установлено отсутствие изменения его количества на фоне увеличения общего уровня АФК при действии почвенной засухи (рис. 1, б), что, вероятно, указывает на инициацию окислительного стресса по пути образования синглетного кислорода, а не супероксидного радикала, являющегося предшественником H₂O₂. Прайминг семян ячменя АЛК также не влиял на накопление H₂O₂ ни при нормальном поливе, ни при засухе.

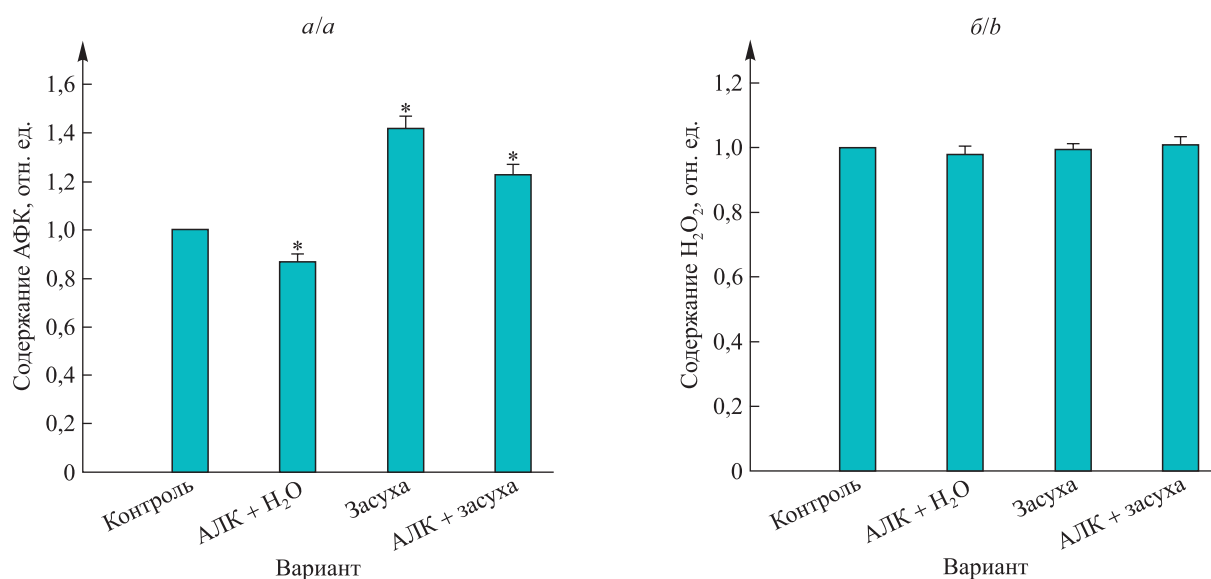


Рис. 1. Влияние предпосевной обработки семян АЛК на накопление в листьях растений ячменя сорта Аванс АФК (а) и H₂O₂ (б). Знаком * отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. The influence of pre-sowing treatment of seeds with ALA on the accumulation of reactive oxygen species (a) and H₂O₂ (b) in leaves of barley plants of the Avans variety. The sign * indicates significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$)

Дальнейшие исследования были направлены на выявление особенностей ответа хлоропластных компонентов при действии почвенной засухи на растения ячменя, обработанные АЛК методом прайминга семян.

Влияние прайминга семян АЛК на содержание Хл, Фео и Кар в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. С помощью ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов листьев растений ячменя сорта Аванс в условиях почвенной засухи. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить во всех исследуемых вариантах наличие Кар (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина), а также Хл *a* и Хл *b*, Фео *a* и следовые количества Фео *b* [15].

Ранее нами было показано, что обработка растений ячменя сорта Аванс раствором АЛК с концентрацией 10 мг/л методом опрыскивания в условиях засухи отрицательно влияла на накопление пигментов в растительных клетках и приводила к снижению содержания хлорофилльных пигментов по сравнению с их содержанием в необработанных раствором АЛК растениях [8]. По этой причине в ходе данного исследования изучалось изменение содержания Хл *a* и Хл *b*, а также Кар в 7-дневных проростках ячменя, выращенных в условиях дефицита влаги в почве, после прайминга семян АЛК.

Установлено, что предпосевная обработка семян ячменя сорта Аванс раствором АЛК с концентрацией 10 мг/л не приводила к значительным изменениям общего содержания Хл (Хл *a* + Хл *b*) относительно контроля (табл. 3). При этом стоит отметить, что при обработке растений ячменя раствором АЛК методом прайминга семян наблюдается незначительное (на 3 %) снижение соотношения Хл *a* : Хл *b* (см. табл. 3), это может быть следствием изменения соотношения пигментов в светособирающей антенне фотосистемы.

Таблица 3

Изменение содержания Хл, Фео и Кар в листьях растений ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК методом прайминга семян, в условиях почвенной засухи

Table 3

Changes in the content of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in the leaves of barley plants of the Avans variety treated with ALA seed priming under soil drought conditions

Вариант	Содержание, мкг/г сухой массы						
	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Фео <i>a</i>	β -Каротин
Контроль	722 $\pm$ 22	302 $\pm$ 13	19 628 $\pm$ 80	19 729 $\pm$ 769	8333 $\pm$ 364	121 $\pm$ 7	2649 $\pm$ 106
АЛК + H ₂ O	667 $\pm$ 16*	288 $\pm$ 7	1856 $\pm$ 83	18 721 $\pm$ 813	7882 $\pm$ 362	113 $\pm$ 5	2488 $\pm$ 117
Засуха	622 $\pm$ 24*	222 $\pm$ 7*	1860 $\pm$ 33	18 366 $\pm$ 316	7899 $\pm$ 123	120 $\pm$ 8	2431 $\pm$ 49*
АЛК + засуха	629 $\pm$ 25*	234 $\pm$ 9*	1872 $\pm$ 69	18 519 $\pm$ 687	7934 $\pm$ 301	120 $\pm$ 6	2454 $\pm$ 101

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Также было проанализировано влияние недостатка воды в почве на содержание Кар (см. табл. 3). Установлено, что растения ячменя сорта Аванс, выращенные в условиях почвенной засухи, отличаются от контроля пониженным содержанием данных соединений в среднем на 8 и 10 % при наличии и отсутствии предпосевной обработки семян АЛК соответственно. При этом наблюдается уменьшение количества ксантофилов неоксантина и виолаксантина. Достоверное снижение содержания β -каротина зарегистрировано только в варианте «засуха». Содержание Фео *a* в опыте достоверно не изменялось.

В целом приведенные выше данные указывают на то, что в отличие от метода опрыскивания листьев растений [8] прайминг семян АЛК не оказывает негативного влияния на содержание фотосинтетических пигментов Хл *a* и Хл *b*, а также β -каротина в растениях ячменя сорта Аванс при действии засухи: достоверных различий в их содержании между контрольными и опытными растениями не выявлено.

Влияние прайминга семян АЛК на содержание структурных белков фотосистем в листьях растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. Для определения количества основных структурных белков фотосистем в листьях проростков ячменя, обработанных АЛК методом прайминга семян, в условиях засухи проводили вестерн-блоттинг с использованием антител к белкам PsbA (белок D1 РЦ ФС II), Lhcb2 и Lhcb4 (белки антенны ФС II), а также Lhca2 (белок антенны ФС I).

Анализ содержания структурных белков ФС II (PsbA, Lhcb2 и Lhcb4) и ФС I (Lhca2) в листьях растений ячменя сорта Аванс как при наличии предпосевной обработки семян АЛК, так и без нее показал, что синтез белков внешней антенны ФС II (Lhcb2 и Lhcb4) во всех вариантах оставался в пределах контроля (рис. 2). При этом отмечено некоторое снижение содержания белка РЦ ФС II (PsbA) в растениях, выращенных в условиях засухи (на 14 % в варианте «засуха» и на 7 % в варианте «АЛК + засуха»),

по сравнению с контролем, что может указывать на стабилизирующее действие прайминга семян АЛК в регуляции работы ФСА растений при недостатке влаги в почве. В то же время отмечено увеличение количества белка антенны ФС I (Lhca2) в растениях ячменя, обработанных АЛК методом прайминга семян (как при нормальном поливе, так и при засухе), в среднем на 15 % по сравнению с контрольным вариантом. Повышение содержания данного белка ССК ФС I на фоне отсутствия существенного влияния АЛК на содержание белков ФС II может способствовать перераспределению энергии поглощенных квантов света в пользу ФС I, что является эффективным защитным механизмом, снижающим фотоповреждение ФС II в условиях засухи.

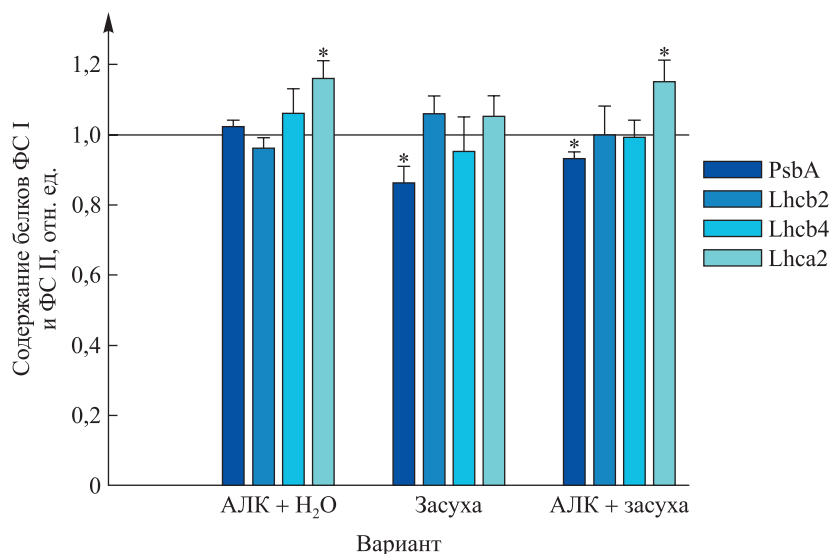


Рис. 2. Содержание белков пигмент-белковых комплексов ФС I и ФС II в листьях растений ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК методом прайминга семян, в условиях почвенной засухи.

Контроль принят за единицу и представлен в виде базовой линии.

Знаком * отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. Content of proteins of pigment-protein complexes of photosystem I and photosystem II in leaves of barley plants of the Avans variety treated with ALA seed priming under soil drought conditions.

Control is taken as one and represented by the baseline.

The sign * indicates significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$)

Влияние прайминга семян АЛК на фотохимическую активность фотосистем листьев растений ячменя, выращенных в условиях почвенной засухи. Установлено, что прайминг семян АЛК при действии засухи приводит к достоверному снижению уровня фоновой флуоресценции Хл (F_0) и максимального уровня флуоресценции (F_m) адаптированных к темноте листьев растений ячменя в среднем на 20 % по сравнению с контролем (табл. 4). Такая же тенденция к снижению (в среднем на 11 %) зарегистрирована для уровня сигнала P700 (параметры P_m и P'_m), что, вероятно, связано с адаптивным изменением структуры хлорофильных пигментов в фотосинтетических мембранах в ответ на почвенную засуху для предотвращения повреждения ФСА.

Анализ параметров, характеризующих фотохимическую активность фотосистем, – потенциального квантового выхода фотохимии ФС II ($\frac{F_v}{F_m}$), эффективного квантового выхода фотохимии ФС II ($Y(II)$)

и ФС I ($Y(I)$), значений $Y(ND)$, $Y(NA)$, коэффициента фотохимического тушения флуоресценции Хл (qP), а также скорости транспорта электронов (ETR(I) и ETR(II)) – не выявил достоверного влияния на них засухи при прайминге семян АЛК, что указывает на отсутствие нарушения работы ССК и электрон-транспортной цепи хлоропластов в условиях стресса (см. табл. 4). При этом важно отметить, что в варианте «АЛК + H₂O» зарегистрировано достоверное увеличение показателей $Y(I)$ и ETR(I), это согласуется с данными вестерн-блоттинга (см. рис. 2), демонстрирующими увеличение при прайминге семян АЛК количества белка Lhca2 ССК ФС I. В варианте «засуха» показатели $Y(I)$ и ETR(I), наоборот, снижались по отношению к контролю, что указывает на подавление в условиях стресса фотохимической активности ФС I. Однако при использовании АЛК (вариант «АЛК + засуха») негативное влияние засухи нивелировалось: показатели $Y(I)$ и ETR(I) соответствовали контролю.

Метод индукции флуоресценции Хл, кроме фотохимической активности фотосистем, позволяет также оценить вклад в тушение флуоресценции нефотохимических процессов. Показатели qN и NPQ являются мерой нефотохимического тушения флуоресценции Хл, отражая его общую и регулируемую составляющие соответственно. Согласно полученным данным (см. табл. 4) для всех вариантов экспериментов общая составляющая нефотохимического тушения флуоресценции Хл (qN) практически полностью определяется его регулируемой составляющей (NPQ), что указывает на отсутствие либо крайне малый вклад нерегулируемой диссипации энергии в фотосинтетической мембране, которая обычно является следствием деструктивных процессов [21; 23]. Регулируемая диссипация энергии обусловлена в основном работой ксантофилевого цикла [24]. При этом в условиях засухи достоверно регистрируется уменьшение значений qN и NPQ на 12 и 19 % относительно контроля соответственно. Снижение параметров нефотохимического тушения флуоресценции Хл, в большей степени его регулируемой составляющей (NPQ), при засухе может быть обусловлено уменьшением содержания в листьях растений ячменя ксантофилевого Кар – неоксантина и виолаксантина (см. табл. 3). При обработке семян АЛК в условиях засухи снижение параметров qN и NPQ было несколько меньшим, чем без использования АЛК, а именно 8 и 11 % по отношению к контролю соответственно, что также коррелирует с данными об уменьшении содержания ксантофилевого Кар, которое для варианта «АЛК + засуха» было менее значительным, чем для варианта «засуха».

Таблица 4

Параметры индукции флуоресценции Хл
и P700 в листьях растений ячменя, обработанных АЛК методом прайминга семян,
в нормальных условиях (контроль) и при засухе

Table 4

Parameters of fluorescence induction of chlorophyll and P700
in leaves of barley plants treated with ALA seed priming
under normal conditions (control) and under drought

Параметры	Вариант			
	Контроль	АЛК + H ₂ O	Засуха	АЛК + засуха
F_0	0,81 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,64 ± 0,01*	0,69 ± 0,03*
F_m	4,18 ± 0,11	4,24 ± 0,12	3,28 ± 0,08*	3,49 ± 0,11*
$\frac{F_v}{F_m}$	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,80 ± 0,01
$Y(II)$	0,68 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,69 ± 0,01
ETR(II)	37,43 ± 0,08	37,49 ± 0,12	36,94 ± 0,32	37,74 ± 0,14
$Y(NO)$	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01
$Y(NPQ)$	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
NPQ	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,21 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*
qN	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01*	0,22 ± 0,01
qP	0,89 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,90 ± 0,01
$1 - qP$	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
P_m	1,58 ± 0,08	1,49 ± 0,08	1,40 ± 0,07*	1,38 ± 0,06*
P'_m	1,41 ± 0,04	1,36 ± 0,03	1,25 ± 0,03*	1,25 ± 0,02*
$Y(I)$	0,85 ± 0,01	0,88 ± 0,01*	0,82 ± 0,01*	0,85 ± 0,01
ETR(I)	46,85 ± 0,20	48,20 ± 0,17*	45,33 ± 0,27*	46,92 ± 0,17
$Y(ND)$	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01*	0,05 ± 0,01
$Y(NA)$	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01

Примечания: 1. Параметры $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$ – квантовые выходы регулируемой и нерегулируемой диссипации энергии в ФС II соответственно. 2. Знаком * отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Приведенные данные указывают на то, что прайминг семян АЛК способствует поддержанию стабильного функционирования ФСА растений ячменя в условиях засухи, обеспечивая устойчивость фотохимической активности фотосистем и при этом снижая подавление регулируемой составляющей нефотохимического тушения флуоресценции Хл как важного защитного механизма при стрессе.

Заключение

Таким образом, прайминг семян АЛК приводит к уменьшению в листьях растений ячменя общего содержания АФК (на 13 % по сравнению с контролем для варианта «АЛК + H₂O» и на 19 % по сравнению с вариантом «засуха» для варианта «АЛК + засуха»), что указывает на снижение степени окислительного стресса в растительной клетке и способствует повышению устойчивости растений ячменя сорта Аванс к засухе.

Показано, что прайминг семян АЛК, в отличие от метода опрыскивания листьев растений, не оказывает негативного влияния на содержание в листьях растений ячменя сорта Аванс фотосинтетических пигментов Хл *a* и Хл *b*, а также β-каротина при действии засухи. При этом снижение содержания ксантофиловых Кар (неоксантина и виолаксантина), зафиксированное в условиях засухи, было менее значительным при использовании АЛК, а снижения содержания β-каротина не наблюдалось, что свидетельствует о стабилизирующем действии АЛК на пигментный аппарат.

Установлено, что прайминг семян АЛК приводит к увеличению количества белка Lhca2 ССК ФС I на фоне отсутствия существенного влияния АЛК на содержание белков ФС II как при засухе, так и при нормальном поливе. Данное обстоятельство может способствовать перераспределению энергии поглощенных квантов света в пользу ФС I и является эффективным защитным механизмом, снижающим фотоповреждение ФС II при окислительном стрессе.

Отмечено, что прайминг семян АЛК способствует поддержанию стабильного функционирования ФСА растений ячменя в условиях засухи, обеспечивая устойчивость фотохимической активности фотосистем и при этом снижая подавление регулируемой составляющей нефотохимического тушения флуоресценции Хл как важного защитного механизма при стрессе.

Библиографические ссылки

1. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
2. Wang X, Gao Y, Wang Q, Chen M, Ye X, Li D, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
3. Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80:3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
4. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.
6. Chan Z, Shi H. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(3):e991577. DOI: 10.4161/15592324.2014.991577.
7. Яронская ЕБ, Балута ТВ, Коляго ВМ, Шалыго НВ. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя и содержание пигментов. В: Зорина ТЕ, редактор. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Шестой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков; 6–8 октября 2004 г.; Минск, Беларусь. Часть 1*. Минск: Редакционно-издательский центр Академии управления при Президенте Республики Беларусь; 2004. с. 117–119.
8. Kuryanchyk TG, Kozel NV. Photosynthetic apparatus of barley plants treated with 5-aminolevulinic acid: mechanisms of adaptation to drought. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:26–38. Russian. DOI: 10.33581/2957-5060-2022-3-26-38.
9. Прищепчик ЮВ, Аверина НГ. Влияние биопрайминга семян льна 5-аминолевулиновой кислотой на энергию прорастания и всхожесть. В: Волотовский ИД, редактор. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Двенадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков; 28–30 июня 2016 г.; Минск, Беларусь. Часть 2*. Минск: Издательский центр БГУ; 2016. с. 76–79.
10. Вязов ЕВ. *Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата и защитной системы растений огурца к светодиадному излучению различного спектрального состава* [диссертация]. Минск: [б. и.]; 2017. 157 с.
11. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.
12. Kozel NV, Shalygo NV. Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal. *Fiziologiya rastenii*. 2009;56(3):351–358. EDN: KAVKHB.
13. Козел НВ. *Фотоокислительные процессы, индуцированные в растениях ячменя и табака сенсбилизаторами ксантеиновой природы* [диссертация]. Минск: [б. и.]; 2009. 146 с.

14. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*. 1997;202(2):133–141. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00244-x.
15. Kaliaha TG, Kozel NV. The effect of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:46–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
16. Azarin K, Usatov A, Makarenko M, Kozel N, Kovalevich A, Dremuk I, et al. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*. 2020;103(4–5):373–389. DOI: 10.1007/s11103-020-00997-x.
17. Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1997;1320(3):297–309. DOI: 10.1016/S0005-2728(97)00033-9.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
19. *Dual-PAM-100 measuring system for simultaneous assessment of P700 and chlorophyll fluorescence. Instrument description and instructions for users*. 2nd edition. Effeltrich: Heinz Walz; 2009. 87 p.
20. Makarenko MS, Kozel NV, Usatov AV, Gorbachenko OF, Averina NG. A state of PS I and PS II photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant. *Online Journal of Biological Sciences*. 2016;16(4):193–196. DOI: 10.3844/ojbsci.2016.193.198.
21. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*. 2004;79(2):209–218. DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d.
22. Klughammer C, Schreiber U. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta*. 1994;192(2):261–268. DOI: 10.1007/BF01089043.
23. Busch F, Hüner NPA, Ensminger I. Biochemical constraints limit the potential of the photochemical reflectance index as a predictor of effective quantum efficiency of photosynthesis during the winter spring transition in jack pine seedlings. *Functional Plant Biology*. 2009;36(11):1016–1026. DOI: 10.1071/FP08043.
24. Latowski D, Kuczyńska P, Strzałka K. Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report*. 2011;16(2):78–90. DOI: 10.1179/174329211X13020951739938.

Получена 03.06.2024 / исправлена 25.07.2024 / принята 02.09.2024.
Received 03.06.2024 / revised 25.07.2024 / accepted 02.09.2024.