

УДК 581.13+581.112.4

Е. С. ЗУБЕЙ

**ПАРАМЕТРЫ ВОДООБМЕНА, ФОТОСИНТЕЗА И РЕДОКС-СТАТУСА КЛЕТОК
ЛИСТЬЕВ БАЗИЛИКА ДУШИСТОГО (*OCIMUM BASILICUM* L.)
В УСЛОВИЯХ ВОДНОГО ДЕФИЦИТА**

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: katya.zubej@yandex.by*

Приведены результаты исследования морфофизиологических, биохимических и биофизических параметров фенотипов растений базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) при пониженном водном потенциале субстрата. Показано, что наибольшим адаптивным потенциалом обладают растения базилика, выращенные при –16 кПа. Они характеризовались ксероморфной структурой мезофилла листа, повышенным периодом сохранения тургора ткани, повышенной скоростью ассимиляции CO₂ и коэффициентом эффективности фотосинтеза по O₂, максимальной эффективностью переноса электронов в ФС, минимальным количеством фенольных соединений и высокой антирадикальной активностью.

Ключевые слова: водообмен, водный стресс, фотосинтез, дыхание, фенольные соединения, антирадикальная активность, *Ocimum basilicum* L.

E. S. ZUBEI

**THE PARAMETERS OF WATER EXCHANGE PARAMETERS, PHOTOSYNTHESIS
AND REDOX STATUS OF CELLS OF LEAVES BASIL (*OCIMUM BASILICUM* L.) UNDER WATER DEFICIT**

The V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, Minsk, Belarus, e-mail: katya.zubej@yandex.by

The results of complex morpho-physiological, biochemical and biophysical studies of phenotypes of basil plant (*Ocimum basilicum* L.) under reduced water potential of the substrate. It is shown that most adaptive potential basil plants had grown at –16 kPa. They are characterized by xeromorphic leaf mesophyll structure, increased tissue turgor retention period, an increased rate of CO₂ assimilation and the coefficient of efficiency of photosynthesis by O₂, the maximum efficiency of electron transfer in the FS, a minimum amount of phenolic compounds and high anti-radical activity.

Keywords: water exchange, water stress, photosynthesis, respiration, phenolic compounds, antiradical activity, *Ocimum basilicum* L.

Введение. Глобально изменяющийся климат, учащение периодов засухи повышают актуальность получения устойчивых к водному стрессу фенотипов растений. Необходимым элементом в разработке методов повышения стрессоустойчивости растений является комплексная оценка их ключевых физиологических процессов: водообмена, фотосинтеза, дыхания и окислительного статуса клеток в их взаимосвязи.

Одним из приемов повышения засухоустойчивости является выращивание растений на субстратах с водоадсорбирующими гидрогелями [1]. Растения, принадлежащие к разным экоморфам, толерантны к различной степени водного дефицита. Так как значительная часть сельскохозяйственных растений умеренных широт относится к мезофитам, в качестве объекта нами исследован представитель этой группы.

Цель работы – установить соотношение параметров водного обмена, интенсивности процессов фотосинтеза, дыхания и редокс-статуса клеток листьев растений базилика, сформировавшихся при пониженном водном потенциале корнеобитаемой среды и охарактеризовать потенциально стрессоустойчивый фенотип.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись растения базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) сорта Генова, выращенные при различной величине водного потенциала субстрата.

Семена опытных растений высевали на субстратах, различающихся величиной водного потенциала (ВП): –10, –16, –25, –35 кПа. Влажность субстратов в вариантах была одинаковой, пониженный ВП создавали путем добавления в почвогрунт 3, 6, 9, 12 %-ного водного раствора слабо сшитого сильно набухающего полиакриламидного гидрогеля. Контролем служили растения, выращенные в почвогрунте без гидрогеля с величиной ВП около –4 кПа. Полив осуществляли на весах с целью поддержания постоянного ВП. Величину ВП измеряли при помощи почвенного влагомера (тензиометра) DM-8 производства компании Nieuwkoop Aalsmeer (Нидерланды).

Анализ параметров водного обмена растений осуществляли по методике, разработанной в лаборатории водного обмена растений ИЭБ НАНБ [2, 3]. Высечки листа под небольшим давлением насыщали водой для достижения максимального тургора ткани и заполнения межклетников водой. На электронно-измерительной установке регистрировали кривые процессов дегидратации (изменения массы и толщины) ассимиляционной ткани. Данные обрабатывали с помощью специальных программ, разработанных для данной методики, а также программы Excel. Вычисляли ряд морфофизиологических показателей листьев растений: толщину листовой пластинки при максимальном тургоре, объем межклетников, количество воды в ткани мезофилла, связанной и не связанной с изменениями тургора, эластичность ткани листа, показатель сухого вещества на единицу площади, время сохранения клетками мезофилла максимального тургора.

Поглощение CO_2 листьями растений фиксировали с применением инфракрасного газоанализатора TESTO 330-1LL. Листья помещали в камеру с фиксированным объемом и с помощью датчика регистрировали изменения концентрации CO_2 в течение 70–80 мин с интервалом 5 мин. Затем рассчитывали скорость восстановления CO_2 фотосинтезирующими листьями, выраженную в мкмоль поглощаемого за минуту CO_2 относительно единицы площади или сухой массы листа.

Исследование скорости дыхания (по поглощению O_2 тканью листа в темноте), скорости фотосинтеза (по выделению O_2 тканью листа на свету) и коэффициента эффективности фотосинтеза KphA проводили при помощи прибора PlantVital 5030, данные выражали в $\text{мгO}_2/\text{дм}^2\cdot\text{ч}$.

Флуоресценцию хлорофилла исследовали с помощью флуориметра CM 2203. Записывали спектры излучения в диапазоне длин волн от 600 до 780 нм, при возбуждающем свете 450 нм. Вычисляли коэффициенты флуоресценции ω и Rfd.

Параметр ω вычисляли по формуле

$$\omega = F_{740}/F_{685},$$

где F_{740} и F_{685} – значения интенсивности флуоресценции хлорофилла в области 740 и 685 нм соответственно [4].

Параметр Rfd, или коэффициент спада флуоресценции, вычисляли по формуле

$$\text{Rfd} = (F_m - F_s)/F_s,$$

где F_m и F_s – соответственно максимальный и стационарный уровни флуоресценции, получаемые из фотоиндукционных кривых [5].

Стационарный уровень флуоресценции получали из исходных кривых флуоресценции сегментов листьев опытных растений. Для получения максимального уровня флуоресценции сегменты листьев помещали в 0,01 %-ный раствор диурона (дихлорофенилдиметилмочевины) на 50 мин, затем повторно записывали кривые флуоресценции.

Общее содержание хлорофиллов на единицу площади листа определяли с помощью хлорофиллометра DUALEX (Франция).

Содержание суммы фенольных соединений проводили по методу Фолина–Чокальтеу [6, 7]. Экстракцию производили в 80 %-ном этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре, затем 30 мин на водяной бане при 80 °С.

Антиоксидантную активность определяли по реакции с 0,002 %-ным раствором DPPH (дифенил-2-пикрил-гидразил) [8, 9]. Процент ингибирования Р активности DPPH рассчитывали по формуле

$$P = (D_k - D_o) / D_k \cdot 100,$$

где D_k – оптическая плотность контроля (80 %-ный этанол + раствор DPPH), D_o – оптическая плотность образца.

Измерения проводили в 3–6-кратной повторности, данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего. Различия между показателями оценивали при уровне значимости (p) не более 0,05. Корреляционный анализ ряда параметров проводили при помощи статистического пакета Excel. Вычисляли коэффициент корреляции (R), коэффициент детерминации (R^2), уравнение линейной регрессии.

Результаты и их обсуждение. Растения базилика, выращенные при ВП субстрата –10 кПа, характеризовались более мощным ростом, чем контрольные. При –16 кПа растения по габитусу приближались к контрольным, при ВП –25 и –35 кПа у них наблюдалось заметное отставание по темпам роста. Полученные фенотипы характеризовались рядом особенностей морфоструктуры и водного обмена мезофилла листьев (табл. 1). С понижением ВП субстрата толщина листовой пластинки несколько возрастала, при этом увеличивались объем межклетников в ткани мезофилла относительно контроля (на 43–73 %), а также количество воды в ткани мезофилла, не связанной с изменениями тургора, снижалась эластичность ткани листа и возрастал показатель сухого вещества на единицу площади, увеличивалось время сохранения максимального тургора мезофилла. Эти признаки указывают на повышение ксероморфности растений [10]. Наиболее ксероморфной структурой мезофилла листьев обладали фенотипы, выращенные при ВП –16 и –25 кПа.

Т а б л и ц а 1. Параметры морфоструктуры и водообмена ткани мезофилла, содержание фотосинтетических пигментов и скорость ассимиляции CO_2 листьев растений базилика, выращенных при разном водном потенциале субстрата

Параметр		Водный потенциал субстрата, кПа				
		−4 (контроль)	−10	−16	−25	−35
Толщина листа при максимальном тургоре, мкм		172 ± 12	178 ± 13	181 ± 18	174 ± 14	163 ± 12
Влажность ткани листа при максимальном тургоре, мг/мм ³		0,89 ± 0,07	0,86 ± 0,06	0,84 ± 0,06	0,81 ± 0,06	0,87 ± 0,06
Объем воды, связанный с изменением тургора (% от влажности ткани при максимальном тургоре), мг/мм ³		0,76 ± 0,06 (88)	0,73 ± 0,06 (81)	0,66 ± 0,05 (78)	0,66 ± 0,05 (82)	0,75 ± 0,06 (86)
Объем воды, не связанный с изменением тургора (% от влажности ткани при максимальном тургоре), мг/мм ³		0,13 ± 0,01 (12)	0,13 ± 0,01 (15)	0,18 ± 0,01 (22)	0,15 ± 0,01 (18)	0,12 ± 0,01 (14)
Количество сухого вещества, мкг/мм ²		20 ± 0,01	23 ± 0,32	23 ± 0,32	23 ± 0,32	20 ± 0,01
Эластичность ткани листа, %		73,6 ± 4,6	62,1 ± 3,9	59,1 ± 3,4	61,7 ± 3,8	68,1 ± 4,5
Объем межклетников, % от объема ткани		10,5 ± 1,2	15,0 ± 1,1	16,4 ± 1,2	16,7 ± 2,1	18,2 ± 1,1
Время сохранения максимального тургора, мин		20,0 ± 0,01	24,0 ± 0,60	26,0 ± 0,01	32,0 ± 1,01	25,0 ± 0,01
Содержание хлорофиллов, мг/дм ²		2,73 ± 0,052	2,89 ± 0,059	3,15 ± 0,038	3,34 ± 0,096	3,25 ± 0,037
Скорость ассимиляции CO ₂	×10 ^{−6} ммоль/мин ^{−1} ·см ^{−2}	9,0 ± 0,47	14,8 ± 0,43	17,4 ± 0,12	25,6 ± 0,86	19,8 ± 0,18
	×10 ^{−6} ммоль/мин ^{−1} ·мг _{c.в.} ^{−1}	3,9 ± 0,01	7,8 ± 0,01	8,6 ± 0,02	9,8 ± 0,04	8,7 ± 0,02

Отмечено, что у растений базилика, выращенных при пониженном ВП субстрата, было увеличено суммарное содержание хлорофиллов a и b на единицу площади листа. Максимальным содержание фотосинтетических пигментов ($3,34 \pm 0,096$ мг/дм²) было у растений, выращенных при ВП –25 кПа (на 22 % выше контроля).

В настоящее время известно, что регуляция трансклеточных потоков воды через мембраны растительных клеток осуществляется белками аквапоринами [11]. Время сохранения клетками мезофилла максимального тургора – это начальный период дегидратации ткани, в течение которого потоки воды из клеток и внутрь клеток апопласта равны и объем ткани стабилен. Продол-

жительность этого периода зависит от активности аквапоринов плазмалеммы, осуществляющих потоки воды внутрь клетки [3].

Наибольшее время сохранения максимального тургора мезофилла (32 мин) наблюдалось у растений, выращенных при ВП –25 кПа (на 60 % больше контроля). Остальные фенотипы, выращенные при пониженном ВП, также характеризовались увеличенным периодом стабильного тургора мезофилла относительно контроля.

Известно, что аквапорины имеют множество механизмов регуляции на различных уровнях. В первую очередь это так называемый «гейтинг» (закрытие/открытие канала аквапорина путем их протонирования/фосфорилирования), а также изменение экспрессии генов и количества белка [11]. Наиболее быстрым ответом на изменения окружающей среды является закрытие/открытие каналов, а в процессе адаптации к стрессу изменяются экспрессия аквапоринов и их количество.

Вероятно, у растений базилика, сформировавшихся при пониженном ВП субстрата, возрастает экспрессия белков-аквапоринов, осуществляющих поступление воды внутрь клетки, что, соответственно, отражается на длительности сохранения максимального тургора мезофилла при дегидратации ткани листа.

Установлено, что у всех опытных растений при пониженном ВП субстрата существенно возрастала скорость ассимиляции CO_2 листьями (табл. 1). Максимального значения ($25,6 \pm 0,86 \cdot 10^{-6}$ ммоль/мин·см²) этот параметр достигал при ВП субстрата –25 кПа, превышая показатель, характерный для контрольных растений, в 2,5 раза.

Корреляционный анализ параметров «время сохранения максимального тургора ткани» и «скорость поглощения CO_2 , рассчитанная на единицу площади листа», показал, что между ними существует очень тесная прямая связь ($R = 0,96$) с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,92$ (табл. 2).

В настоящее время различными альтернативными методами получены доказательства участия аквапоринов в поступлении CO_2 в клетку [11]. Установленная нами корреляция также свидетельствует в пользу данной гипотезы.

Т а б л и ц а 2. Параметры корреляционного анализа

Параметр	Коэф-т корреляции (R)	Коэф-т детерминации (R^2)	Уравнение линейной регрессии
Время сохранения максимального тургора ткани и скорость ассимиляции CO_2	0,9609	0,9235	$y = 0,6798x + 13,627$
Коэффициент спада флуоресценции Rfd и коэффициент эффективности фотосинтеза по O_2	0,8688	0,7548	$y = 0,2129x + 0,5067$

Скорость фотосинтетического выделения O_2 при пониженном ВП субстрата у всех фенотипов базилика была ниже контрольной и отличалась в вариантах незначительно. Только у растений, выращенных при –25 кПа, этот параметр был идентичен контрольному (рис. 1, а). Однако интенсивность дыхания у опытных растений варьировалась гораздо сильнее. Минимальная скорость поглощения O_2 ($0,244 \pm 0,0186$ мг O_2 /дм²·ч) отмечена у растений, выращенных при –16 кПа, который, соответственно, характеризовался максимальной величиной коэффициента эффективности фотосинтеза, вычисляемого по соотношению интенсивности выделения/поглощения O_2 (рис. 1, б).

Коэффициент эффективности фотосинтеза по O_2 у растений базилика, выращенных при –25 кПа, был на 27 % выше контрольного, а при нарастании водного стресса он снижался.

В тесной взаимосвязи с интенсивностью выделения O_2 находятся процессы переноса электронов в ФС 2. Одним из критериев эффективности переноса электронов в ФС являются параметры флуоресценции хлорофилла.

Параметр ω , количественно характеризующий форму спектра флуоресценции, представлен на рис. 2, а. Максимальным ($1,651 \pm 0,0562$) коэффициент ω был у контрольных растений, близким по значению – у растений при ВП субстрата –10 кПа; по мере снижения ВП субстрата этот параметр снижался, а при ВП –35 кПа был ниже контрольного на 16 %.

Известно, что на величину ω влияет целый ряд факторов окружающей среды, в том числе водообеспеченность. Оптимальным условиям развития растения соответствует максимальное

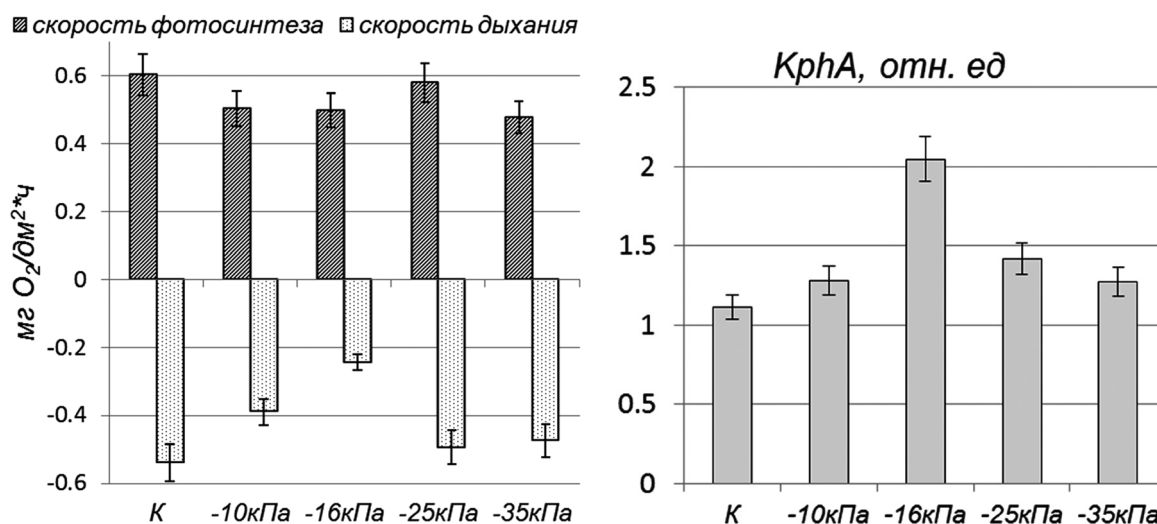


Рис. 1. Скорость дыхания и фотосинтеза (а) и коэффициент эффективности фотосинтеза (б) листьев растений базилика при различном водном потенциале корнеобитаемой среды

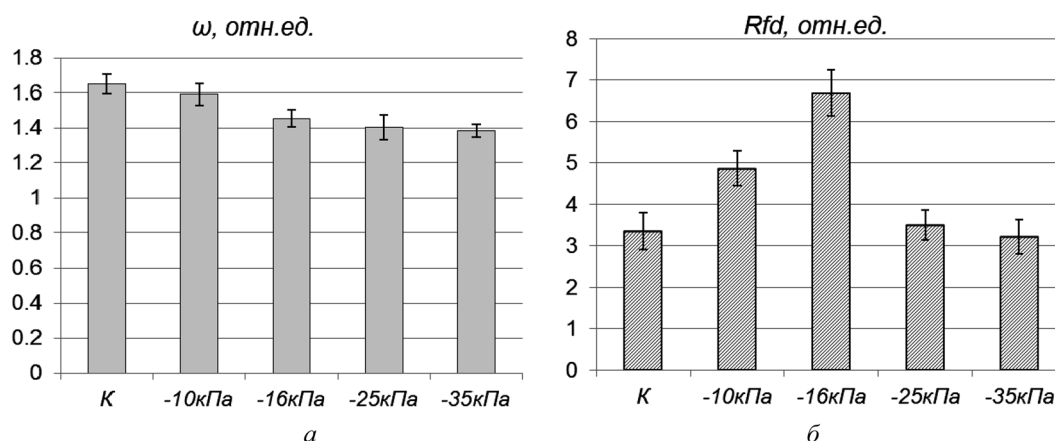


Рис. 2. Коэффициенты флуоресценции ω (а) и Rfd (б) хлорофилла листьев базилика при различном водном потенциале субстрата

значение ω [4]. Очевидно, что наиболее благоприятные условия были у контрольных растений и при ВП субстрата -10 кПа.

Значения коэффициента флуоресценции Rfd хлорофилла листьев базилика при разной степени водного дефицита субстрата представлены на рис. 2, б. Данный параметр используется для оценки стрессовых воздействий на растения и называется также индексом жизнеспособности [5].

Установлено, что при снижении ВП субстрата с -4 до -16 кПа этот параметр значительно возрастал, т. е. повышалась квантовая эффективность фотосинтеза. Коэффициент Rfd листьев базилика, выращенного при ВП -16 кПа, в 2 раза превышал аналогичный показатель у контрольных растений. При дальнейшем снижении ВП субстрата квантовая эффективность фотосинтеза снижалась. У растений, выращенных при ВП -35 кПа, величина Rfd была незначительно ниже контрольной.

Следует отметить идентичную динамику коэффициента флуоресценции Rfd и коэффициента эффективности фотосинтеза по O₂ KphA при снижении ВП корнеобитаемой среды. Это подтверждается тесной корреляцией данных параметров ($R = 0,87$) с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,75$ (см. табл. 2).

Водный стресс, вызванный пониженным ВП субстрата, изменение баланса поступления и выделения O₂, переноса электронов в ФС неизбежно влияют на редокс-статус клеток и содержание антиоксидантных веществ.

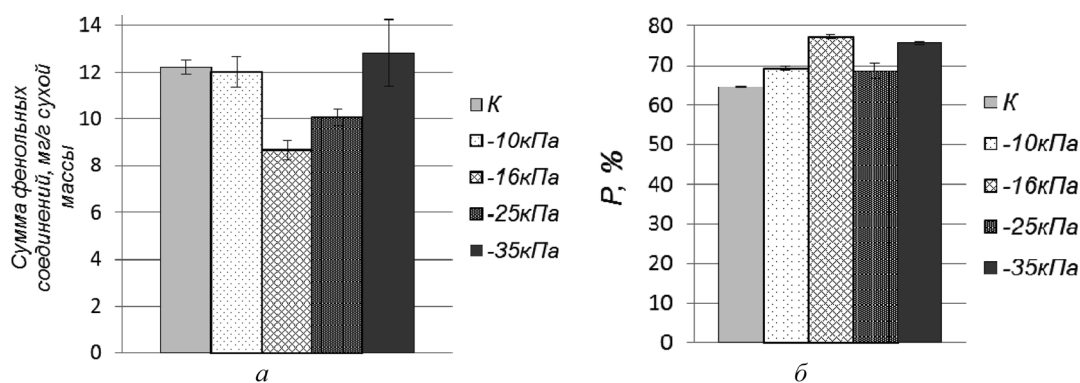


Рис. 3. Влияние водного потенциала субстрата на содержание в листьях базилика фенольных соединений (а) и на антирадикальную активность (б)

Анализ содержания фенольных соединений в листьях базилика показал, что у растений, выращенных при ВП корнеобитаемой среды -16 и -25 кПа, количество этих соединений было меньше, чем в контроле (рис. 3, а). Минимальное количество фенольных соединений ($8,67 \pm 0,422$ мг/г сухой массы) было у растений базилика, выращенного при ВП -16 кПа (ниже контрольного значения на 30 %). При -25 кПа их содержание было на 18 % ниже, чем в контроле. Максимальное содержание фенольных соединений ($12,83 \pm 1,432$ мг/г сухой массы) было в листьях базилика при ВП -35 кПа (на 5 % выше контроля).

Антирадикальная активность (P) в листьях всех вариантов превышала контрольную (рис. 3, б). Максимальный показатель у растений базилика при ВП -16 кПа составил 77,3 % ингибирования DPPH (контроль – 64,5 %). Близкие значения антирадикальной активности были при -10 и -25 кПа. У фенотипа базилика, выращенного при ВП -35 кПа, антирадикальная активность составила 75,6 % ингибирования DPPH.

Можно предположить, что у ксероморфного фенотипа базилика, сформировавшегося при -16 кПа, адаптация к пониженному ВП субстрата выразилась в снижении количества фенольных соединений. Повышение антирадикальной активности объяснялось либо синтезом фенольных соединений с более высокой антирадикальной активностью, либо наличием у этих растений других низкомолекулярных соединений, обладающих высокой антирадикальной активностью. Максимальная стрессовая нагрузка при ВП -35 кПа привела как к высокому содержанию фенольных соединений, так и к высокому уровню антирадикальной активности по сравнению с контролем.

Закключение. Фенотип базилика, сформировавшийся при умеренном водном дефиците (-16 кПа), имел ряд морфофизиологических и биохимических особенностей, свидетельствующих о повышении стрессоустойчивости растений. Это ксероморфная структура мезофилла, повышение длительности поддержания тургора ткани, повышение скорости ассимиляции CO_2 и коэффициента эффективности фотосинтеза по O_2 , повышение эффективности переноса электронов в ФС, снижение количества фенольных соединений и высокая антирадикальная активность.

Фенотип базилика, сформировавшийся при ВП субстрата -25 кПа, по некоторым параметрам превосходил растения, выращенные при -16 кПа (время сохранения максимального тургора, скорость ассимиляции CO_2), однако эффективность процессов световой фазы фотосинтеза снижалась, что отражалось и на окислительном статусе клеток. Продуктивность таких растений была ниже, что проявлялось в замедлении их роста.

При выращивании в условиях более жесткого водного дефицита (-35 кПа) адаптивный потенциал растений базилика снижался.

Список использованной литературы

1. Препарат для внесения в почву для выращивания рассады засухоустойчивой капусты белокочанной: пат. 14739 Респ. Беларусь, МПК А 01G 9/00 / В. Г. Реуцкий, Т. А. Скуратович; заявитель ГНУ ИЭБ НАНБ. – № а 20091342; заявл. 17.09.2009; опубл. 30.08.2011 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2011. – № 4 – С. 55.

2. Телюк, Н. А. Методика мониторинга водоотдачи листьев растений / Н. А. Телюк, В. Г. Реуцкий, П. А. Родионов // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1996. – № 4. – С. 38–42.
3. Особенности водообмена в системе апопласт–протопласт клеток мезофилла листа как фактор стрессоустойчивости растений / В. Г. Реуцкий [и др.]. // Ботаника (исследования) / Ин-т эксперим. ботаники; редкол.: Н. А. Ламан [и др.]. – Минск: Право и экономика, 2010. – Вып. 39. – С. 375–388.
4. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла (техника биомониторинга) / К. Б. Асланиди [и др.]. – Пушино: НЦБИ АН СССР, 1988. – С. 43.
5. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теор. основы применения метода / В. С. Лысенко [и др.]. // Фунд. исслед. Биол. науки. [Электронный ресурс]. – 2014. – № 4. – Режим доступа: http://www.rae.ru/fs/?section=content&op=show_article&article_id=10000320. – Дата доступа: 03.06.2014.
6. Folin, O. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // J. Biol. Chem. – 1927. – Vol. 73, N 2. – P. 627–650.
7. Singleton, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent / V. L. Singleton, J. A. Rossi // Am. J. Enol. Vitic. – 1965. – Vol. 16. – P. 144–158.
8. Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical / M. S. Blois // Nature. – 1958. – Vol. 181. – P. 1199–1200.
9. Brand-Williams, W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity / W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset // LWT. – 1995. – Vol. 28. – P. 25–30.
10. Телюк, Н. А. Водный режим ассимиляционной ткани листьев растений различных экологических групп / Н. А. Телюк, В. Г. Реуцкий, П. А. Родионов // Проблемы экспериментальной ботаники: к 100-летию со дня рожд. В. Ф. Купревича. – Минск: Беларус. навука, 1997. – С. 436–448.
11. Chaumont, F. Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations / F. Chaumont, S. D. Tyerman // Plant Physiol. – 2014. – Vol. 164, N 4. – P. 1600–1618.

Поступила в редакцию 29.10.2015