

ISSN 1997-1389 (Print)
ISSN 2313-5530 (Online)

**Журнал Сибирского
федерального университета
Биология**

**Journal of Siberian
Federal University
Biology**

2024 17 (2)

ISSN 1997-1389 (Print)
ISSN 2313-5530 (Online)

2024 17(2)

Издание индексируется Scopus (Elsevier), «Russian Science Citation Index» и «Zoological Record» на платформе «Web of Science» (Clarivate Analytics), Российским индексом научного цитирования (РИНЦ), представлено в международных и российских информационных базах: Ulrich's periodicals directory, ProQuest, EBSCO (США), Google Scholar, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), DOAJ, КиберЛенинка. Включено в список Высшей аттестационной комиссии «Рецензируемые научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования».

Журнал Сибирского федерального университета Биология

Journal of Siberian Federal University Biology

Журнал Сибирского федерального университета. Биология.
Journal of Siberian Federal University. Biology.

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Главный редактор: *М.И. Гладышев*. Редактор *А.В. Прохоренко*.
Корректор *Т.Е. Бастрыгина*. Компьютерная верстка *Е.В. Гревцовой*

№ 2. 30.06.2024. Индекс: 42325. Тираж: 1000 экз.

Свободная цена

Адрес редакции и издательства: 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, оф. 32-03.

Отпечатано в типографии Издательства БИК СФУ
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 82а.

*Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-28725 от 29.06.2007 г.,
выданное Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций,
связи и охраны культурного наследия.*

<http://journal.sfu-kras.ru>

Подписано в печать 27.06.2024. Формат 60х90/8. Усл. печ. л. 9,7.

Уч.-изд. л. 9,2. Бумага тип. Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ № 21013.

Возрастная маркировка в соответствии с Федеральным законом № 436-ФЗ: 16+

CHIEF EDITOR

Michail Gladyshev, Corresponding Member of RAS, Professor, Institute of Biophysics SB RAS, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia.

SCIENCE EDITOR

Elena Kravchuk, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

EDITORIAL BOARD

- Sergey Bartsev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Andrey Degermendzhy, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Nikolay Gaevsky, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Viktor Glupov, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia
- Malcolm Hughes, University of Arizona, Tucson, USA
- Mikhail Karpinsky, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia
- Valentina Kratasyuk, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- John Lee, University of Georgia, Athens, USA
- Elena Muratova, Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Vitaliy Semenchenko, Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus
- Nadezhda Sushchik, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Sabu Thomas, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India
- Aristidis Tsatsakis, University of Crete, Heraklion, Greece
- Eugene Vaganov, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Tatiana Volova, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Egor Zadereev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

CONTENTS

Nina V. Pakharkova, Nikolay A. Gaevsky and Irina G. Gette

Parameters of *Pinus sibirica* Photosynthetic Apparatus for Phenotyping Trees
in the High-Altitude Zone of the Western Sayan..... 119

Vladimir P. Koba and Nikita A. Makarov

Edaphic Conditions of *Pineta pityusae* Stands in the Crimean Mountains..... 134

Irina S. Sheveleva, Tamara I. Golovanova and Iraida N. Tretyakova

Induction of Somatic Embryogenesis
in Siberian Dwarf Pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) *in vitro* 148

Svetlana A. Pyatina, Natalia G. Menzyanova and Ekaterina I. Shishatskaya

Effects of Fullerenes and Nanodiamonds in Hydroponic Culture of *Triticum aestivum* 160

Natalia S. Repkina, Anna A. Ignatenko and Vera V. Talanova

Effect of Exogenous Salicylic Acid on the Superoxide Dismutase Activity
in Cucumber Seedlings (*Cucumis sativus* L.) Under Chilling 177

Grigory I. Shiryaev, Galina G. Borisova,

Maria G. Maleva, Artem V. Sobenin and Adarsh Kumar

Helophyte *Typha latifolia* L. as an Underestimated Biomonitor and Phytoremediator
at Ultra-High Copper Concentrations: An *In-Situ* and *Ex-Situ* Study of Adaptive Responses 190

Irina S. Korol, Daria I. Chuikina and Natalia A. Mukhortina

The Current Ecological State of Water and Bottom Sediments in Lakes Krugloye
and Maltsevo in the Tomsk Region..... 211

Olga S. Doroshenko, Tatiana A. Zamoshchina,

Alyona A. Gostyukhina, Alyona V. Prokopova,

Michael V. Svetlik, Konstantin V. Zaitsev and Oksana B. Zhukova

Approaches to Correction of Adaptive Responses of Experimental Animals during
the Autumnal Equinox..... 225

СОДЕРЖАНИЕ

Н. В. Пахарькова, Н. А. Гаевский, И. Г. Гетте

Параметры фотосинтетического аппарата *Pinus sibirica* в фенотипировании деревьев
в условиях высотной поясности Западного Саяна 119

В. П. Коба, Н. А. Макаров

Эдафические условия насаждений *Pineta pityusae* Горного Крыма..... 134

И. С. Шевелева, Т. И. Голованова, И. Н. Третьякова

Индукция соматического эмбриогенеза у кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel)
в культуре *in vitro*..... 148

С. А. Пятина, Н. Г. Мензянова, Е. И. Шишацкая

Эффекты фуллеренов и наноалмазов в гидропонной культуре *Triticum aestivum*..... 160

Н. С. Репкина, А. А. Игнатенко, В. В. Таланова

Влияние экзогенной предобработки салициловой кислотой на активность супероксиддисмутазы
у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) при холодовом стрессе 177

Г. И. Ширяев, Г. Г. Борисова,

М. Г. Малева, А. В. Собенин, А. Кумар

Гелофит *Typha latifolia* L. как недооцененный биомонитор и фиторемедиатор
при сверхвысоком содержании меди: исследование адаптивных реакций *in-situ* и *ex-situ* 190

И. С. Король, Д. И. Чуйкина, Н. А. Мухортина

Первичная оценка экологического состояния вод и донных отложений озер Круглое
и Мальцево Томской области..... 211

О. С. Дорошенко, Т. А. Замощина, А. А. Гостюхина,

А. В. Прокопова, М. В. Светлик, К. В. Зайцев, О. Б. Жукова

Возможности коррекции адаптивных реакций экспериментальных животных
в период осеннего равноденствия 225

EDN: CDVCTB

УДК 574.2+581.5

Parameters of *Pinus sibirica* Photosynthetic Apparatus for Phenotyping Trees in the High-Altitude Zone of the Western Sayan

Nina V. Pakharkova*,
Nikolay A. Gaevsky and Irina G. Gette
Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation

Received 05.12.2023, received in revised form 20.06.2024, accepted 23.06.2024

Abstract. The shift of the timberline towards higher altitudes in mountainous areas through undergrowth species invasion of new territories is caused by the global warming. In the fir-pine forests of the Western Sayan, the pioneer species is the Siberian pine, *Pinus sibirica* Du Tour. On the upper forest border, plants were discovered to show structural and physiological adaptations. This work aims to evaluate fast chlorophyll fluorescence and other parameters of the pigment complex of needles as a tool for phenotyping *P. sibirica* trees in the high-altitude zone (the Ergaki Ridge of the Western Sayan). Young Siberian pine trees of the second age class were selected for the study. Within each of the four sample plots located at altitudes from 1450 m to 1650 m, 20 typical specimens were marked. Samples of 2-year-old needles were collected from lateral shoots of the second order. Parameters of chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity of needles were recorded on Junior-PAM and IMAGING-PAM M-Series MAXI Version devices (Heinzwalz GmbH, Germany). Quantitative determination of pigments in an alcohol extract was carried out using a SPEKOL 1300 AnalytikJenna AG spectrophotometer. It was revealed that it is necessary to use different sets of structural and functional parameters of the photosynthetic apparatus for phenotyping plants from different habitats. In the summer period, the important parameters for predicting an increase in needle mass in the open Siberian pine habitats located above the forest border can be the electron transport rate, the (chlorophyll a + chlorophyll b)/carotenoids ratio in the pigment complex, as well as the value of non-photochemical quenching of fluorescence. In forest communities, the appropriate parameters are the rate of photosynthetic electron transport, the value of photosystem II maximum quantum yield and the content of chlorophylls in needles.

Keywords: fluorescence, chlorophyll, Siberian pine, timberline, treeline, climate change.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: npakharkova@sfu-kras.ru

ORCID: 0000-0003-0377-3263 (Pakharkova N.); 0000-0002-3747-9858 (Gaevsky N.); 0000-0001-7372-1499 (Gette I.)

Acknowledgements. This research was funded by Russian Science Foundation to the research project: "Intrapopulation variability of ecophysiological features of Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) trees under climate change", Grant Number 23–24–00251.

Citation: Pakharkova N. V., Gaevsky N. A., Gette I. G. Parameters of *Pinus sibirica* photosynthetic apparatus for phenotyping trees in the high-altitude zone of the western Sayan. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 119–133. EDN: CDVCTB



Параметры фотосинтетического аппарата *Pinus sibirica* в фенотипировании деревьев в условиях высотной поясности Западного Саяна

Н. В. Пахарькова, Н. А. Гаевский, И. Г. Гетте
Сибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Подъем верхней границы леса в горных районах путем освоения подростом новых территорий связан с глобальным повышением температуры. В пихтово-кедровых лесах Западного Саяна пионерным видом в составе подроста является сосна сибирская – *Pinus sibirica* Du Tour., формирующая на верхней границе леса структурные и физиологические адаптации. Данная работа нацелена на изучение возможности использования параметров быстрой флуоресценции хлорофилла и пигментного комплекса хвои для фенотипирования деревьев *P. sibirica* в условиях высотной поясности (на примере хребта Ергаки Западного Саяна). В качестве объектов исследования были выбраны молодые деревья второго класса возраста. В пределах каждой из четырех пробных площадей, расположенных по трансекте на высотах от 1450 м до 1650 м над уровнем моря, были промаркированы по 20 типичных экземпляров. Образцы хвои второго года жизни собирали с боковых побегов второго порядка. Параметры флуоресценции хлорофилла и фотосинтетической активности хвои регистрировали на приборах Junior PAM и IMAGING-PAM M-Series MAXI Version (HeinzWalzGmbH, Германия). Содержание пигментов, экстрагированных в этиловом спирте, определяли на спектрофотометре SPEKOL 1300 Analytik Jenna AG. В ходе исследования установлено, что для фенотипирования растений из различных местообитаний необходимо формировать собственный набор параметров, характеризующих фотосинтетический аппарат сосны сибирской. В летний период на открытых участках обитания сосны сибирской, расположенных выше границы леса, для прогнозирования увеличения массы хвои важными являются скорость фотосинтетического электронного транспорта, соотношение хлорофиллов и каротиноидов в пигментном комплексе, а также величина нефотохимического тушения флуоресценции. Для деревьев, входящих в состав лесных фитоценозов, информативными параметрами являются скорость фотосинтетического электронного транспорта, величина максимального квантового выхода фотосистемы II и содержание хлорофиллов в хвое.

Ключевые слова: флуоресценция, хлорофилл, сосна сибирская, верхняя граница леса, линия передовых деревьев, изменение климата.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 23–24–00251 «Внутрипопуляционная изменчивость экофизиологических признаков деревьев сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) в условиях изменения климата».

Цитирование: Пахарькова Н. В. Параметры фотосинтетического аппарата *Pinus sibirica* в фенотипировании деревьев в условиях высотной поясности Западного Саяна / Н. В. Пахарькова, Н. А. Гаевский, И. Г. Гетте // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 119–133. EDN: CDVCTB

Введение

Изменение климата оказывает существенное влияние на динамику лесных экосистем. Сдвиги широтных и высотных границ ареала показаны (Kharuk et al., 2021; Pakharkova et al., 2020) у многих видов хвойных, относящихся к основным лесообразующим видам Сибири и Алтая. В горных фитоценозах можно заметить более быстрый подъем нижней границы леса из-за уменьшения влажности и более медленный подъем верхней границы, связанный с повышением температуры и освоением подростом новых территорий. При этом скорость движения линии передовых деревьев несколько ниже, чем у верхней границы леса (Petrov et al., 2019). Подобная тенденция стимулирующего воздействия повышения температуры на продвижение линии деревьев по градиенту высоты отмечена также в горах Кольского полуострова, Полярного Урала, плато Путорана (Grigoriev et al., 2022; Moiseev et al., 2022), Восточного Саяна (Petrov et al., 2021), Западного Саяна (Kharuk et al., 2010), Кузнецкого Алатау (Petrov et al., 2015).

Важным вопросом, определяющим динамику видового состава древесного яруса горных лесных экосистем, является способность подроста видов-лесообразователей выживать выше существующей границы леса. Для пихтово-кедровых горных лесов пионерным видом является сосна сибирская – *Pinus sibirica* Du Tour (Pakharkova et al., 2020; Pakharkova et al., 2021;

Sannikov et al., 2018). Одним из несомненных биологических преимуществ сосны сибирской для продвижения выше границы леса является распространение её семян кедровкой (*Nucifraga caryocatactes* L.), которая, делая запасы, закапывает их в подстилку и мох. Однако соотношение подроста к сеянцам, а затем взрослых деревьев к подросту в зоне гольцово-тундрового пояса значительно ниже, чем под пологом леса (Никитина, Михайлова, 2018; Николаева, Панов, 2012; Сташкевич и др., 2013; Sannikov et al., 2018). Выше границы леса преобладают стланные формы, так как сильные ветры при незначительной толщине снежного покрова способствуют формированию многоствольных низкорослых деревьев (Велисевич и др., 2013).

В последние годы проведены исследования сезонных изменений структуры ассимиляционного аппарата хвойных деревьев разного возраста (Плюснина, Тужилкина, 2021; Котеева, 2002; Zagirova, 2001), их пигментного фонда (Тужилкина, 2012; Sofronova et al., 2016), а также функциональных изменений в фотосинтезирующих тканях (Бендер, 2019; Bag et al., 2020). Вместе с тем практически не исследованы экофизиологические особенности у тех экземпляров сосны сибирской, которые успешно растут и развиваются выше линии леса в суровых условиях горных экосистем. Необходимо дополнительно определить механизмы адаптации сеянцев и подроста сосны сибирской

к возможным стресс-факторам в условиях высотной поясности. Такие устойчивые генотипы (экземпляры) можно найти как в пределах вида (Шигапов и др., 2016), так и в пределах одной популяции (Пахарькова и др., 2019). Как правило, процент таких деревьев увеличивается на границе распространения вида, как в широтном, так и в высотном направлении. Экологическое разнообразие растений-пионеров может быть описано на основе адаптивных изменений их морфологических, структурных и физиологических параметров (Зотикова, Бендер, 2009). Наряду с методами феномики растений, основанными на определении закономерностей изменения физиологических и биохимических характеристик растительного организма на уровне фенотипа (Furbank, Tester, 2011; Demidchik et al., 2020), перспективными признаны методы, основанные на регистрации параметров флуоресценции хлорофилла (Dutta et al., 2015; Rolfe, Scholes, 2010; Smolikova et al., 2018).

Целью данной работы явилось изучение возможности использования параметров быстрой флуоресценции хлорофилла и пигментного комплекса хвои для фенотипирования деревьев *P. sibirica* в условиях высотной поясности (на примере хребта Ергаки Западного Саяна).

Материалы и методы

Трансекта, пересекающая верхнюю границу леса при переходе от горно-таежного к гольцово-тундровому поясу, была заложена в окрестностях оз. Ойское на территории природного парка «Ергаки» (Ермаковский район Красноярского края). Средняя температура воздуха в январе, по данным метеостанции Оленья Речка (индекс 29974 в Региональной Синоптической Сети (Регион II) Всемирной метеорологической организации), расположенной поблизости (52°48' с.ш., 93°14' в.д.;

1404 м над уровнем моря), составляет –17,7 °С, июля – + 13,2 °С. Годовое количество осадков ~1200 мм, при этом в среднем 440 мм приходится на летние месяцы (Справочно-информационный портал «Погода и климат»: <http://www.pogodaiklimat.ru>).

Четыре пробные площади (ПП), расположенные вдоль трансекты, имеют следующие координаты центральных точек:

ПП1 – N 52°50'40.4" E 093°16'24.2" высота 1636 м н.у.м.

ПП2 – N 52°50'26.3" E 093°16'26.9" высота 1558 м н.у.м.

ПП3 – N 52°50'17.2" E 093°16'21.0" высота 1505 м н.у.м.

ПП4 – N 52°50'14.6" E 093°15'28.4" высота 1455 м н.у.м.

Линия передовых деревьев проходит между ПП1 и ПП2, граница леса – между ПП2 и ПП3, граница между ПП3 и ПП4 отделяет мелкотравный пихтово-кедровый лес с преобладанием сосны сибирской от смешанного крупнотравного кедрово-пихтового леса с преобладанием пихты сибирской (табл. 1). ПП4 расположена в нижней части склона на выположенном участке, а ПП3, так же как ПП2 и ПП1, на склоне южной экспозиции.

В пределах каждой пробной площади были промаркированы 20 типичных экземпляров сосны сибирской (молодые деревья второго класса возраста), с каждого экземпляра было собрано по три побега. Общее количество растительных образцов составило 240 штук. Сбор материала был произведен в июле 2023 года.

Содержание хлорофиллов *a* и *b*, суммы каротиноидов, а также параметры быстрой флуоресценции определяли у хвои второго года жизни с боковых побегов второго порядка. Параметры флуоресценции хлорофилла хвои исследовали на флуориметрах Junior PAM и IMAGING-PAM M-Series MAXI Version

Таблица 1. Древесные формы *Pinus sibirica* на пробных площадяхTable 1. *Pinus sibirica* tree forms in sample plots

Номер пробной площади	Древесные формы
1	Единичные экземпляры стланиковых форм <i>Pinus sibirica</i> высотой до 1 м. Диаметр стволов 3–5 см
2	Редколесье, стволовые формы <i>Pinus sibirica</i> . Сомкнутость крон 0,1. Древостой однородный, формула древостоя К10. Высота деревьев до 5 м. Диаметр стволов 8–12 см
3	Смешанный мелкотравный пихтово-кедровый лес с преобладанием <i>Pinus sibirica</i> . Сомкнутость крон 0,4. Формула древостоя 6К4П. Высота деревьев сосны сибирской до 15 м. Диаметр стволов 15–20 см
4	Смешанный крупнотравный кедрово-пихтовый лес с преобладанием <i>Abies sibirica</i> . Сомкнутость крон 0,7. Формула древостоя 6П4К. Высота деревьев сосны сибирской до 15 м. Диаметр стволов 15–20 см

В формуле древостоя К – *Pinus sibirica*, П – *Abies sibirica*.

(Heinz Walz GmbH, Германия) в режиме записи световой кривой фотосинтеза. Период темновой инкубации хвои составлял от 20 до 24 часов при температуре +14 °С. Максимальный квантовый выход фотосистемы II – $Y(II)m$, актуальный квантовый выход фотосистемы II – $Y(II)$ во время записи световой кривой фотосинтеза, квантовый выход всех светоиндуцированных процессов нефотохимического тушения флуоресценции – $Y(NPQ)$, квантовый выход других неиндуцированных светом процессов, способных тушить флуоресценцию хлорофилла – $Y(NO)$. Сумма трех квантовых выходов тушения флуоресценции равна единице (Kramer et al., 2004). Величины указанных параметров, а также скорость нециклического транспорта электронов – ETR получены автоматически с помощью полнофункционального программного обеспечения WinControl-3 (WALZ, <http://www.walz.com>).

Пигменты экстрагировали 96 % этиловым спиртом. В полученных экстрактах измеряли оптическую плотность при 440,5, 649, 665 и 720 нм на спектрофотометре SPEKOL 1300 Analytik Jenna AG. Количество пигментов рассчитали по следующим формулам (Wintermans, De Mots, 1965):

$$Ca \text{ (мг/л)} = 13,7 \times (D_{665} - D_{720}) - 5,76 \times (D_{649} - D_{720})$$

$$Cb \text{ (мг/л)} = 25,8 \times (D_{649} - D_{720}) - 7,6 \times (D_{665} - D_{720})$$

$$C_{car} \text{ (мг/л)} = 4,695 \times (D_{440,5} - D_{720}) - 0,268 \times C(a+b)$$

Долю хлорофиллов a и b , входящих в светособирающий хлорофилл a/b белковый комплекс (ССК), рассчитывали по формуле (Lichtenthaler, 1987):

$$ССК = (Cb + 1,2 \times Cb) / (Ca + Cb),$$

исходя из того, что весь хлорофилл b находится в ССК, и отношение Ca/Cb в ССК составляет 1,2.

Хвою доводили до абсолютно сухого состояния в сушильном шкафу при температуре 95 °С, взвешивание проводили на аналитических весах ГОСМЕТР ВЛ-124В-С с погрешностью $\pm 0,5$ мг.

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета Microsoft Excel 2010. Рассчитаны средние значения, ошибки средних, коэффициенты корреляции Пирсона, проведен однофакторный дисперсионный анализ. Средние значения абсолютно сухой массы 20 хвоинок у каждого дерева определены на основе трех измерений, средние величины показателя для

каждой площадки – на основе 20 величин ранее рассчитанных средних. Содержание фотосинтетических пигментов и показатели флуоресценции измеряли в 3-кратной повторности в каждом отобранном образце. Средние значения концентрации пигментов и показателей флуоресценции для каждой площадки – на основе 4 величин ранее рассчитанных средних по каждому показателю. Гипотезу о достоверности различия средних значений проверяли по критерию Стьюдента. Определение достоверности выборочных коэффициентов корреляции выполняли на основе функции Фишера: $Z=0,5 \times \ln(1+r)/(1-r)$ по формуле:

$$N=t^2/z^2+3,$$

где r – выборочный коэффициент корреляции, N – количество пар значений, достаточных для достоверности выборочного коэффициента корреляции, t – критерий Стьюдента, равный 1,96 для порога вероятности безошибочного прогноза ($\beta_1=0,95$) (Плохинский, 1970).

Результаты и обсуждение

Статистически достоверные различия ($p \geq 0,95$) по абсолютно сухой массе хвои деревьев *P. sibirica* обнаружены между всеми пробными площадками, кроме ППЗ и ПП4. Абсолютно сухая масса образцов хвои деревьев *P. sibirica* увеличивалась от площадки ПП1 к площадке ППЗ по мере уменьшения высоты их расположения над уровнем моря. Величины абсолютно сухой массы образцов хвои на площадках ППЗ и ПП4 совпадали (рис. 1).

Экспресс-анализ максимальной скорости нециклического электронного транспорта – ETRmax у 80 модельных деревьев выполнен в условиях стационара природного парка «Ергаки» с помощью портативного РАМ флуориметра Junior-RAM (рис. 2). Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали достоверные различия ETRmax ($p \geq 0,95$) между площадкой ПП1 и каждой из других пробных площадок. Достоверных различий ETRmax между площадками (ПП2, ППЗ и ПП4) не выявлено. Далее на каждой площадке были выбраны по два дерева *P. sibirica* с минимальными и максимальными значе-

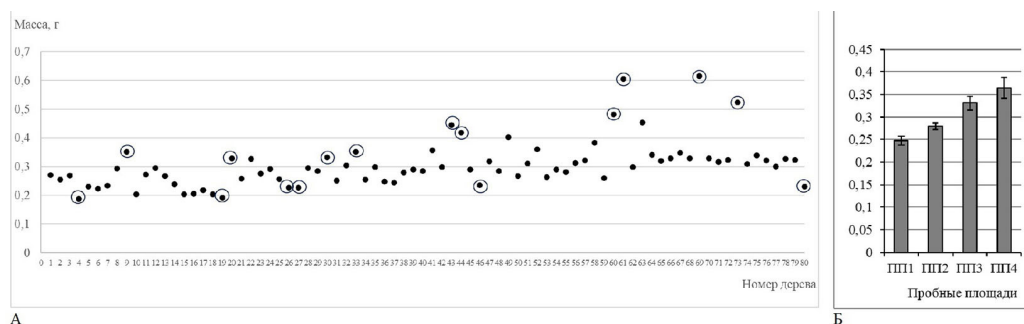


Рис. 1. Сухая масса двадцати хвоинок: А – среднее для каждого дерева (данные представлены как среднее арифметическое, полученное в 3 биологических повторностях). Выделены растения, имеющие максимальные и минимальные значения массы хвои, на каждой пробной площадке. Б – среднее для каждой пробной площадки (данные представлены как среднее арифметическое, полученное в 60 биологических повторностях)

Fig. 1. Dry mass of twenty needles: A – the average for each tree (data is presented as an arithmetic mean obtained from three biological replicates). Plants with maximum and minimum needle mass were identified in each sample plot. B – the average for each sample plot (data is presented as an arithmetic mean obtained from 60 biological replicates)

ниями ETR_{max} (рис. 2). В отобранных контрастных образцах в лабораторных условиях исследованы флуоресцентные параметры

хвой (рис. 3) с использованием флуориметра IMAGING-PAM M-Series MAXI Version и состав фотосинтетических пигментов (рис. 4).

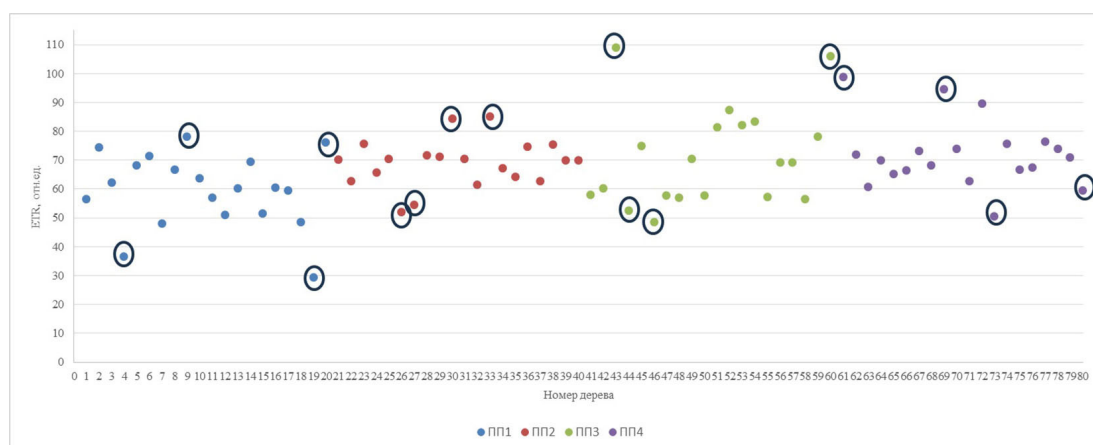


Рис. 2. Скорость нециклического электронного транспорта (ETR) в хвое растений *Pinus sibirica* (данные представлены как среднее арифметическое, полученное в трех биологических повторностях). Выделено по два растения, имеющих максимальные и минимальные значения ETR на каждой пробной площади

Fig. 2. The rate of non-cyclic electronic transport (ETR) in *Pinus sibirica* needles (data is presented as an arithmetic mean obtained from three biological replicates). Two plants with maximum and minimum ETR values were identified in each sample plot

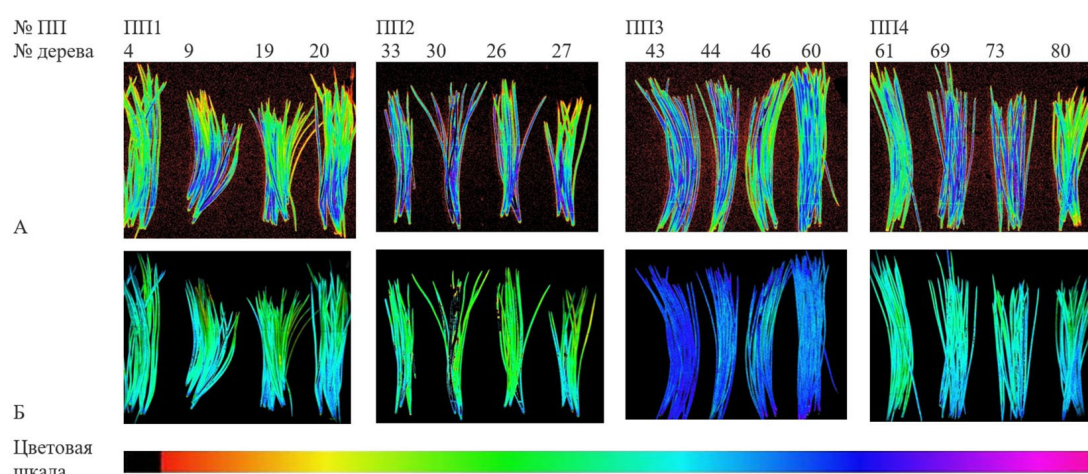


Рис. 3. Визуализация различий максимальной флуоресценции (Fm) хлорофиллов (А) и максимальной величины квантового выхода фотосистемы II (Y(II)max) (Б) хвой растений *Pinus sibirica*, произрастающих на различной высоте над уровнем моря. Цветовая шкала слева направо показывает интенсивность флуоресцентных параметров хлорофиллов хвой от минимальных до максимальных значений, оцененных при помощи флуориметра IMAGING-PAM

Fig. 3. Visualization of the differences in maximum chlorophyll fluorescence (Fm) and maximum quantum yield of photosystem II (Y(II)max) in the needles of *Pinus sibirica* growing at different altitudes. The color scale from left to right shows the intensity (from minimum to maximum values) of the fluorescence parameters of the needle chlorophyll obtained on the IMAGING-PAM fluorimeter

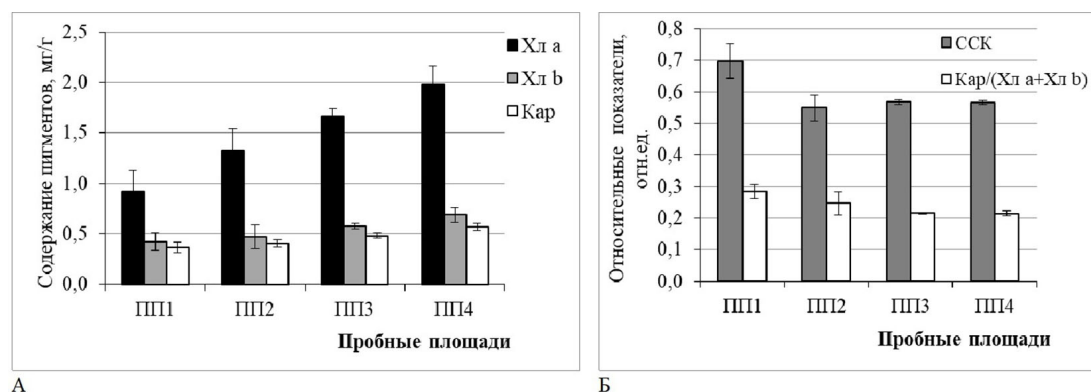


Рис. 4. Абсолютные и относительные показатели фотосинтетических пигментов хвои растений *Pinus sibirica*. Показаны средние ($n=4$) и ошибки средних: А – содержание (мг/г а.с. массы) хлорофилла а, хлорофилла b и суммы каротиноидов. Б – доля суммы хлорофиллов а и b в составе светособирающего хлорофилл а/b белкового комплекса (ССК); отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов, Кар/(Хл а + Хл b)

Fig. 4. Absolute and relative indices of photosynthetic pigments of *Pinus sibirica* needles. Means ($n=4$) and standard errors of means are shown: А – content (mg/g a.d. mass) chlorophyll a, chlorophyll b and the sum of carotenoids. Б – proportion of the sum of chlorophylls a and b in the composition of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex (LHC); ratio of the sum of carotenoids to the sum of chlorophylls, Car/(Chl a + Chl b)

Визуализация позволила определить пространственные неоднородности образцов в результате частичных повреждений хвои, которые необходимо учитывать для правильной интерпретации результатов измерения фотосинтетической активности. При регистрации флуоресценции нами была выделена зона в средней части хвоинок. Интенсивность максимальной флуоресценции хлорофилла (F_m) была минимальной у хвои растений *P. sibirica* на площадке ПП1 и значительно увеличивалась в хвое растений с площадки ПП2, на которой стволовые формы замещают стланиковые формы *P. sibirica* (табл. 1), что указывает на снижение стрессирующего воздействия лимитирующих факторов. На третьей и четвертой пробных площадках, расположенных ниже верхней границы леса, величина F_m стала еще выше, что особенно наглядно видно на изображениях F_m у хвои с деревьев № 43 и № 44 (ПП3), а также № 69 и № 73 (ПП4).

Наименьшее содержание хлорофиллов а и b и каротиноидов определили у деревьев

P. sibirica, произрастающих в верхней части склона (ПП1) (рис. 4А). Содержание фотосинтетических пигментов в хвое деревьев *P. sibirica* увеличивалось по мере уменьшения высоты местоположения площадки над уровнем моря. Это согласуется с данными других авторов (Зотикова, Бендер, 2009; Tranquillini, 1979; James et al., 1994). Также можно отметить значительное увеличение дисперсии содержания пигментов у хвои деревьев *P. sibirica*, произрастающих на верхних площадках ПП1 и ПП2 по сравнению с дисперсией на площадках ПП3 и ПП4.

Доля суммы хлорофиллов а и b в составе светособирающего хлорофилл а/b белкового комплекса (ССК) в хвое растений *P. sibirica* на площадке ПП1 существенно выше, чем у деревьев на площадках ПП2-ПП4 (рис. 4Б), на которых ССК был развит в равной степени. Отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов в хвое на площадке ПП1 также имело максимальное значение (рис. 4Б), а на площадке ПП2 уступало площадке ПП1,

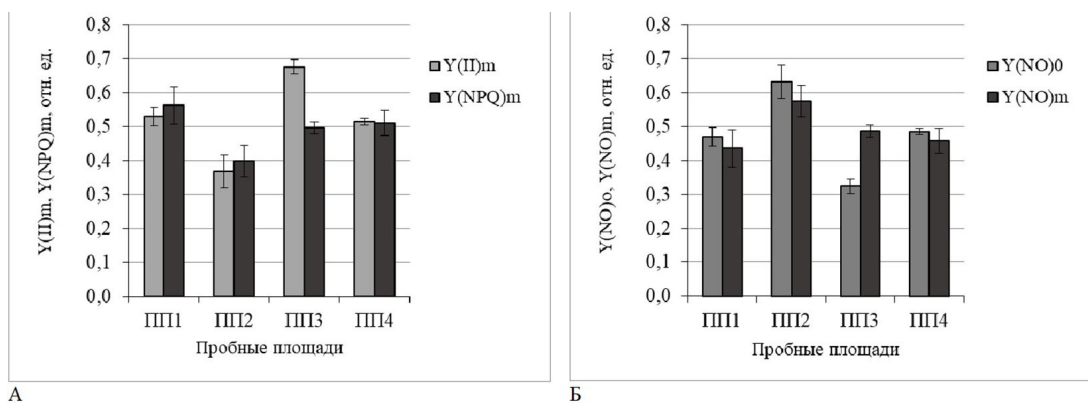


Рис. 5. Максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II, $Y(II)_{\max}$; квантовый выход светоиндуцированного нефотохимического тушения флуоресценции, $Y(NPQ)$; квантовый выход светонезависимого нефотохимического тушения флуоресценции, $Y(NO)$ в хвое растений *Pinus sibirica*. Показаны средние значения ($n=4$) и ошибки средних. А – $Y(II)_m$ – максимальный фотохимический квантовый выход фотосистемы II в момент первой насыщающей вспышки; $Y(NPQ)_m$ – максимальный квантовый выход светоиндуцированного нефотохимического тушения флуоресценции. Б – $Y(NO)_o$ и $Y(NO)_m$ – квантовый выход светонезависимого нефотохимического тушения флуоресценции в момент первой насыщающей вспышки и в условиях максимальной скорости транспорта электронов (ETR_m) соответственно

Fig. 5. Maximum photochemical quantum yield of photosystem II, $Y(II)_{\max}$; quantum yield of light-induced non-photochemical fluorescence quenching, $Y(NPQ)$; quantum yield of non-light induced non-photochemical fluorescence quenching, $Y(NO)$, in needles of *Pinus sibirica*. Means ($n=4$) and standard errors of means are shown. А – $Y(II)_m$ is maximum photochemical quantum yield of photosystem II at the time of the first saturating flash; $Y(NPQ)_m$ is maximum quantum yield of light-induced non-photochemical fluorescence quenching. Б – $Y(NO)_o$ and $Y(NO)_m$ – quantum yields of non-light induced non-photochemical fluorescence quenching at the time of the first saturating flash and at maximum electron transport velocity (ETR_m), respectively

но превосходило эту величину у хвои на площадках ПП3 и ПП4. Высокое содержание ССК и отношение $Car/(Xl\ a + Xl\ b)$ в хвое растений *P. sibirica* на площадке ПП1 согласуется с необходимостью усиления защитной роли каротиноидов и пигментов ксантофиллового цикла в составе ССК (Maslova et al., 2021) в условиях повышенной инсоляции растений светом видимого и УФ-диапазонов. Протекторная функция ССК показана также для большой группы травянистых растений Западного Шпицбергена. Ведущим процессом оказывается нефотохимическое тушение флуоресценции, которое позволяет корректировать поступление и распределение световой энергии в растениях Арктики (Марковская, Шмакова, 2017).

Величина максимального квантового выхода фотосистемы II – $Y(II)_{\max}$, в отличие

от F_m , которая во многом определяется количеством хлорофилла, формируется во время биогенеза фотосинтетического аппарата и характеризует способность реакционного центра фотосистемы II использовать энергию возбужденного хлорофилла на фотохимическое восстановление акцепторов фотосистемы II. Максимальная величина $Y(II)_{\max}$ зарегистрирована у хвои деревьев с площадки ПП3 (рис. 5А). Именно на этой площадке по количеству деревьев *P. sibirica* преобладает в составе древостоя (табл. 1). На площадке ПП4, где древесный ярус представлен большей частью деревьями *Abies sibirica*, величина $Y(II)_{\max}$ заметно снижена. В верхней части склона на площадке ПП1 потенциальная фотохимическая активность фотосистемы II сохраняла относительно высокий уровень

$Y(II)_{max}$, но из-за низкого содержания хлорофилла и большой доли ССК (рис. 4Б) величина ETR_m оказалась низкой (рис. 2) по сравнению с нижерасположенными участками.

Светоиндуцированное нефотохимическое тушение флуоресценции – $Y(NPQ)$ определяет долю безызлучательного рассеивания энергии, в котором участвует светособиравший хлорофилл-а/б-белковый комплекс (ССК) (Kramer et al., 2004; Maslova et al., 2021). Минимальные среди четырех площадок значения $Y(NPQ)$ зарегистрированы у хвои деревьев *P. sibirica* на площадке ПП2, там же, где были минимальные значения $Y(II)_m$.

Квантовый выход неиндуцированных светом процессов диссипации энергии возбуждения, способных тушить флуоресценцию хлорофилла – $Y(NO)$ (Kramer et al., 2004), по-видимому, зависит от наличия центров тушения, сформированных в период биогенеза фотосинтетического аппарата. Это предположение справедливо и по отношению к величине максимального выхода фотосистемы II – $Y(II)_m$. Во время первой насыщающей вспышки света компонент тушения флуоресценции – $Y(NPQ)$ равен нулю, поэтому $Y(NO) = 1 - Y(II)_m$. Напротив, при световом насыщении первичных реакций фотосинтеза актуальный квантовый выход фотосистемы II приближается к нулю, и $Y(NO) \approx 1 - Y(NPQ)_m$. Видимые различия между $Y(NO)_o$ и $Y(NO)_m$ (рис. 5Б) указывают на изменения в организации центров тушения флуоресценции хлорофилла во время регистрации световой кривой фотосинтеза. Независимо от момента регистрации $Y(NO)$, его величина у хвои на площадке ПП2 является максимальной. Значения $Y(NO)$ на площадках ПП1 и ПП4 совпадают. На площадке ПП3 значения $Y(NO)_o$ были минимальны на старте световой кривой, но выросли до значений на площадках ПП1 и ПП4 после насыщения световой кривой (рис. 5Б).

Высокие значения скорости электронного транспорта – ETR (см. рис. 2) и других зарегистрированных параметров флуоресценции хлорофилла (рис. 3) отмечены у деревьев *P. sibirica*, имеющих максимальную (высокую) абсолютно сухую массу хвои.

Обсуждение полученных результатов, очевидно, надо вести на основе возможных адаптаций у растений *P. sibirica* в зоне, расположенной на границе и выше границы леса, по сравнению с мелкотравным и крупнотравным пихтово-кедровым лесом. С увеличением высоты над уровнем моря сокращается период активного функционирования фотосинтетического аппарата. Весной возникает ситуация, когда хвоя сосны находится в состоянии вынужденного покоя, а уровень солнечной радиации достигает высоких значений. Светозависимые процессы, защищающие фотосинтетический аппарат от окислительного стресса в этот период еще неактивны. Адаптация в этих условиях может заключаться в снижении количества хлорофиллов на единицу массы и формировании антенного комплекса фотосистемы II с увеличенным содержанием центров тушения флуоресценции. По нашим данным, минимальное содержание хлорофилла *a* и каротиноидов отмечено в хвое на верхней площадке ПП1, и наблюдается увеличение этих показателей с понижением высоты над уровнем моря. Одновременно от максимума к минимуму изменяется отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов. Величина ССК максимальна на верхней площадке и остается постоянной на площадках ПП2-ПП4.

Сравнение функциональных показателей фотосинтетического аппарата у хвои деревьев *P. sibirica* показало увеличение скорости электронного транспорта – ETR_m от минимальных значений на площадке ПП1 к равным и более высоким значениям на площадках

ПП2-ПП4. Максимальный квантовый выход фотохимического тушения флуоресценции – $Y(II)m$ был у хвои деревьев *P. sibirica* на ПП3, на которой в кедрово-пихтовом древостое преобладала *P. sibirica*.

Функциональные показатели фотосинтетического аппарата у хвои деревьев *P. sibirica* на ПП2 заслуживают особого внимания. Высокие значения светонезависимого нефотохимического тушения флуоресценции – $Y(NO)$ одновременно с минимальными значениями $Y(II)m$ и $Y(NPQ)m$ указывает на отличный от других площадок способ защиты фотосинтетического аппарата хвои, который защищен снегом у стланиковых форм на площадке ПП1 или сомкнутыми кронами деревьев на площадках ПП3 и ПП4.

В работе Рубана (Ruban, 2015) утверждается, что механизм светозависимого нефотохимического тушения эффективен только при закрытых реакционных центрах фотосистемы II, то есть при высокой освещенности. Как показывает анализ литературы (Maslova et al., 2021; Pospisil, 1998), чувствительность к стрессу усиливается при высоких освещенностях.

Это связано с тем, что стресс, вызывая различные метаболические нарушения, затрагивает энергетический обмен растения, в первую очередь процесс фотосинтеза. В этом случае растение начинает корректировать приход и использование световой энергии как наиболее простой и экономичный путь адаптации для коррекции метаболизма (Ruban, 2015), и механизм нефотохимического тушения входит как составляющая в систему неспецифических ответов растения в условиях стресса.

По выборке всех исследованных деревьев коэффициент корреляции между максимальной скоростью электронного транспорта – $ETRm$ и абсолютно сухой массой хвои имеет высокие значения (табл. 2). Умеренные коэффициенты корреляции отмечены на верхних пробных площадях ПП1 и ПП2. Возможно, это связано с более коротким вегетационным периодом, когда за небольшое время необходимо нарастить биомассу, и хвоя фотосинтезирует более активно. Что касается максимального квантового выхода фотосистемы II – $Y(II)m$ и нефотохимического тушения – $Y(NPQ)$, деревья сосны сибирской,

Таблица 2. Коэффициенты корреляции абсолютно сухой массы хвои *Pinus sibirica* со скоростью транспорта электронов, максимальным квантовым выходом, нефотохимическим тушением флуоресценции и содержанием фотосинтетических пигментов, рассчитанные по методу Пирсона

Table 2. Correlation coefficients between absolutely dry mass of *Pinus sibirica* needles and electron transport rate, maximum quantum yield, non-photochemical quenching of fluorescence and photosynthetic pigments content calculated by the Pearson method

Показатели	Количество пар	Абсолютно сухая масса хвои			
		ПП1	ПП2	ПП3	ПП4
$ETRm$	20	0,58*	0,57*	0,47*	0,42
$Y(II)m$	4	0,62	0,69	0,64	0,63
$Y(NPQ)m$	4	0,52	0,22	-0,40	-0,85
Ca	4	0,93*	0,74	0,86	0,89
Ca+Cb	4	0,92*	0,76	0,88	0,89
Ca/Cb	4	0,27	0,23	0,35	0,57
Cscarot	4	0,92*	0,56	0,46	0,46

* выборочные коэффициенты корреляции достоверны для уровня значимости 0,95.

произрастающие выше границы леса и обладающие механизмами диссипации излишков световой энергии, имеют явное преимущество по набору массы хвои перед другими растениями с той же пробной площади. Для деревьев с других пробных площадей высокая доля нефотохимического тушения является скорее помехой. Ещё одним параметром, имеющим высокие значения коэффициентов корреляции с массой хвои для всех пробных площадей, является содержание хлорофиллов. Количество каротиноидов, даже в летний период, особенно важно для растений на верхней пробной площади (ПП1), что хорошо согласуется с необходимостью процессов нефотохимического тушения.

Заключение

Для хвойных растений, произрастающих выше границы леса, основными рисками являются высокая интенсивность солнечной радиации в начале лета, вызывающая фотоингибирование фотосинтеза при низких положительных температурах, и более короткий вегетационный период. В зависимости от пигментного состава хвои, структурных особенностей фотосинтетического аппарата, интенсивности фотосинтеза и других параметров растения оказываются в разной степени устойчивыми.

Измерение параметров флуоресценции хлорофилла является удобным методом для фенотипирования хвойных, в частности сосны сибирской кедровой (*P. sibirica*), с целью выбора деревьев для сбора семенного материала и оптимизации лесовосстановления в условиях изменения климата. Однако необходимо выделять различные структурно-функциональные параметры фотосинтетического аппарата при фенотипировании растений из различных местообитаний.

В ходе исследования было выявлено, что для открытых местообитаний сосны сибирской, расположенных выше границы леса, важным параметром в летний период для прогнозирования наращивания массы хвои и площади фотосинтетического аппарата, что, в свою очередь, обеспечивает продуктивность всего растения, может стать скорость электронного транспорта, соотношение в пигментном комплексе хлорофиллов и каротиноидов, а также величина нефотохимического тушения флуоресценции.

Для деревьев, входящих в состав лесных фитоценозов, информативными параметрами являются скорость электронного транспорта, величина максимального квантового выхода фотосистемы II и содержание хлорофиллов в хвое.

Список литературы / References

- Бендер О.Г. (2019) Структурные и функциональные особенности хвои кедра сибирского и кедрового стланика в условиях юга Западной Сибири. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*, 18: 467–471 [Bender O. G. (2019) Structural and functional features of Siberian stone pine and Siberian dwarf pine needle in the south part of Western Siberia. *Problems of Botany of South Siberia and Mongolia* [Problemy botaniki Yuzhnoi Sibiri i Mongolii], 18: 467–471 (in Russian)]
- Велисевич С.Н., Хуторной О.В., Горошкевич С.Н. (2013) Морфогенез стелющихся и прямостоячих форм *Pinus sibirica* Du Tour (Pinaceae) на интразональных границах распространения. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*, 6(3): 275–289 [Velisevich S. N., Khutornoy O. V., Goroshkevich S. N. (2013) Morphogenesis of upright and prostrate growth forms of *Pinus sibirica* Du Tour (Pinaceae) at the intrazonal distribution limits. *Journal of Siberian Federal University. Biology* [Zhurnal Sibirskogo federalnogo universiteta. Biologiya], 6(3): 275–289 (in Russian)]

Зотикова А. П., Бендер О. Г. (2009) Структура и функция ассимиляционного аппарата кедр сибирского в горах Центрального Алтая. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*, 2(1): 80–89 [Zotikova A. P., Bender O. G. (2009) Structure and function of Siberian stone pine assimilation apparatus in central Altai Mounteens. *Journal of Siberian Federal University. Biology* [Zhurnal Sibirskogo federalnogo universiteta. Biologiya], 2(1): 80–89 (in Russian)]

Котеева Н. К. (2002) Особенности сезонной ритмики ультраструктуры клеток апикальной меристемы побега и мезофилла хвои *Pinus sylvestris* (Pinaceae). *Ботанический журнал*, 87(11): 50–60 [Koteeva N. K. (2002) Features of the seasonal rhythm of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) cell ultrastructure in shoot apical meristem and needle mesophyll. *Botanical Journal* [Botanicheskii zhurnal], 87(11): 50–60 (in Russian)]

Марковская Е. Ф., Шмакова Н. Ю. (2017) *Растения и лишайники Западного Шпицбергена: экология, физиология*. Петрозаводск, ПетрГУ, 270 с. [Markovskaya E. F., Shmakova N. Yu. (2017) *Plants and lichens of Western Spitsbergen: ecology, physiology*. Petrozavodsk, Petrozavodsk State University, 270 p. (in Russian)]

Никитина Н. В., Михайлова Л. М. (2018) Рост и развитие подроста кедр (*Pinus sibirica* Du Tour) под пологом леса и на вырубках Юго-Западной Якутии. *Успехи современного естествознания*, 12–2: 296–301 [Nikitina N. V., Mikhaylova L. M. (2018) Growth and development of the cedar (*Pinus sibirica* Du Tour) adolescent under the forest protection and on the cut-over areas of south-western Yakutia. *Advances in Current Natural Sciences* [Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya], 12–2: 296–301 (in Russian)]

Николаева С. А., Панов А. Н. (2012) Сезонный рост и развитие побегов кедр сибирского под пологом сосновых и березовых насаждений. *Лесоведение*, 3: 59–68 [Nikolaeva S. A., Panov A. N. (2012) Seasonal growth and development of shoots in Siberian stone pine under deciduous-pine canopy. *Russian Journal of Forest Science* [Lesovedenie], 3: 59–68 (in Russian)]

Пахарькова Н. В., Кузьмина Н. А., Кузнецова Г. В., Кузьмин С. Р. (2019) Диагностика устойчивости представителей рода *Pinus* к периодическим повышениям температуры в зимне-весенний период. *Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии*, 227: 88–106 [Pakharkova N. V., Kuzmina N. A., Kuznetsova G. V., Kuzmin S. R. (2019) Diagnostics of genus *Pinus* representatives resistance to periodical temperature increases during winter-spring period. *News of the Saint Petersburg Forestry Academy* [Izvestiya Sankt-Peterburgskoi lesotekhnicheskoi akademii], 227: 88–106 (in Russian)]

Плохинский Н. А. (1970) *Биометрия*. Москва, МГУ, 367 с. [Plokhinsky N. A. (1970) *Biometrics*. Moscow, Moscow State University, 367 p. (in Russian)]

Плюснина С. Н., Тужилкина В. В. (2021) Структурно-функциональная характеристика фотосинтетического аппарата подроста *Pinus sylvestris* (Pinaceae) в подзоне средней тайги европейского Северо-Востока. *Ботанический журнал*, 106(11): 1072–1084 [Plyusnina S. N., Tuzhilkina V. V. (2021) Structural and functional characteristics of the photosynthetic apparatus of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) regrowth in the middle taiga subzone of the European north-east. *Botanical Journal* [Botanicheskii zhurnal], 106(11): 1072–1084 (in Russian)]

Сташкевич Н. Ю., Данилина Д. М., Сенашова В. А. (2013) Оценка состояния подроста *Pinus sibirica* Du tour и *Abies sibirica* Ledeb. в смешанных производных лесах черневого пояса Западного Саяна. *Вестник КрасГАУ*, 9: 145–150 [Stashkevich N. Yu., Danilina D. M., Senashova V. A. (2013) Evaluation of the state of the juvenile *Pinus sibirica* Du tour and *Abies sibirica* Ledeb. in mixed secondary forests of the black belt of the Western Sayans. *Vestnik KrasGau*, 9: 145–150 (in Russian)]

(2013) Undergrowth condition assessment of *Pinus sibirica* Du Tour and *Abies sibirica* Ledeb. in the mixed second growth forests of the western Sayan dark belt. *Bulletin of KrasGAU* [Vestnik KrasGAU], 9: 145–150 (in Russian)]

Тужилкина В.В. (2012) Пигментный комплекс хвои сосны в лесах европейского Северо-Востока. *Лесоведение*, 4: 16–23 [Tuzhilkina V. V. (2012) Pigment complex of pine in phytocenoses of the European north-east. *Russian Journal of Forest Science* [Lesovedenie], 4: 16–23 (in Russian)]

Шигапов З. Х., Путенихина К. В., Шигапова А. И., Уразбахтина К. А., Путенихин В. П. (2016) Генетическое разнообразие кедра сибирского при интродукции на Южном Урале и в Башкирском Предуралье. *Сибирский лесной журнал*, 5: 137–146 [Shigapov Z. Kh., Putenikhina K. V., Shigapova A. I., Urazbakhtina K. A., Putenikhin V. P. (2016) Genetic diversity of Siberian stone pine under introduction in the south Urals and Bashkir cis-Urals. *Siberian Journal of Forest Science* [Sibirskii lesnoi zhurnal], 5: 137–146 (in Russian)]

Bag P., Chukhutsina V., Zhang Z., Paul S., Ivanov A. G., Shutova T., Croce R., Holzwarth A. R., Jansson S. (2020) Direct energy transfer from photosystem II to photosystem I confers winter sustainability in Scots Pine. *Nature Communications*, 11: 6388

Demidchik V. V., Shashko A. Y., Bandarenka U. Y., Smolikova G. N., Przhevalskaya D. A., Charnysh M. A., Pozhvanov G. A., Barkosvkiy A. V., Smolich I. I., Sokolik A. I., Yu M., Medvedev S. S. (2020) Plant phenomics: fundamental bases, software and hardware platforms, and machine learning. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67(3): 397–412

Dutta S., Cruz J. A., Jiao Y., Chen J., Kramer D. M., Osteryoung K. W. (2015) Non-invasive, whole-plant imaging of chloroplast movement and chlorophyll fluorescence reveals photosynthetic phenotypes independent of chloroplast photorelocation defects in chloroplast division mutants. *Plant Journal*, 84(2): 428–442

Furbank R. T., Tester M. (2011) Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science*, 16(12): 635–644

Grigoriev A. A., Shalaumova Y. V., Vyukhin S. O., Balakin D. S., Kukarskikh V. V., Vyukhina A. A., Camarero J. J., Moiseev P. A. (2022) Upward treeline shifts in two regions of subarctic Russia are governed by summer thermal and winter snow conditions. *Forests*, 13(2): 174

James J. C., Grace J., Hoad S. P. (1994) Growth and photosynthesis of *Pinus sylvestris* at its altitudinal limit in Scotland. *Journal of Ecology*, 82(2): 297–306

Kharuk V. I., Im S. T., Petrov I. A. (2021) Alpine ecotone in the Siberian Mountains: vegetation response to warming. *Journal of Mountain Science*, 18(12): 3099–3108

Kharuk V. I., Im S. T., Dvinskaya M. L. (2010) Forest-tundra ecotone response to climate change in the Western Sayan Mountains, Siberia. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 25(3): 224–233

Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G. E. (2004) New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, 79(2): 209–218

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382

Maslova T. G., Markovskaya E. F., Slemnev N. N. (2021) Functions of carotenoids in leaves of higher plants (review). *Biology Bulletin Reviews*, 11(5): 476–487

Moiseev P. A., Hagedorn F., Balakin D. S., Bubnov M. O., Devi N. M., Kukarskikh V. V., Mazepa V. S., Viyukhin S. O., Viyukhina A. A., Grigoriev A. A. (2022) Stand biomass at treeline

ecotone in Russian subarctic mountains is primarily related to species composition but its dynamics driven by improvement of climatic conditions. *Forests*, 13(2): 254

Pakharkova N., Borisova I., Sharafutdinov R., Gavrikov V. (2020) Photosynthetic pigments in Siberian pine and fir under climate warming and shift of the timberline. *Forests*, 11(1): 63

Pakharkova N., Kazantseva A., Sharafutdinov R., Borisova I., Gavrikov V. (2021) Two-species forests at the treeline of Siberian mountains: An ecophysiological perspective under climate change. *Plants*, 10(4): 763

Petrov I. A., Shushpanov A. S., Golyukov A. S., Dvinskaya M. L., Kharuk V. I. (2021) Dynamics of tree and shrub vegetation in the Eastern Sayan mountain tundra. *Russian Journal of Ecology*, 52(5): 399–405

Petrov I. A., Kharuk V. I., Dvinskaya M. L., Im S. T. (2015) Reaction of coniferous trees in the Kuznetsk Alatau alpine forest-tundra ecotone to climate change. *Contemporary Problems of Ecology*, 8(4): 423–430

Petrov I. A., Shushpanov A. S., Golyukov A. S., Kharuk V. I. (2019) *Pinus sibirica* Du Tour response to climate change in the forests of the Kuznetsk Alatau Mountains. *Siberian Journal of Forest Science*, 5: 43–53

Pospisil P. (1998) Mechanisms of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in higher plants. *Photosynthetica*, 34(3): 343–355

Rolfe S. A., Scholes J. D. (2010) Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma*, 247(3–4): 163–175

Ruban A. V. (2015) Evolution under the sun: Optimizing light harvesting in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 66(1): 7–23

Sannikov S. N., Tantsyrev N. V., Petrova I. V. (2018) Invasion of Siberian pine populations in mountain tundra in the northern Urals. *Contemporary Problems of Ecology*, 11(4): 396–405

Sofronova V. E., Dymova O. V., Golovko T. K., Chepalov V. A., Petrov K. A. (2016) Adaptive changes in pigment complex of *Pinus sylvestris* needles upon cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(4): 433–442

Smolikova G., Kreslavski V., Shiroglazova O., Bilova T., Sharova E., Frolov A., Medvedev S. (2018) Photochemical activity changes accompanying the embryogenesis of pea (*Pisum sativum*) with yellow and green cotyledons. *Functional Plant Biology*, 45(2): 228–235

Tranquillini W. (1979) *Physiological ecology of the alpine timberline: tree existence at high altitudes with special reference to the European Alps. Ecological studies (analysis and synthesis), Volume 31*. New York, Berlin, Springer-Verlag, 137 p.

Wintermans J. F. G. M., De Mots A. (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 109(2): 448–453

Zagirova S. V. (2001) Structure and CO₂ exchange in the needles of *Pinus sylvestris* and *Abies sibirica*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(1): 23–28

EDN: AVDJVN

УДК 574.2

Edaphic Conditions of *Pineta pityusae* Stands in the Crimean Mountains

Vladimir P. Koba* and Nikita A. Makarov

*Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center RAS
Yalta, Russian Federation*

Received 19.07.2023, received in revised form 20.06.2024, accepted 23.06.2024

Abstract. An important aspect of research addressing the dynamics of growth and development of tree stands and evaluation of their state is analysis of edaphic conditions in which they grow. In mountain landscapes, soil formation and the state of the soil exhibit considerable patchiness and narrowing of the range of natural factors that ensure the formation of an edaphotope and meet the requirements for its development. The aim of the present work was to study the soil in large stands of *Pinus brutia* var. *pityusa* in the Crimean Mountains and to analyze dynamics of its qualitative and quantitative properties. Soil properties were examined in layers of 0...10, 10...20, 20...30, 30...40, and 40...50 cm in sections on sample plots along hypsometric profiles in the largest *P. brutia* var. *pityusa* forests in the districts of Ayazma and Batiliman, on Karaul-Oba Mountain, and in the district of Novyi Svet. The results of the study show that in the western part of the *P. brutia* var. *pityusa* range in the Crimean Mountains, the growing conditions for this species are more favorable, in terms of humus content and soil texture, compared to the eastern part. The least favorable soil conditions were observed in ecotopes on Karaul-Oba. The present study demonstrates that low levels of moisture accumulation and humus content of the soil are limiting factors affecting the growth and development of *P. brutia* var. *pityusa* in the ecotopes of the eastern part of the Crimean Mountains.

Keywords: *P. brutia* var. *pityusa*, stands, profile, soil, edaphic conditions, humus, soil texture.

Citation: Koba V.P., Makarov N.A. Edaphic conditions of *Pineta pityusae* stands in the Crimean Mountains. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 134–147. EDN: AVDJVN



© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: kobavp@mail.ru

ORCID: 0000-0002-2144-0836 (Koba V.); 0009-0009-0536-4747 (Makarov N.)

Эдафические условия насаждений *Pineta pityusae* Горного Крыма

В. П. Коба, Н. А. Макаров

Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН
Российская Федерация, Ялта

Аннотация. При изучении динамики роста и развития, оценке состояния древесных насаждений важное значение имеет анализ эдафических условий их произрастания. В горных ландшафтах процессы почвообразования и состояние почвенной среды характеризуются большой мозаичностью, сужением масштабов оптимальности экологических факторов, обеспечивающих формирование эдафотопов, поддержание стабильности его развития. Целью исследований являлось изучение почвы, анализ динамики ее качественных и количественных характеристик в естественных насаждениях *Pinus brutia* var. *pityusa* Горного Крыма. Оценивали свойства почв послойно (0...10, 10...20, 20...30, 30...40 и 40...50 см), в разрезах, заложенных на пробных площадях по гипсометрическим профилям в местах наиболее крупных массивов лесов *P. brutia* var. *pityusa* (урочища Аязьма, Батилиман, на г. Караул-Оба и урочище Новый Свет). Результаты проведенных исследований показали, что в Горном Крыму в западной части природного ареала *P. brutia* var. *pityusa* почвы по содержанию гумуса и гранулометрическому составу более благоприятны для данного вида, в сравнении с восточной. Пессимальные условия по характеристике почвенных условий наблюдаются в экотопах на г. Караул-Оба. Показано, что низкий уровень влагонакопления и невысокое количество гумуса в почве являются лимитирующими факторами, влияющими на рост и развитие *P. brutia* var. *pityusa* в экотопах восточной части Горного Крыма.

Ключевые слова: *P. brutia* var. *pityusa*, насаждения, профиль, почва, эдафические условия, гумус, гранулометрический состав.

Цитирование: Коба В. П. Эдафические условия насаждений *Pineta pityusae* Горного Крыма / В. П. Коба, Н. А. Макаров // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 134–147. EDN: AVDJVN

Введение

При изучении динамики роста и развития, оценке состояния древесных насаждений важное значение имеет анализ эдафических условий их произрастания. Структура и состав, влагосодержание почвы во многом определяют специфику формирования лесных фитоценозов, которые, в свою очередь, также оказывают заметное влияние на характеристики эдафотопов (Автономов, 2014; Никифоров, 2018; Дао и др., 2019; Кобечинская и др., 2019; Плугатарь и др.,

2020; Сизых, 2021). Накопление опада, образование лесной подстилки, развитие глубокой корневой системы в больших объемах почвенной среды, биохимические процессы, связанные с формированием ризосферы, при активном влиянии симбиотических компонентов – все это определяет особенности генезиса эдафотопов лесных биогеоценозов. Уничтожение древесного яруса часто приводит к глубокой трансформации эдафических условий (Zhang et al., 2022a, b).

В горных ландшафтах процессы почвообразования и состояние почвенной среды характеризуются большой мозаичностью, сужением масштабов оптимальности экологических факторов, обеспечивающих формирование эдафотопы, поддержание стабильности его развития. С изменением высоты над уровнем моря, крутизны и экспозиции склонов существенно меняются условия произрастания, весь комплекс экзогенных и эндогенных факторов, связанных с процессами почвообразования (Kukarskih et al., 2020; Mohammed et al., 2020; Verrall, Pickering, 2020; Xue et al., 2022). Анализ данных проблем имеет важное значение при изучении биоценозов редких и исчезающих видов растений с целью выявления причинно-следственных связей негативных тенденций сокращения численности и снижения в настоящее время биологических возможностей их успешного роста и развития.

В Горном Крыму одним из природоохранных объектов, который нуждается в пристальном внимании и проведении мониторинговых исследований, являются природные насаждения *Pinus brutia* var. *pityusa* (Steven) Silba. Занимая сравнительно небольшие территории в прибрежной зоне южного макросклона Главной гряды Крымских гор, лесные массивы данного вида все в большей степени подвергаются негативному антропогенному воздействию. На многих участках состояние почвенного покрова претерпевает существенные изменения в связи с увеличением рекреационной нагрузки и, как следствие, усилением эрозионных процессов, которые оказывают непосредственное влияние на изначальные природные характеристики эдафотопы. Изучение эдафических условий в биоценозах *P. brutia* var. *pityusa*, анализ их динамики следует отнести к важнейшим базовым элементам оценки текущего состояния и тенденций развития ее насаждений в Горном Крыму.

Цель исследований – изучение свойств почв Горного Крыма в естественных насаждениях *P. brutia* var. *pityusa*.

Объекты и методы исследования

Исследования проводили в лесных насаждениях *P. brutia* var. *pityusa* прибрежной зоны южного макросклона Главной гряды Крымских гор в 2022 г. С использованием гипсометрических профилей на участках проведения исследований анализировали таксационные характеристики насаждений, применяя метод сплошного перечета на пробных площадях размером 50х50 м (Анучин, 1982). В западной части южного макросклона Главной гряды Крымских гор в урочище Аязьма на мысе Айя пробные площади заложены в центральной части лесного массива на высотах 50, 180 и 290 м над ур.м., в урочище Батилиман – на высотах 50 и 120 м над ур.м. В восточной части макросклона на г. Караул-Оба пробные площади приурочены к высотам 40, 70 и 120 м над ур.м., в урочище Новый Свет – 50, 100 и 130 м над ур.м. Все пробные площади расположены на склонах юго-восточной экспозиции с крутизной 10°–15° (рис.).

Отбор проб почв для физико-химических исследований проводили в разрезах полойно – 0...10, 10...20, 20...30, 30...40 и 40...50 см. При полевых и лабораторных исследованиях определяли гранулометрический состав – пипеточным методом (ГОСТ 12536–2014), pH – потенциометрически по ГОСТ 26483–85, гумус – методом Тюрина в модификации ЦИНАО (ГОСТ 26213–91), CaCO₃ – газовакуметрическим методом. Влажность почвы определяли методом горячей сушки (Вадюнина, Корчагина, 1986). Согласно классификации почв России (Шишов и др., 2004), почвы на пробных площадках относятся к отделу структурно-метаморфические почвы, типу – коричневые почвы. Характеристика

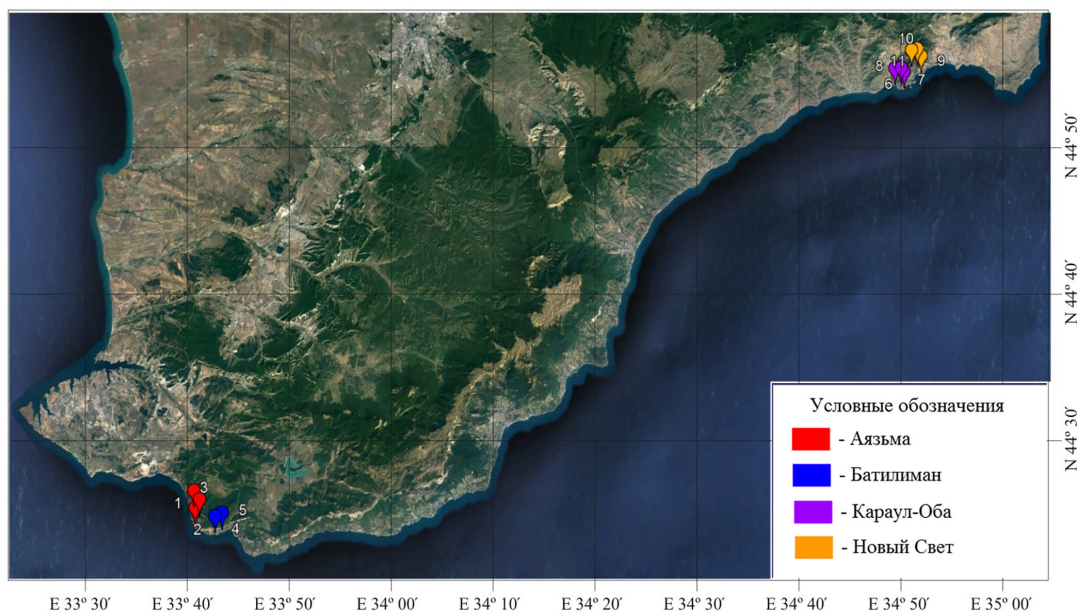


Рис. Схема размещения пробных площадей в экотопах *P. brutia* var. *pityusa* Горного Крыма

Fig. Layout of growth plots in the ecotopes of *P. brutia* var. *pityusa* in the Crimean Mountains

погодных условий в районах проведения исследований дана на основе данных метеорологических станций г. Севастополь и г. Феодосия. Гидротермический коэффициент (ГТК) определяли по методу Г. Т. Селянинова (1937). Статистическая обработка результатов наблюдений выполнена с использованием методов биометрии (Лакин, 1990).

Результаты исследования и обсуждение

На Крымском полуострове условия почвообразования имеют некоторую специфику, которая определяется его расположением на границе умеренного и субтропического климатических поясов, а также на стыке Скифской платформы и геосинклинальной зоны. Значительные площади в Горном Крыму занимают бурые горные лесные почвы. Они сформировались под буковыми, дубовыми, смешанными и сосновыми лесами на верхних, средних и северных нижних частях склонов Главной гряды. Почвообразующей породой

служат продукты выветривания известняков, глинистых сланцев, песчаников, конгломератов. К этой группе отнесены и бурые остепненные почвы, распространенные в лесостепном поясе Горного Крыма. Содержание гумуса в бурых лесных почвах составляет под дубовыми и сосновыми лесами – 6–8 %, под буковыми лесами с травяным покровом – 10–16 %, под низкорослыми лесами – 3–4 %. На открытых склонах размещены маломощные почвы с меньшими запасами питательных веществ (Опанасенко, 2018).

Орографические и климатические различия отдельных частей Главной гряды Крымских гор обуславливают разнообразие почвенно-растительного покрова. В западной части гряды распространены бурые горно-лесные почвы, горно-коричневые почвы сухих лесов и кустарников и аллювиальные луговые почвы речных долин и балок (Мощенко и др., 2020; Колесников и др., 2021). На склонах Главной гряды, под широколи-

ственными и сосновыми лесами преобладают бурые горно-лесные почвы, формирующиеся на продуктах выветривания глинистых сланцев, конгломератов и юрских известняков. На безлесных плоскогорных вершинах эти почвы сменяются горно-луговыми черноземовидными почвами. В нижней части южных склонов гряды бурые горно-лесные почвы переходят в красно-бурые и коричневые почвы сухих лесов и кустарников, свойственные области сухого Средиземноморья. Коричневые почвы встречаются также в нижней части гор на юго-западе полуострова (Судницын, 2014; Вернигорова и др., 2018).

Почва в насаждениях мыса Айя характеризуется зернистой структурой, тёмно-коричневым цветом. Почва рыхлая, сильно-скелетная (40–50 % скелета от объёма), скелет представлен известняком и конгломератами. В зависимости от содержания карбонатов в почве они изменяются от среднекарбонатных до сильнокарбонатных. Реакция почвенной среды – щелочная. Гранулометрический состав по почвенному профилю неоднородный, преобладают тяжёлый суглинок и лёгкая глина, в которых доля ила составляет 26 % (табл. 1).

В нижнем поясе (прибрежный пояс) на высоте 50 м над ур.м. средний показатель pH верхнего слоя почвы составляет $8,0 \pm 0,7$ при содержании CaCO_3 $17,5 \pm 1,4$ %. Вниз по профилю щелочная реакция возрастает с увеличением содержания карбонатов. Наиболее высокое количество гумуса присутствует в верхнем слое профиля – в среднем $4,0 \pm 0,4$ %, наименьшее ($1,7 \pm 0,1$ %) – в нижнем, средний показатель по почвенному профилю составляет $2,6 \pm 1,9$ %. Содержание фракции физической глины (диаметр частиц меньше 0,01 мм) варьирует в пределах 50–57 %, при среднем значении по почвенному профилю $53,1 \pm 4,2$ %, для илистой фракции данные по-

казатели имеют соответственно следующие значения – 28–32 % и $30,3 \pm 2,7$ %. Гранулометрический состав определяет физические свойства почв: порозность, влагоемкость, водопроницаемость, водоподъемную способность, воздушный и тепловой режимы и др. Для частиц с диаметром больше 0,01 мм характерна высокая водопроницаемость, слабая водоудерживающая и водоподъемная способность. Пылеватая фракция (диаметр частиц меньше 0,01 мм, но больше 0,001 мм) впитывает влагу медленно, но хорошо ее удерживает и обладает повышенной водоподъемной способностью. Частицы илистой фракции (диаметр меньше 0,001 мм) имеют плохую водопроницаемость, они способны удерживать большое количество влаги (Качинский, 1958).

В среднем поясе на высоте 180 м над ур.м. содержание гумуса по горизонтам почвенного профиля существенно выше в сравнении с аналогичными показателями почвенного разреза, заложенного в прибрежной зоне. Здесь также заметно выше таксационные характеристики насаждений по высоте и диаметру стволов деревьев (табл. 2). Очевидно, в урочище Аязьма в центральной части лесного массива *P. brutia* var. *pityusa* интенсификация процессов формирования и накопления питательных веществ в почве связана с повышением продуктивности насаждений и стабилизацией биогеоценологических условий по уровню водной и ветровой эрозии, подвижками грунта и оползневых процессов. При сравнительно близких показателях pH здесь существенно увеличивается содержание CaCO_3 в почве, средняя величина составила 48,1 %, что более чем в 2 раза выше в сравнении с экотопами нижнего пояса. Очевидно, это обусловлено присутствием в почве фрагментов известняка юрского периода, который характеризуется высокой растворимостью (Lisetskii, Ergina, 2010). Коли-

Таблица 1. Характеристика горно-лесных почв в экотопах западной территории произрастания *P. brutia* var. *pityusa* в Горном КрымуTable 1. Characterization of mountain forest soils in the ecotopes of the western range of *P. brutia* var. *pityusa* in the Crimean Mountains

Местоположение, высота над ур.м., м	Глубина, см	pH	CaCO ₃ , %	Гумус, %	Гранулометрический состав, %	
					Физическая глина	Илистая фракция
					M±SE (n=5)	
Аязьма 50	0–10	8,0±0,7	17,5±1,4	4,0±0,4	50,6±3,6	30,4±2,5
	10–20	8,2±0,8	15,0±1,2	3,2±0,3	54,4±3,8	31,3±2,7
	20–30	8,3±0,8	20,0±1,8	2,4±0,2	56,8±3,9	30,9±2,4
	30–40	8,3±0,8	23,7±2,1	1,9±0,2	53,2±3,7	30,2±2,4
	40–50	8,3±0,7	26,2±2,4	1,7±0,1	50,6±3,5	28,8±2,2
Аязьма 180	0–10	8,1±0,7	48,9±3,5	5,7±0,4	55,8±3,9	25,1±2,2
	10–20	8,1±0,8	46,6±3,3	4,2±0,3	50,8±3,2	23,7±2,0
	20–30	8,2±0,7	45,8±3,1	3,3±0,2	60,7±4,0	28,2±2,4
	30–40	8,3±0,7	47,4±3,2	2,6±0,2	52,4±3,9	25,2±2,2
	40–50	8,3±0,6	51,5±3,9	2,8±0,2	47,4±3,5	22,2±1,8
Аязьма 290	0–10	7,9±0,6	14,2±1,0	5,1±0,3	55,4±3,9	23,1±1,9
	10–20	8,0±0,7	12,2±0,9	3,3±0,2	61,0±4,3	25,4±2,1
	20–30	8,1±0,6	11,6±0,9	2,4±0,2	63,0±4,4	29,5±2,6
	30–40	8,1±0,6	10,7±0,8	2,4±0,2	60,0±3,9	29,7±2,7
	40–50	8,1±0,6	10,8±0,8	2,1±0,1	59,9±3,7	29,5±2,5
Батилиман 50	0–10	7,7±0,6	38,9±2,7	6,8±0,5	42,6±2,3	14,6±1,1
	10–20	7,7±0,7	37,1±2,8	4,2±0,4	49,8±2,7	18,2±1,4
	20–30	7,8±0,6	40,0±2,9	3,2±0,3	51,0±3,0	20,2±1,6
	30–40	8,0±0,7	38,7±2,6	2,8±0,2	61,7±4,4	25,0±1,8
	40–50	7,9±0,6	39,8±2,5	2,3±0,2	56,9±3,7	24,2±1,7
Батилиман 120	0–10	8,0±0,8	82,0±7,9	8,6±0,8	25,8±2,3	12,3±1,0
	10–20	8,0±0,7	81,6±7,8	7,5±0,7	28,7±2,5	10,2±0,9
	20–30	8,0±0,7	90,3±8,1	6,9±0,6	39,4±3,3	14,6±1,2
	30–40	8,1±0,8	94,5±8,3	3,7±0,3	39,3±3,5	17,5±1,5
	40–50	8,1±0,8	98,3±8,5	4,9±0,4	35,5±3,1	16,1±1,4

Примечание: Здесь и далее: M – среднее значение; SE – ошибка среднего значения

чество частиц физической глины изменяется незначительно, однако заметно снижается содержание илистой фракции в сравнении с почвой, характеризующей насаждение *P. brutia* var. *pityusa* на высоте 50 м над ур.м.

В древостоях, занимающих верхний пояс Главной гряды, содержание гумуса в почве

несколько снижается, как в целом, так и по отдельным почвенным слоям, средний показатель по профилю составил 3,1±0,3 %, что на 0,6 % меньше аналогичной характеристики для изучаемого массива лесов, расположенного в среднем поясе. На высоте 290 м над ур.м. на фоне заметного снижения карбонатности

почвы наблюдается некоторое уменьшение ее pH. В экотопах данного пояса содержание физической глины в почве увеличивается (средняя величина – $59,9 \pm 4,6$ %), количество частиц илистой фракции имеет промежуточные значения в сравнении с показателями почв под пологом древостоев *P. brutia* var. *pityusa* урочища Аязьма в нижнем и среднем поясах Главной гряды. Анализ специфики гранулометрического состава почв в насаждениях *P. brutia* var. *pityusa* свидетельствует о том, что в нижнем поясе почва отличается высокой водоудерживающей способностью. Это обеспечивает эффективное накопление влаги в холодный период года, когда в Южном Крыму выпадает наибольшая часть годовых атмосферных осадков. В летний период повышенное содержание в почве частиц илистой фракции снижает интенсивность иссушения почвы, в то время как в среднем поясе в результате его уменьшения происходит более активная потеря влаги почвенной среды. При этом следует отметить, что осадки теплового периода года в большей степени влияют

на динамику водного баланса экотопов урочища Аязьма с массивами *P. brutia* var. *pityusa*, расположенными в среднем поясе Главной гряды, по сравнению с нижним, за счет увеличения влагопроницаемости верхних слоев почвы. В верхнем поясе в целом наблюдается повышение эффективности поступления влаги и ее удержания в почвенной среде (табл. 3).

Насаждения *P. brutia* var. *pityusa* в урочище Батилиман претерпели меньшие изменения в течение последних десятилетий в плане ухудшения состояния и трансформации условий произрастания. Это обусловлено тем, что основные процессы деградации древостоев в данном урочище и на примыкающих территориях бухты Ласпи произошли значительно раньше. Последние единичные деревья *P. brutia* var. *pityusa* в прибрежной части бухты Ласпи были отмечены в конце XIX в. В настоящее время в урочище Батилиман *P. brutia* var. *pityusa* формирует сильно изреженные низкопродуктивные насаждения. Почва под их пологом элювиально-делювиальная на известняках, уплотнена, слабоскелетная.

Таблица 2. Таксационные характеристики насаждений *P. brutia* var. *pityusa* Горного Крыма

Table 2. Evaluation of forest stands of *P. brutia* var. *pityusa* of the Crimean Mountains

Месторасположение	Высота над уровнем моря, м	Высота, м	Диаметр ствола, см	Возраст, лет	Полнота
		M±SE (n>200)			
Аязьма	50	6,9 ± 0,05	19,3 ± 0,2	93 ± 0,4	0,5
	180	8,2 ± 0,10	25,3 ± 0,6	116 ± 0,3	0,5
	290	6,7 ± 0,02	15,3 ± 0,1	87 ± 0,5	0,4
Батилиман	50	6,6 ± 0,09	18,5 ± 0,3	90 ± 0,4	0,5
	120	6,8 ± 0,04	19,2 ± 0,6	93 ± 0,3	0,4
Караул-Оба	40	4,7 ± 0,05	16,2 ± 0,3	81 ± 0,5	0,4
	70	4,5 ± 0,04	20,9 ± 0,4	100 ± 0,4	0,4
	120	5,2 ± 0,07	18,6 ± 0,4	90 ± 0,6	0,3
Новый Свет	50	6,5 ± 0,06	22,6 ± 0,5	106 ± 0,5	0,5
	100	6,4 ± 0,09	23,1 ± 0,8	108 ± 0,4	0,5
	130	6,0 ± 0,07	28,0 ± 0,7	125 ± 0,4	0,4

Таблица 3. Влажность почвы (% , $M \pm SE$, $n=5$) в насаждениях *P. brutia* var. *pityusa* Горного Крыма (2022 г., июль)Table 3. Soil moisture (% , $M \pm SE$, $n=5$) in *P. brutia* var. *pityusa* tree stands of the Crimean Mountains (2022, July)

Месторасположение, высота над ур.м., м	Глубина почвенного слоя, см				
	0–10	10–20	20–30	30–40	40–50
Аязьма					
50	11,2 $\pm$ 0,7	10,8 $\pm$ 0,6	9,9 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 0,9	9,9 $\pm$ 0,9
180	9,1 $\pm$ 0,7	7,7 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,8	7,3 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,7
290	11,5 $\pm$ 1,1	12,7 $\pm$ 1,8	11,9 $\pm$ 1,0	11,2 $\pm$ 1,0	10,8 $\pm$ 1,1
Батилиман					
50	10,3 $\pm$ 1,0	9,9 $\pm$ 1,1	9,1 $\pm$ 0,9	8,9 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 0,9
120	8,0 $\pm$ 0,7	8,6 $\pm$ 0,7	7,8 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,7
Караул-Оба					
40	4,7 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,5
70	7,5 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,7	9,7 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 0,6
120	6,3 $\pm$ 0,6	6,5 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,7	7,9 $\pm$ 0,8	6,2 $\pm$ 0,6
Новый Свет					
50	6,7 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,7	6,6 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,5
100	9,5 $\pm$ 0,8	9,4 $\pm$ 0,9	8,7 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,6
130	5,8 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,5

По гранулометрическому составу – неоднородна. В прибрежной зоне верхние слои почвы среднесуглинистые (42,6 $\pm$ 2,3 %), нижние (30...40 см) – тяжелосуглинистые (61,7 $\pm$ 4,4 %), среднее содержание физической глины в профиле – 52,4 $\pm$ 4,3 %. На высоте 50 м над ур.м. содержание илстой фракции увеличивается вниз по профилю почвы от 14,6 % (0...10 см) до 24,2 % (40...50 см). На высоте 120 м над ур.м. содержание глинистых и илистых частиц в почве заметно снижается, средние показатели по почвенному профилю соответственно 33,7 $\pm$ 2,9 % и 14,2 $\pm$ 1,2 %. Таким образом, в урочище Батилиман физические свойства почвы по накоплению и удержанию влаги заметно ухудшаются, особенно в верхнем поясе гряды, в сравнении с экотопами урочища Аязьма.

В урочище Батилиман почва сильнокарбонатная, среднее содержание CaCO_3 по профилю в нижнем поясе гряды составляет

38,9 $\pm$ 2,7 %, верхнем – 89,3 $\pm$ 4,8 %. Реакция почвенной среды щелочная – величина pH варьирует от 7,7 до 8,1, несколько увеличиваясь с глубиной. В древостоях на высоте 50 м над ур.м. содержание гумуса в верхнем слое почвы выше, чем в насаждениях мыса Айя, и составляет 6,8 %. В слое 10...20 см средняя величина данного показателя равна 4,2 $\pm$ 0,4 %, что практически совпадает с количеством гумуса (4,2 $\pm$ 0,3 %) в аналогичном по глубине залегания слое почвы центральной части массива лесов в урочище Аязьма. В урочище Батилиман в почве верхней части склона количество гумуса заметно выше – его среднее содержание по почвенному профилю составило 6,3 $\pm$ 4,7 %. Более высокое содержание гумуса в почве урочища Батилиман – свидетельство того, что в недавнем прошлом на его территории произрастали более продуктивные насаждения, обеспечивавшие достаточно

активное накопление органических веществ в почвенной среде.

В восточной части Горного Крыма на г. Караул-Оба *P. brutia* var. *pityusa* представлена небольшими участками редколесья с низким уровнем видового разнообразия. Данная ситуация наряду с климатическими факторами в значительной степени определяется эдафическими условиями. Почва на склонах г. Караул-Оба слабообразованная, среднесуглинистая, серого цвета, сильноскелетная (>50 %), структура порошистая, рыхлая, интенсивно пронизана корнями растений. Реакция почвенной среды щелочная. По уровню содержания карбонатов (CaCO_3 , 39,1–64,5 %) – сильнокарбонатная (табл. 4). В нижнем поясе произрастания *P. brutia* var. *pityusa* содержание гумуса в верхнем слое почвы крайне низкое – $1,7 \pm 0,1$ %, вниз по профилю оно увеличивается почти в 2 раза и, начиная с глубины 20 см, достаточно стабильно по слоям почвенного профиля. Низкое содержание гумуса в верхнем слое почвы и обратный градиент изменения его концентрации по профилю почвы до глубины 40 см, в сравнении с другими местами произрастания *P. brutia* var. *pityusa* в Горном Крыму, свидетельствует о том, что в прошлом в экотопах прибрежной зоны г. Караул-Оба формирование почвы в достаточной степени обеспечивалось поступлением органических веществ, участвующих в образовании и накоплении гумуса. Однако в какой-то исторический момент интенсивность поступления органического вещества существенно сократилась, при этом произошла активизация эрозионных процессов, что определило снижение плодородия и деградацию верхнего слоя почвы. Данные явления с большой вероятностью могут быть связаны с существованием в прошлом на склонах г. Караул-Оба высокопродуктивных насаждений *P. brutia* var. *pityusa*, которые по не вполне ясным причинам претерпели

значительные изменения и в настоящее время здесь полностью утрачены.

В средней части склонов на высоте 70 м над ур.м. изменение количества гумуса в различных слоях почвенного профиля в целом соответствует закономерностям, наблюдаемым на других территориях произрастания *P. brutia* var. *pityusa* в Горном Крыму: его общее содержание по профилю несколько снижается – среднее значение $2,6 \pm 1,9$ %, что на 0,5 % меньше в сравнении с экотопами других прибрежных участков. Наиболее низкое содержание гумуса в почве древостоев *P. brutia* var. *pityusa* на г. Караул-Оба отмечено на высоте 120 м над ур.м., средний показатель по профилю – $1,3 \pm 1,1$ %, что, очевидно, связано со снижением продуктивности насаждений и активизацией эрозионных процессов.

В пределах гипсометрического профиля на г. Караул-Оба гранулометрический состав почвы характеризуется достаточно невысоким по величине и уровню варьирования доли фракций физической глины и илистых частиц, которые близки к показателям экотопов верхней части склонов урочища Батилиман. Очевидно, это, как и в урочище Батилиман, связано с масштабностью деструктивных процессов, определивших деградацию лесных биоценозов на г. Караул-Оба, одним из следствий которой является глубокая трансформация почвенных условий. Снижение влагонакопления и влагоудержания в почвенной среде в значительной степени лимитируют возможности успешного роста и развития *P. brutia* var. *pityusa* на данных территориях.

В урочище Новый Свет состояние насаждений *P. brutia* var. *pityusa* существенно лучше по сравнению с г. Караул-Оба, хотя они практически вплотную примыкают к селитебным территориям, которые в недавнем прошлом являлись частью природного массива

Таблица 4. Характеристика горно-лесных почв в экотопах восточной территории произрастания *P. brutia* var. *pityusa* в Горном КрымуTable 4. Characterization of mountain forest soils in the ecotopes of the eastern range of *P. brutia* var. *pityusa* in the Crimean Mountains

Местоположение, высота над ур.м., м	Глубина, см	pH	CaCO ₃ , %	Гумус, %	Гранулометрический состав, %	
					Физическая глина	Илистая фракция
					M±SE (n=5)	
Караул-Оба 40	0–10	8,3±0,8	57,1±4,3	1,7±0,1	40,6±3,2	15,8±1,3
	10–20	8,4±0,8	49,3±4,5	3,1±0,2	49,4±3,6	19,6±1,5
	20–30	8,2±0,7	55,7±4,2	3,6±0,3	31,5±2,3	14,0±1,2
	30–40	8,2±0,7	54,8±3,9	3,8±0,3	33,1±2,8	14,2±1,3
	40–50	8,2±0,7	58,1±4,2	3,4±0,3	41,2±3,3	15,7±1,4
Караул-Оба 70	0–10	8,1±0,7	59,9±4,3	3,4±0,3	36,4±3,0	13,9±1,1
	10–20	8,3±0,8	56,2±4,0	2,4±0,2	35,8±2,9	15,2±1,3
	20–30	8,3±0,8	61,2±4,9	2,4±0,2	36,7±3,1	16,5±1,5
	30–40	8,3±0,7	62,5±5,1	2,5±0,2	44,2±3,5	20,6±1,8
	40–50	8,4±0,8	64,5±5,3	2,1±0,2	41,3±3,3	21,2±1,9
Караул-Оба 120	0–10	8,3±0,8	44,1±3,5	1,5±0,1	33,4±2,8	15,7±1,2
	10–20	8,4±0,9	47,5±3,6	1,4±0,1	40,2±3,0	18,1±1,6
	20–30	8,3±0,8	39,1±3,1	1,3±0,1	40,2±3,2	17,7±1,4
	30–40	8,5±0,9	42,0±3,3	1,2±0,1	35,9±2,9	15,4±1,2
	40–50	8,5±0,9	39,9±3,4	1,0±0,1	34,4±2,8	15,8±1,2
Новый Свет 50	0–10	7,8±0,6	15,6±0,9	5,1±0,4	48,6±2,4	24,0±1,9
	10–20	8,0±0,7	16,7±1,2	4,2±0,3	47,0±2,3	22,5±1,8
	20–30	8,1±0,7	25,9±1,8	2,6±0,2	48,8±2,5	21,8±1,7
	30–40	8,1±0,6	21,2±1,7	2,5±0,2	51,7±3,3	22,3±1,6
	40–50	8,2±0,7	13,1±0,9	1,7±0,1	53,2±3,4	22,6±1,9
Новый Свет 100	0–10	7,9±0,7	14,6±1,1	2,3±0,2	49,2±3,1	23,4±2,1
	10–20	7,7±0,7	18,5±1,3	1,8±0,2	61,8±4,3	30,5±2,5
	20–30	7,6±0,8	21,5±1,5	1,2±0,1	69,4±4,9	31,4±2,7
	30–40	7,5±0,7	22,8±1,8	1,5±0,1	66,2±4,7	31,1±2,6
	40–50	7,6±0,8	21,1±1,6	1,2±0,1	62,4±4,4	34,7±2,8
Новый Свет 130	0–10	7,9±0,7	24,6±2,0	3,7±0,3	33,7±2,7	18,1±1,3
	10–20	8,0±0,7	16,2±1,5	2,8±0,3	34,2±2,8	18,2±1,4
	20–30	8,1±0,8	17,9±1,6	2,6±0,2	37,9±3,5	19,0±1,7
	30–40	8,3±0,8	21,7±1,9	2,6±0,2	32,4±3,0	17,5±1,5
	40–50	8,3±0,8	24,2±2,1	2,8±0,3	33,4±3,1	19,5±1,8

P. brutia var. *pityusa*. Почва в урочище Новый Свет слабо мощная, бурого цвета, уплотнённая, тяжелосуглинистая, достаточно обеспечена илистыми частицами, слабо пронизана

корнями растений. В почвенном разрезе чётко выражен слой A0 (мощность до 6 см) в виде полуразложившегося опада хвои. Структура почвы порошисто-зернистая, глубже 30 см

переходит в мелкоореховатую. На глубине ниже 50 см начинает преобладать подстилаящая материнская порода, представленная глинистым сланцем и конгломератами. Реакция почвенной среды щелочная. Содержание карбонатов в почве, по сравнению с другими местами произрастания *P. brutia* var. *pityusa* в Горном Крыму, невысокое: по этому показателю почва относится к среднекарбонатной. По содержанию гумуса почвы на высоте 50 и 130 м над ур.м. близки к показателям почв, формирующихся под пологом *P. brutia* var. *pityusa* в нижних и средних поясах урочища Аязьма. Однако в урочище Новый Свет почва на высоте 100 м над ур.м. близка по этому параметру к почвенным условиям верхнего пояса г. Караул-Оба – крайне низкое содержание гумуса по всему почвенному профилю при среднем значении – $1,6 \pm 1,2$ %.

Наиболее вероятной причиной низкого содержания гумуса в почве данного участка может являться активная заготовка древесины *P. brutia* var. *pityusa* в недавнем прошлом. Снижение продуктивности лесного биоценоза и последующее развитие деструктивных процессов оказали негативное воздействие на генезис почвы на этой территории. Следует также отметить, что в настоящее время центральная часть массива лесов *P. brutia* var. *pityusa* в урочище Новый Свет наиболее посещаемая, здесь плотная, хаотически сформированная дорожно-тропиночная сеть, часто встречаются места от кострищ «пикников выходного дня». Безусловно, это оказывает негативное воздействие не только на древесной, но и состояние почвы. Ее гранулометрический состав отражает физические свойства, характеризующиеся высоким уровнем накопления и удержания влаги. На высоте 50 м над ур.м. эта способность несколько снижается. В верхнем поясе почва по этим параметрам близка к показателям почвы г. Караул-

Оба. Таким образом, наряду с проблемами неорганизованной рекреации, деструктивное воздействие которой в наибольшей степени проявляется в центральной части массива лесов *P. brutia* var. *pityusa* в урочище Новый Свет (в среднем высотном поясе), снижение содержания доли глинистых и илистых частиц в почве может также негативно воздействовать на состояние древостоев в экотопах верхнего пояса.

Анализ специфики почвенных показателей свидетельствует о том, что в западной части природного ареала *P. brutia* var. *pityusa* в Горном Крыму почвы по содержанию гумуса и гранулометрическому составу более благоприятны для данного вида в сравнении с восточной. На мысе Айя и в урочище Батилиман среднее содержание гумуса по почвенным профилям составило 3,9 %, среднее содержание физической глины – 50,1 %, илистых частиц – 23,4 %. В восточной части распространения насаждений *P. brutia* var. *pityusa* в урочище Новый Свет среднее содержание гумуса в слое почвы 0...50 см – 2,6 %, среднее содержание физической глины – 48,7 %, ила – 23,8 %. Наиболее пессимальные условия по содержанию питательных веществ и гранулометрическому составу почв наблюдаются в экотопах г. Караул-Оба, где среднее содержание гумуса в полуметровом слое почвы составляет 2,3 %, физической глины – 38,3 %, ила – 16,7 %. По данным метеостанций г. Севастополь и г. Феодосия, среднегодовое количество атмосферных осадков в районе западной и восточной части природного ареала *P. brutia* var. *pityusa* в Горном Крыму составляет 393 мм и 495 мм соответственно. При этом ГТК Селянинова для теплого периода года имеет примерно одинаковые значения: для Севастопольского района – 1,079, для Феодосийского – 1,028. Несмотря на более высокий уровень годовых атмосферных осад-

ков в Феодосийском районе, низкий уровень влагонакопления и невысокое содержание гумуса в почве являются наиболее важными факторами, влияющими на рост и развитие *P. brutia* var. *pityusa* в экотопах восточной части ее распространения в Горном Крыму.

Заключение

В западной части природного ареала *P. brutia* var. *pityusa* в Горном Крыму наблюдаются наиболее благоприятные условия для ее произрастания. На мысе Айя и в урочище Батилиман среднее содержание гумуса в почве составило 3,9 %, среднее содержание физической глины – 50,1 %, илистых частиц – 23,4 %. Относительное увеличение гумуса в почве урочища Батилиман свидетельствует о том, что в недавнем прошлом здесь произрастали более продуктивные насаждения.

Наиболее пессимальные условия по содержанию питательных веществ и гранулометрическому составу почв отмечены в экотопах г. Караул-Оба, где среднее значение гумуса в полуметровом слое почвы составляет 2,3 %, физической глины – 38,3 %, ила – 16,7 %. Низкий уровень влагонакопления и невысокое содержание гумуса в почве оказывают лимитирующее действие на рост и развитие *P. brutia* var. *pityusa* в экотопах восточной части Горного Крыма. Небольшое количество гумуса в почве в центральной части массива лесов урочища Новый Свет, очевидно, связано с проведением в прошлом активной заготовки древесины *P. brutia* var. *pityusa*. Снижение продуктивности лесного биоценоза и последующее развитие деструктивных процессов оказали негативное воздействие на генезис почвы на данных территориях.

Список литературы / References

Автономов А. Н. (2014) Состав и структура почв склоновых экологических систем экзогенного типа. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 16(1): 35–38 [Avtonomov A. N. (2014) Composition and structure of soil slope ecological systems of exogenous type. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences* [Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk], 16(1): 35–38 (in Russian)]

Анучин Н. П. (1982) *Лесная таксация*. Москва, Лесная промышленность, 512 с. [Anuchin N. P. (1982) *Forest surveying*. Moscow, Lesnaya promyshlennost, 512 p. (in Russian)]

Вадюнина А. Ф., Корчагина З. А. (1986) *Методы исследования физических свойств почв*. Москва, Агропромиздат, 416 с. [Vadyunina A. F., Korchagina Z. A. (1986) *Methods for studying the physical properties of soils* Moscow, Agropromizdat, 416 p. (in Russian)]

Вернигорова Н. А., Кузина А. А., Моспаненко А. Ф., Казеев К. Ш., Акименко Ю. В., Колесников С. И. (2018) Оценка устойчивости коричневых карбонатных почв Крыма к загрязнению тяжелыми металлами и нефтью. *Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия*, 4(2): 11–18 [Vernigorova N. A., Kuzina A. A., Mospanenko A. F., Kazeev K. Sh., Akimenko Yu. V., Kolesnikov S. I. (2018) Assessment of resistance of brown carbonate soils of the Crimea to pollution by heavy metals and oil. *Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry* [Uchenye zapiski Krymskogo federalnogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya], 4(2): 11–18 (in Russian)]

Дао Т. Т. Х., Жигунов А. В., Бондаренко А. С. (2019) Влияние орографических факторов и почвенного плодородия на рост плантаций *Manglietia conifera* Blume в провинции Туенкунг Республики Вьетнам. *Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского институ-*

та лесного хозяйства, 1: 54–67 [Dao T. T. H., Zhigunov A. V., Bondarenko A. S. (2019) The effect of orographic factors and soil fertility on the growth of *Manglietia conifera* Blume plantations in Tuyen Quang province of Vietnam. *Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute* [Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaistva], 1: 54–67 (in Russian)]

Качинский Н. А. (1958) *Механический и микроагрегатный состав почвы, методы его изучения*. Москва, АН СССР, 192 с. [Kachinsky N. A. (1958) *Mechanical and microaggregate composition of soil, study methods*. Moscow, Academy of Sciences of the USSR, 192 p. (in Russian)]

Кобечинская В. Г., Ярош О. Б., Ивашов А. В., Апостолов В. Л. (2019) Особенности трансформации органического вещества в лесных заповедниках Крыма. *Юг России: экология, развитие*, 14(3): 37–52 [Kobechinskaya V. G., Yarosh O. B., Ivashov A. V., Apostolov V. L. (2019) Features of transformation of organic matter in the forest reserves of the Crimea. *South of Russia: Ecology, Development* [Yug Rossii: ekologiya, razvitie], 14(3): 37–52 (in Russian)]

Колесников С. И., Мощенко Д. И., Кузина А. А., Тер-Мисакянц Т. А., Неведомая Е. Н., Вернигорова Н. А., Казеев К. Ш. (2021) Экологические нормативы содержания тяжелых металлов в бурых лесных почвах Крыма и Кавказа. *Экология и промышленность России*, 25(1): 65–71 [Kolesnikov S. I., Moshchenko D. I., Kuzina A. A., Ter-Misakyants T. A., Nevedomyaya E. N., Vernigorova N. A., Kazeev K. Sh. (2021) Comparative evaluation of the stability of the brown forest soils of Crimea and the Caucasus to pollution with heavy metals. *Ecology and Industry of Russia* [Ekologiya i promyshlennost Rossii], 25(1): 65–71 (in Russian)]

Лакин Г. Ф. (1990) *Биометрия*. Москва, Высшая школа, 352 с. [Lakin G. F. (1990) *Biometrics*. Moscow, Vysshaya shkola, 352 p. (in Russian)]

Мощенко Д. И., Кузина А. А., Колесников С. И., Тер-Мисакянц Т. А., Неведомая Е. Н., Казеев К. Ш. (2020) Биодиагностика устойчивости бурых лесных почв Центрального Кавказа, Западного Кавказа и Республики Крым к загрязнению нефтью. *Экосистемы*, 24: 124–129 [Moshchenko D. I., Kuzina A. A., Kolesnikov S. I., Ter-Misakyants T. A., Nevedomaya E. N., Kazeev K. Sh. (2020) Biodiagnostics of resistance of brown forest soils of the Central Caucasus, Western Caucasus and the Republic of Crimea to oil pollution. *Ecosystems* [Ekosistemy], 24: 124–129 (in Russian)]

Никифоров А. Р. (2018) Биоморфологические особенности облигатных гляреофитов Горного Крыма. *Ботанический журнал*, 103(8): 968–980 [Nikiforov A. R. (2018) Biomorphological features of obligate glareophytes in the mountain Crimea. *Botanical Journal* [Botanicheskii zhurnal], 103(8): 968–980 (in Russian)]

Опанасенко Н. Е. (2018) Освоение скелетных маломощных почв Крыма под сады траншейным способом. *Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия*, 17: 88–92 [Opanasenko N. E. (2018) Development of Crimea skeletal low-power soils by trenches for gardens. *Scientific Works of the North Caucasian Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Winemaking* [Nauchnye trudy Severo-Kavkazskogo federalnogo nauchnogo tsentra sadovodstva, vinogradarstva, vinodeliya], 17: 88–92 (in Russian)]

Плугатарь Ю. В., Коба В. П., Новицкий М. Л., Папельбу В. В., Пшеничников Н. А. (2020) Высотная зональность почвенных условий горных ландшафтов Юго-Восточного Крыма. *Земледелие*, 8: 10–15 [Plugatar Yu. V., Koba V. P., Novitsky M. L., Papelbu V. V., Pshenichnikov N. A. (2020) Altitudinal zonation of soil conditions of mountain landscapes of the South-Eastern Crimea. *Land Use*, 8: 10–15]

(2020) Altitudinal zonality of soil conditions in mountain landscapes of the South-Eastern Crimea. *Agriculture [Zemledeleie]*, 8: 10–15 (in Russian)]

Селянинов Г. Т. (1937) Методика сельскохозяйственной характеристики климата. *Мировой агроклиматический справочник*. Ленинград, Москва, Гидрометеорологическое издательство, с. 5–27 [Selyaninov G. T. (1937) Methods of agricultural characterization of the climate. *World agro-climatic reference book*. Leningrad, Moscow, Gidrometeorologicheskoe izdatelstvo, p. 5–27 (in Russian)]

Сизых А. П. (2021) Антропогенная трансформация растительного покрова в районах переходных зон Юго-Западного Забайкалья. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Науки о Земле*, 36: 88–106 [Sizykh A. P. (2021) Anthropogenic transformation of the vegetation in the areas of environmental contact zones of the South-Western Trans-Baikal. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series «Earth Sciences»* [Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Nauki o Zemle], 36: 88–106 (in Russian)]

Судницын И. И. (2014) Гидрологические свойства и режимы почв Южного берега Крыма. *Вестник Московского университета. Серия 17: Почвоведение*, 4: 21–27 [Sudnitsyn I. I. (2014) Hydrologic properties and dynamics of soils at southern beach of Crimea. *Moscow University Bulletin. Series 17. Soil Science* [Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 17: Pochvovedenie], 4: 21–27 (in Russian)]

Шишов Л. Л., Тонконогов В. Д., Лебедева И. И., Герасимова М. И. (2004) *Классификация и диагностика почв России*. Смоленск, Ойкумена, 341 с. [Shishov L. L., Tonkonogov V. D., Lebedeva I. I., Gerasimova M. I. (2004) *Classification and diagnostics of soils in Russia*. Smolensk, Oikumena, 341 p. (in Russian)]

Kukarskih V. V., Devi N. M., Surkov A. Y., Bubnov M. O., Gorlanova L. A., Ekba Y. A., Hantemirov R. M. (2020) Climatic responses of *Pinus brutia* along the Black Sea coast of Crimea and the Caucasus. *Dendrochronologia*, 64: 125763

Lisetskii F. N., Ergina E. I. (2010) Soil development on the Crimean Peninsula in the Late Holocene. *Eurasian Soil Science*, 43(6): 601–613

Mohammed A. K., Hirnas D. R., Nemes A., Giménez D. (2020) Exogenous and endogenous controls on the development of soil structure. *Geoderma*, 357: 113945

Verrall B., Pickering C. M. (2020) Alpine vegetation in the context of climate change: A global review of past research and future directions. *Science of the Total Environment*, 748: 141344

Xue S., Liu Z., Fan J., Xue R., Guo Y., Chen W., Hartley W., Zhu F. (2022) Insights into variations on dissolved organic matter of bauxite residue during soil-formation processes following 2-year column simulation. *Environmental Pollution*, 292(Part A): 118326

Zhang X., Zhao Q., Sun Q.-Y., Mao B., Zeng D.-H. (2022a) Understory vegetation interacts with nitrogen addition to affect soil phosphorus transformations in a nutrient-poor *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation. *Forest Ecology and Management*, 507: 120026

Zhang B., Zhou M., Zhu B., Xiao Q., Zheng X., Zhang J., Müller C., Butterbach-Bahl K. (2022b) Soil clay minerals: An overlooked mediator of gross N transformations in Regosolic soils of subtropical montane landscapes. *Soil Biology and Biochemistry*, 168: 108612

EDN: LVBAPM

УДК 574.2

Induction of Somatic Embryogenesis in Siberian Dwarf Pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) *in vitro*

Irina S. Sheveleva^{*a},
Tamara I. Golovanova^a and Iraida N. Tretyakova^b

^a*Siberian Federal University*

^b*V.N. Sukachev Institute of Forest SB RAS
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 16.06.2022, received in revised form 18.06.2024, accepted 23.06.2024

Abstract. Induction and proliferation of embryogenic calluses are the key stages in large-scale reproduction of coniferous species by somatic embryogenesis and long-term storage of their embryos. However, there are some issues, such as low reproduction efficiency, loss of embryogenic ability, poor viability. To solve the problems of somatic embryogenesis in the Siberian dwarf pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), we aimed to determine the best cultivation conditions by varying the concentrations and combinations of plant growth regulators in the culture medium for inducing embryogenic calluses at different stages of embryo development. Explant response dependence on the stage of its development and the hormonal composition of the nutrient medium was established and optimal conditions for induction of somatic embryogenesis in Siberian dwarf pine were determined. Zygotic embryos with a length of 1 mm (mature embryo) were shown to be the most promising material for induction of *Pinus pumila* callogenesis (85 %). Embryogenic calluses were formed more actively on the DCR medium with reduced concentrations of plant growth regulators, NAA (1 mg/l) and 6-BAP (0.5 and 1 mg/l). Calluses transplanted to fresh media of the same composition every 14 days maintained their viability and sustained their ability to intensively proliferate throughout the year.

Keywords: *Pinus pumila*, *in vitro*, Siberian dwarf pine, callus, embryogenic cultures, somatic embryogenesis.

Citation: Sheveleva I. S., Golovanova T. I., Tretyakova I. N. Induction of somatic embryogenesis in Siberian dwarf pine (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) *in vitro*. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 148–159. EDN: LVBAPM



© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: irik1996sheveleva15@mail.ru

ORCID: 0000-0002-2029-5163 (Tretyakova I.)

Индукция соматического эмбриогенеза у кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) в культуре *in vitro*

И. С. Шевелева^а, Т. И. Голованова^а, И. Н. Третьякова^б

^аСибирский федеральный университет

^бИнститут леса им. В. Н. Сукачева СО РАН

Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Индукция и пролиферация эмбрионного каллуса являются ключевыми этапами для крупномасштабного размножения путем соматического эмбриогенеза и долгосрочного хранения зародышей хвойных видов. Однако существуют проблемы, такие как низкий отклик эксплантов на индукционных средах, низкая эффективность размножения, слабая жизнеспособность и потеря эмбрионности каллусных культур в процессе культивирования. Для решения проблем соматического эмбриогенеза кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) мы варьировали концентрацию и комбинации регуляторов роста растений в средах для индукции эмбрионного каллуса у зародышей на разных стадиях развития. Нами была установлена зависимость отклика экспланта от стадии его развития, от гормонального состава питательной среды, определены наилучшие условия культивирования эмбрионного каллуса. Было установлено, что зиготические семядольные зародыши длиной 1 мм являются наиболее перспективным материалом для индукции каллусогенеза у *P. pumila* (85 %). Эмбрионный каллус активнее образовывался на среде DCR с пониженной концентрацией регуляторов роста растений NAA (1 мг/л) и 6-BAР (0,5 и 1 мг/л). Пересадки на свежие среды того же состава каждые 14 дней позволяли не только поддерживать жизнеспособность каллусов, но также сохранять их способность к интенсивной пролиферации в течение года.

Ключевые слова: *Pinus pumila*, *in vitro*, кедровый стланик, каллус, эмбрионные культуры, соматический эмбриогенез.

Цитирование: Шевелева И. С. Индукция соматического эмбриогенеза у кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) в культуре *in vitro* / И. С. Шевелева, Т. И. Голованова, И. Н. Третьякова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 148–159. EDN: LVBAPM

Введение

Кедровый стланик (*Pinus pumila* (Pall.) Regel), относящийся к пятихвойным соснам, произрастает на северо-востоке Сибири и занимает обширный ареал от северного Прибайкалья до полуострова Камчатка. Данный вид имеет большое экологическое и хозяйственное значение. Его заросли играют важную фитоценоотическую и ландшафтную

роль. Семена кедрового стланика являются одним из главных пищевых ресурсов для птиц и животных.

Семеношение, генетическая изменчивость и рост потомства *P. pumila* в сравнении его с *Pinus sibirica* в Северном Прибайкалье, дельте Верхней Ангары и Баргузинском заповеднике изучались С.Н. Горошкевичем и его сотрудниками (Васильева, Горошкевич,

2012; Петрова и др., 2007). В процессе развития семян кедрового стланика наблюдаются некоторые потери и снижение семенной продуктивности. Доля полноценных семян с дифференцированным зародышем варьируется в широких пределах (Васильева, Горошкевич, 2012).

Известно, что развитие семян кедрового стланика, так же как и других видов рода *Pinus*, осуществляется в течение двух вегетационных периодов, а зрелые семена имеют недоразвитый зародыш и требуют длительной стратификации (около 4 месяцев), поэтому традиционные методы размножения могут не соответствовать требованиям искусственного лесонасаждения (Song et al., 2020; Li et al., 2020).

Для осуществления крупномасштабной селекции кедрового стланика необходима разработка и применение современных технологий. Одной из таких технологий является метод микроклонального размножения через соматический эмбриогенез (Tret'yakova et al., 2016; Третьякова и др., 2021). Соматический эмбриогенез стал главным способом для вегетативного размножения хвойных, поскольку соматические эмбрионы развиваются как апикальную, так и корневую меристему (Lelu-Walter et al., 2018). Эмбриогенный каллус является основой для регенерации растений в больших масштабах и служит важным материалом для генетической трансформации (Zeng et al., 2007; Yang, Zhang, 2010; Santa-Catarina et al., 2012; Steiner et al., 2016). По этой причине основным шагом для соматического эмбриогенеза является получение достаточного количества каллусных культур высокого качества (Gao et al., 2021). Главными факторами, влияющими на индукцию и пролиферацию эмбриогенного каллуса, являются состав питательной среды, температура, субкультурный цикл и генетический потенциал

экспланта (Song et al., 2020). Для получения индукции, для поддержания (maintaining) и пролиферации эмбриогенного каллуса хвойных растений используются различные комбинации фитогормонов ауксинов и цитокининов (Vondráková et al., 2011; Klimaszewska et al., 2016; Nunes et al., 2018).

Соматический эмбриогенез у кедрового стланика (*P. pumila*) в культуре *in vitro* исследован недостаточно. В эксперименте по инициации соматического эмбриогенеза у кедрового стланика из незрелых эмбрионов (Tret'yakova, Shuvaev, 2015) полученный каллус обладал низкой эмбриогенностью и не мог быть культивирован для дальнейших шагов соматического эмбриогенеза. В настоящей статье представлены данные эксперимента по получению эмбриогенного каллуса у кедрового стланика на средах для индукции соматического эмбриогенеза в культуре зиготических зародышей. В ходе эксперимента решались задачи по выявлению наиболее отзывчивой стадии развития зиготического зародыша и подбор оптимального состава среды, концентрации и комбинации регуляторов роста для получения и пролиферации эмбриогенных культур.

Материалы и методы

В 2020–2021 гг. с 25 деревьев *P. pumila*, произрастающих на севере Иркутской области (Бодайбинский район) (58°12'28" с.ш. 114°38'45" в.д.) и Чукотского автономного округа (66°33'48" с.ш. 164°27'44" в.д.), были собраны образцы – женские шишки (по 10 шт. с каждого дерева), которые до введения в культуру хранились при температуре 4±1 °С в условиях холодильной камеры. Сбор образцов шишек проводили в разные сроки по мере их созревания, с июля (первая и вторая-третья декады) по август (первая декада). Степень зрелости зародыша фиксировали при извле-

чении его из мегагаметофита, определяя стадии развития: стадия инициации семядолей (размер зародыша 0,3 мм), развития семядолей (размер зародыша 0,7 мм) и зрелого зародыша (размер зародыша 1 мм).

До извлечения эксплантов образцы подвергали предобработке. Шишки обрабатывали 5 %-ным раствором гипохлорита натрия около 20 минут, затем промывали дистиллированной водой в течение 10 минут. У семян удаляли семенную чешую, далее извлеченные мегагаметофиты обрабатывали 75 % спиртом в течение 5 минут и три раза дистиллированной водой по 15 минут. Затем в стерильных условиях бокса извлекали зародыши из мегагаметофитов и переносили на питательную среду в колбы по 5 штук в каждую.

Для индукции эмбрионного каллуса из зародышей *P. pumila* использовали базовую среду DCR (Gupta, Durzan, 1985) с различными концентрациями и комбинациями регуляторов роста растений: дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D) / 1-нафталинуksусная кислота (NAA) и 6-бензиладенин (BAP) (табл. 1). Все варианты среды были дополнены мезоинозитом – 100 мг/л, гидролизатом казеина – 500–1000 мг/л, L-глутамином – 500 мг/л, сахарозой – 30 г/л и агаром – 7 г/л. В качестве антиоксиданта применяли аскорбиновую кислоту в концентрации 400 мг/л. Перед автоклавированием pH доводили до 5,8

с помощью NaOH или HCl. Спустя месяц культивирования полученные каллусы переносились на питательные среды для этапа пролиферации. Для пролиферации каллусов использовали те же варианты питательной среды, что и для индукции. Культуры помещали в темноту при температуре 24 ± 1 °C. Субкультивирование на свежие питательные среды, описание культур и регистрацию частоты каллусообразования проводили каждые 14 дней. Первичный отклик (образование первичного каллуса, возникшего на эксплантах) регистрировали через 4 недели после введения в культуру. Частоту каллусообразования рассчитывали по формуле: $A = (n / N) * 100 \%$, где A – частота каллусообразования, n – количество эксплантов, давших каллус, N – общее число эксплантов. Для проведения цитологического анализа полученных клеточных линий готовили давленные микропрепараты. Образцы каллусов фиксировали каждые две недели. Кусочки ткани размещали на предметном стекле и окрашивали в капле 2 %-ного водного раствора сафранина в течение 1–2 минут. Далее добавляли глицерин и фиксировали препарат покровным стеклом, излишки красителя удаляли фильтровальной бумагой. Приготовленные микропрепараты просматривали под микроскопом МИК-МЕД-6 ЛОМО (Санкт-Петербург, Россия) с видеонасадкой DSM510. Отмечали мор-

Таблица 1. Варианты содержания регуляторов роста растений в питательной среде

Table 1. Plant growth regulator contents in nutrient media

Питательная среда	Регуляторы роста растений, мг/л		
	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D)	1-нафталинуksусная кислота (NAA)	6-бензиладенин (BAP)
DCR 1	2	-	1
DCR 2	-	2	1
DCR 3	-	1	1
DCR 4	-	1	0,5

фологические типы клеток. Размеры клеток определяли при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в мкм. Эмбриогенность каллусов устанавливали по наличию в них эмбриогенных структур. Известно, что эмбриогенные каллусы имеют рыхлую структуру, молочный прозрачный цвет, способны к активному образованию эмбриогенной массы, быстрому росту. Ранее проведенные исследования показали, что в процессе формирования эмбриогенных каллусов у хвойных клетки эксплантов, подвергшихся влиянию регуляторов роста, удлинялись и в дальнейшем претерпевали асимметричное деление и формировали эмбриональные инициалы и эмбриональные трубки. Из инициальных клеток образовывались глобулы соматических зародышей, а из эмбриональных трубок формировались сложные вытянутые структуры с множественными перегородками. Каждая глобула окружалась множественными эмбриональными трубками. Формировалась эмбриональная масса, состоящая из глобул соматических зародышей и эмбриогенных трубок – суспензоров. Эмбриональные глобулы подвергались кливажу. В единичных каллусах возникали торпедообразные соматические зародыши (Belorussova, Tret'yakova, 2008; Третьякова, Ижболдина 2009).

Результаты

Как показали исследования, на индукцию образования каллуса значительное влияние оказывала стадия развития экспланта – зиготического зародыша, которая зависела от срока сбора семян (рис. 1). Так, у зародышей на стадии инициации семядолей (размер 0,3 мм), имеющих очень длинный суспензор (сбор с 1 по 10 июля, рис. 1А), образование каллуса не происходило. Образование каллуса наблюдалось у зародышей

из семян, собранных с 15 по 23 июля (в 40 % случаев). В этот период зародыши достигали размера 0,7 мм, находились на стадии развития семядолей и были дифференцированы по продольной оси на две апикальные меристемы (рис. 1В). Наибольшая частота каллусообразования (85 %) отмечена при введении в культуру *in vitro* семядольных зародышей размером около 1 мм (дата сбора 30.07–7.08) (рис. 1С).

Образование и пролиферация каллусной массы зависела от концентрации регуляторов роста растений в питательных средах. На среде DCR 1 образование каллуса наблюдалось только у 15 % эксплантов, на среде DCR 2 частота образования каллуса была около 40 %, на средах DCR 3 и DCR 4 – 80 % и 87 % соответственно (табл. 2).

Эмбриогенный каллус образовывался только на средах DCR 3 и DCR 4. Полученный каллус отличался активным ростом, был прозрачного цвета, имел рыхлую структуру и сохранял эмбриогенные характеристики (табл. 2, рис. 2А) в течение 6 месяцев. На средах DCR 1 и DCR 2 эмбриогенность каллуса отсутствовала (табл. 2). Каллус, образованный на среде DCR 2 (табл. 2), быстро пролиферировал, однако через 60 дней приобретал бурый цвет и деградировал (рис. 2В). После удаления некротирующих участков каллус приобретал плотную структуру, характеризовался медленным ростом и постепенно деградировал (табл. 2). На среде DCR 1 каллус имел низкий уровень пролиферации, приобретал окраску бурого цвета и быстро деградировал (табл. 2, рис. 2С).

Цитологический анализ показал, что каллусные культуры, полученные на питательных средах с различным составом регуляторов роста растений, состояли из клеток разных морфологических типов. В плотных каллусах просматривались изодиаметриче-

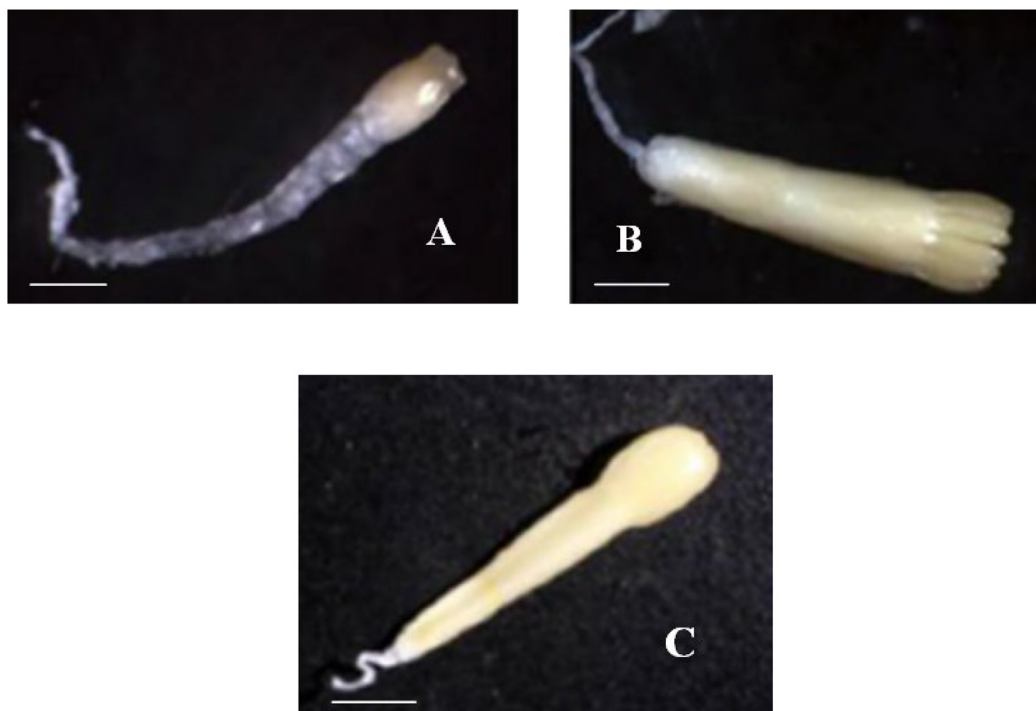


Рис. 1. Зиготические зародыши *Pinus pumila*, собранные в разные даты: А – зародыш на стадии инициации семядолей, длина 0,3 мм, дата сбора 1.07–10.07; В – зародыш на стадии развития семядолей, длина 0,7 мм, дата сбора 15.07–23.07; С – семядольный зародыш, длина 1 мм, дата сбора 30.07–7.08. Масштаб 200 мкм

Fig. 1. Zygotic embryos of *Pinus pumila* collected between different days: А – 0.3 mm long embryo (collected 1.07–10.07); В – 0.7 mm long embryo (collected 15.07–23.07); С – 1 mm long embryo (collected 30.07–7.08). Bar lengths correspond to 200 μ m

Таблица 2. Индукция, пролиферация и эмбриогенность каллусных культур *Pinus pumila*

Table 2. Induction, proliferation and embryogenic yield of *Pinus pumila* callus cultures

Питательная среда	Дата введения в культуру <i>in vitro</i>	Число эксплантов, введенных в культуру (шт.)	Первичный отклик (%)	Сохранность каллусов через 6 мес. культивирования (%)	Частота формирования эмбриогенных культур (%)
DCR 1	17.08–30.08	200	15	0	0
DCR 2	17.08–30.08	200	40	15	0
DCR 3	17.08–30.08	200	80	35	1
DCR 4	17.08–30.08	200	87	50	2

ские клетки диаметром 100 ± 3 мкм (рис. 3А). Рыхлые каллусы состояли в основном из прозенхимных клеток, достигающих в длину 300 ± 3 мкм (рис. 3В), однородных, без каких-либо признаков дифференциации. Далее начиналось активное удлинение этих клеток,

они становились похожи на эмбриональные трубки первичного суспензора зиготического зародыша (рис. 3В). Эти клетки подвергались асимметричному делению и образовывали две клетки: одну маленькую – эмбриональную, другую длинную – эмбриональную

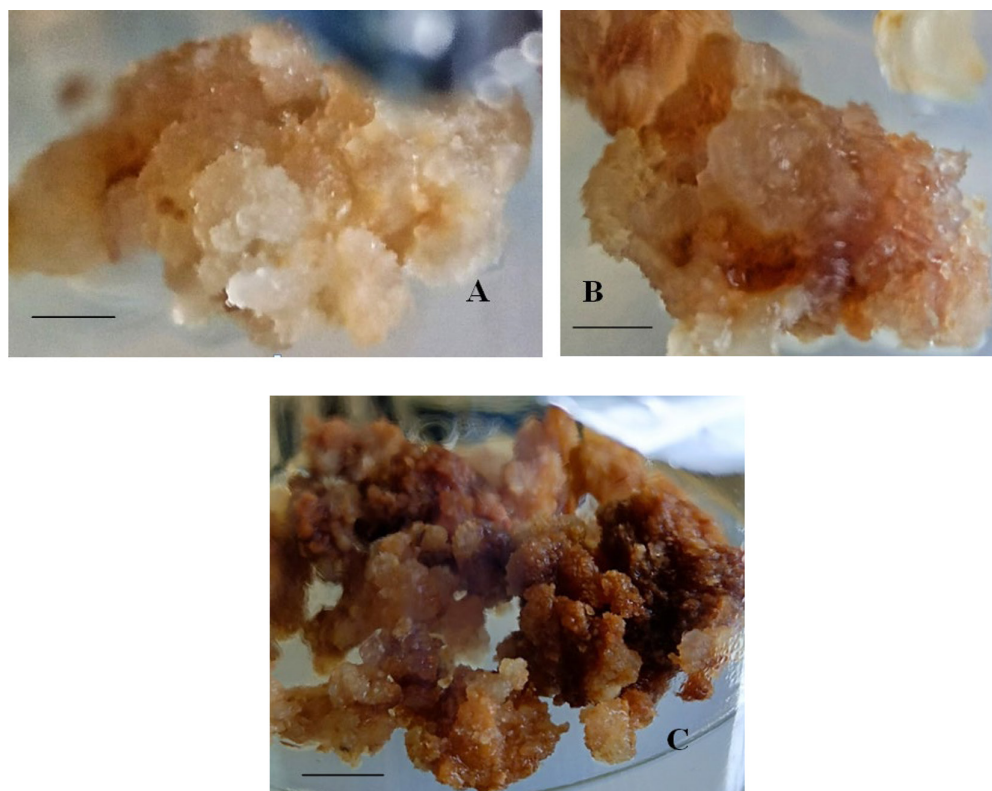


Рис. 2. Каллусы *Pinus pumila* на средах с различными концентрациями и комбинациями регуляторов роста растений: А – на среде DCR 4; В – на среде DCR 2; С – на среде DCR 1. Масштаб 1 см

Fig. 2. *Pinus pumila* calluses on media with various combinations of plant growth regulators: А – DCR 4 medium; В – DCR 2 medium; С – DCR 1 medium. Bar lengths correspond to 1 cm

трубку. Оба типа клеток активно делились, формируя эмбриональные глобулы (рис. 3С), которые окружены длинными клетками. К концу инициации эмбриогенный каллус представлял собой эмбрионально– суспензорную массу, состоящую из эмбриональных глобул и трубок.

Обсуждение

Индукция соматического эмбриогенеза была описана у некоторых пятихвойных сосен: *Pinus koraiensis* (Bozhkov et al., 1997), *P. pinea* (Carneros et al., 2009), *P. sibirica* (Tret'yakova et al., 2014), *P. pumila* (Tret'yakova, Shuvaev, 2015). Во всех литературных источниках отмечается очень низкая частота инициации эмбриогенного каллуса у пятихвой-

ных сосен, как и у других видов рода *Pinus*. Так, у *P. pumila* из района Удоканского хребта и юга Якутии частота инициации эмбриогенного каллуса составила только 0,3 % (Tret'yakova, Shuvaev, 2015). Исследования, проведенные на *P. strobus*, показали, что для достижения максимальной инициации большее значение имеет стадия развития зиготического зародыша (Klimaszewska et al., 2001). В ходе наших экспериментов мы определили стадии развития зиготических зародышей с наибольшим откликом на состав индукционной среды.

Введение в культуру незрелых зиготических зародышей *P. pumila* на стадии инициации семядолей (размером 0,3 мм) оказалось неэффективным, частота каллусообразова-

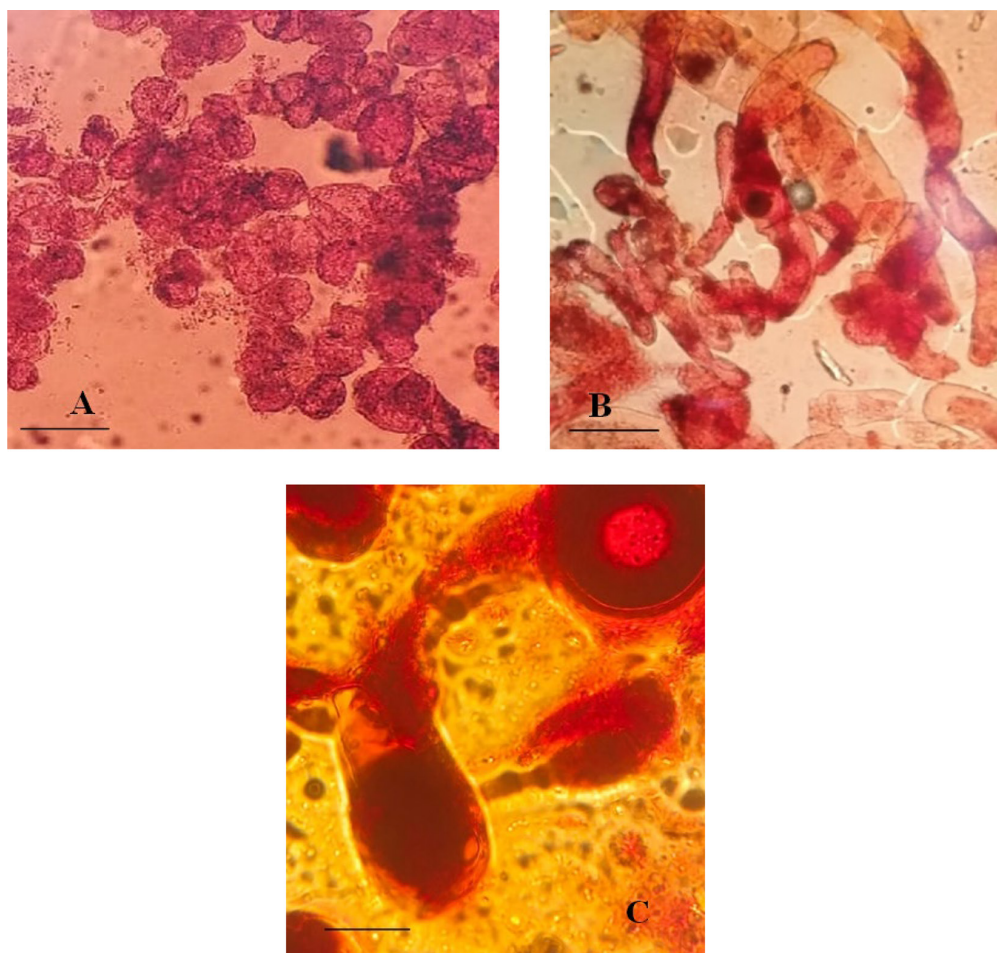


Рис. 3. Морфологические типы клеток в каллусных культурах: А – изодиаметрические клетки, масштаб 50 мкм; В – удлиненные клетки, масштаб 70 мкм; С – эмбриональные глобулы, масштаб 100 мкм

Fig. 3. Morphological types of cells in callus cultures of *Pinus pumila*: A – isodiametric cells, the bar length corresponds to 50 μm ; B – elongated cells, the bar length corresponds to 70 μm ; C – embryonic globules, the bar length corresponds to 100 μm

ния была равна нулю. Инициация каллусных культур у зародышей на стадии развития семядолей размером 0,7 мм составила 40 %. Из литературных источников известно, что у некоторых видов сосны, например у *P. koraiensis*, индукция каллусной массы происходила только на данной стадии развития зародышей (Gao et al., 2022). Индукция каллусной массы в нашем исследовании имела место только у семядольных зародышей и с наибольшей частотой (85 %) у наиболее зрелых зародышей, размером около 1 мм

(сбор шишек 30.07–7.08). В научной литературе описаны исследования, в которых индукция соматического эмбриогенеза активно шла также из зрелых зиготических зародышей, например у *P. sylvestris* (Ignatenko et al., 2022) и у *P. pungens* (Cao et al., 2022).

Известно, что на индукцию соматического эмбриогенеза хвойных значительное влияние оказывает состав питательных сред. Наиболее распространенными базовыми средами для рода *Pinus* являются среды DCR (Gupta, Durzan, 1985), Litvay (Litvay et al., 1985;

Nagmani, Bonga, 1985) и MSG (Becwar et al., 1990). В нашем исследовании была использована среда DCR (Gupta, Durzan, 1985), так как считается, что именно она наилучшим образом подходит для индукции соматического эмбриогенеза у *Pinus* (Song et al., 2020). Существует мнение, что среды Litvay (Litvay et al., 1985; Nagmani, Bonga, 1985) и MSG (Becwar et al., 1990) могут негативно сказываться на каллусообразовании, так как содержат менее удачные концентрации некоторых компонентов – более низкие Ca^{2+} и более высокие NH_4^+ и NO_3^- (Cao et al., 2022).

Для индукции соматического эмбриогенеза у разных видов хвойных используют питательные среды с добавлением регуляторов роста растений. Наиболее часто используемыми регуляторами роста являются ауксины 2,4-D и NAA и цитокинин BAP (Montalbán et al., 2013; Klimaszewska et al., 2000; Pullman, Johnson, 2002). Для успешной пролиферации эмбрионного каллуса у хвойных обычно используют те же питательные среды, что и для индукции, либо среды с пониженной концентрацией регуляторов роста (Pullman, Bucalo, 2014; Klimaszewska et al., 2016). В нашем исследовании было использовано четыре варианта базовой среды DCR (Gupta, Durzan, 1985) с различными концентрациями и комбинациями упомянутых регуляторов роста (табл. 1). В ходе эксперимента индукция и пролиферация эмбрионного каллуса у *P. pumila* имели место в вариантах с более низкими концентрациями NAA и BAP (DCR 3 и DCR 4). Использование 2,4-D (DCR 1) отрицательно сказалось на индукции и поддержании жизнеспособности каллусов: низкий отклик (15 %) и быстрая, в течение двух-трех субкультивирований, деградация каллусов, несмотря на то, что этот регулятор роста наиболее часто используется для получения соматического эмбриогенеза у *Pinus*

(Ignatenko et al., 2022). На среде DCR 2 формировался неэмбрионный каллус, который быстро пролиферировал в течение первых двух месяцев культивирования, затем началась его постепенная деградация и перерождение. Каллус становился плотным, медленно пролиферировал в последующие 6 месяцев, постепенно некротировал. Одной из причин деградации каллусных культур *P. pumila* на среде DCR 2 могло быть высокое содержание NAA в питательной среде.

Эмбрионный каллус формировался и пролиферировал на средах DCR 3 и DCR 4 с пониженными концентрациями регуляторов роста. К концу инициации эмбрионный каллус представлял собой эмбрионально-сuspензорную массу, состоял из эмбриональных глобул и эмбриональных трубок и в течение полугода, с момента введения зародышей в культуру до окончания эксперимента, сохранял высокую скорость пролиферации. Благодаря оптимальному составу питательной среды, неэмбрионный каллус, полученный на средах DCR 3 и DCR 4, пролиферировал в течение 6 месяцев культивирования. Однако спустя полгода каллус постепенно терял пролиферационную активность, становился темно-коричневого цвета, деградировал и погибал.

Заключение

Индукция соматического эмбриогенеза у *P. pumila* до сих пор изучена недостаточно. В данном исследовании была проведена оценка некоторых факторов, оказывающих влияние на инициацию соматического эмбриогенеза в отношении кедрового стланика. Была выявлена наиболее отзывчивая на индукционные среды стадия развития зиготического зародыша; подобраны наиболее оптимальные условия для эмбрионного каллусогенеза (состав питательной среды,

концентрация и комбинация регуляторов роста растений). Полученные результаты представляют новые экспериментальные данные для дальнейшей оптимизации индукции соматического эмбриогенеза у *P. pumila* в культуре *in vitro*.

Список литературы / References

Васильева Г.В., Горошкевич С.Н. (2012) Семеношение и рост потомства гибридов между кедром сибирским и кедровым стлаником в сравнении с родительскими видами. *Хвойные бореальной зоны*, 30(1–2): 28–32 [Vasilyeva G. V., Goroshkevich S. N. (2012) Seed production and offspring growth in hybrids of Siberian stone pine and Siberian dwarf pine in comparison with parental species. *Conifers of the Boreal Area* [Khvoynye boreal'noi zony], 30(1–2): 28–32 (in Russian)]

Петрова Е. А., Горошкевич С. Н., Политов Д. В., Белоконов М. М., Попов А. Г., Васильева Г. В. (2007) Семенная продуктивность и генетическая структура популяций в зоне естественной гибридизации кедра сибирского и кедрового стланика в Северном Прибайкалье. *Хвойные бореальной зоны*, 24(2–3): 331–335 [Petrova E. A., Goroshkevich S. N., Politov D. V., Belokon M. M., Popov A. G., Vasilyeva G. V. (2007) Seed productivity and genetic structure of populations in the area of natural hybridization of Siberian stone pine and Siberian dwarf pine in the Northern Baikal region. *Conifers of the Boreal Area* [Khvoynye boreal'noi zony], 24(2–3): 331–335 (in Russian)]

Третьякова И. Н., Ижболдина М. В. (2009) Индукция соматического эмбриогенеза у кедра сибирского. *Лесоведение*, 5: 43–49 [Tret'yakova I. N., Izboldina M. V. (2009) Induction of Siberian pine somatic embryogenesis. *Russian Journal of Forest Science* [Lesovedenie], 5: 43–49 (in Russian)]

Третьякова И. Н., Пак М. Э., Пахомова А. П., Шевелева И. С., Муратова Е. Н. (2021) Индукция соматического эмбриогенеза у ели сибирской (*Picea obovata*) в культуре *in vitro*. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 54: 6–20 [Tretyakova I. N., Park M. E., Pakhomova A. P., Sheveleva I. S., Muratova E. N. (2021) Induction of somatic embryogenesis in Siberian spruce (*Picea obovata*) in *in vitro* culture. *Tomsk State University Journal of Biology* [Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya], 54: 6–20 (in Russian)]

Becwar M. R., Nagmani R., Wann S. R. (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research*, 20(6): 810–817

Belorussova A. S., Tret'yakova I. N. (2008) Patterns of somatic embryo formation in Siberian larch: Embryological aspects. *Russian Journal of Developmental Biology*, 39(2): 83–91

Bozhkov P. V., Ahn I. S., Park Y. G. (1997) Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. *Canadian Journal of Botany*, 75(3): 509–512

Cao X., Gao F., Qin C., Chen S., Cai J., Sun C., Weng Y., Tao J. (2022) Optimizing somatic embryogenesis initiation, maturation and preculturing for cryopreservation in *Picea pungens*. *Forests*, 13(12): 2097

Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J. M. (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(2): 165–178

Gao F., Peng C., Wang H., Shen H., Yang L. (2021) Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*, 32(2): 483–491

- Gao F., Peng C., Zhang Y., Wang H., Shen H., Yang L. (2022) Glutathione plays a positive role in the proliferation of *Pinus koraiensis* embryogenic cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23): 14679
- Gupta P. K., Durzan D. J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4(4): 177–179
- Ignatenko R. V., Chirva O. V., Ershova M. A., Galibina N. A. (2022) Some problems arising during the initiation of somatic embryogenesis in *Pinus sylvestris* L. *Environmental Sciences Proceedings*, 22(1): 48
- Klimaszewska K., Bernier-Cardou M., Cyr D. R., Sutton B. C. S. (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 36(4): 279–286
- Klimaszewska K., Lachance D., Pelletier G., Lelu M. A., Séguin A. (2001) Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 37(6): 748–755
- Klimaszewska K., Hargreaves C., Lelu-Walter M. A., Trontin J. F. (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. *In vitro embryogenesis in higher plants. Methods in molecular biology (Book series). Vol. 1359*. Germana M. A., Lambardi M. (Eds.) New York, Springer Science+Business Media, p. 131–166
- Lelu-Walter M. A., Gautier F., Eliášová K., Sanchez L., Teyssier C., Lomenech A. M., Le Metté C., Hargreaves C., Trontin J. F., Reeves C. (2018) High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1): 137–155
- Litvay J. D., Verma D. C., Johnson M. A. (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*, 4(6): 325–328
- Li X., Liu X. T., Wei J. T., Li Y., Tigabu M., Zhao X. Y. (2020) Genetic improvement of *Pinus koraiensis* in China: current situation and future prospects. *Forests*, 11(2): 148
- Montalbán I. A., Setién-Olarrá A., Hargreaves C. L., Moncaleán P. (2013) Somatic embryogenesis in *Pinus halepensis* Mill.: an important ecological species from the Mediterranean forest. *Trees*, 27(5): 1339–1351
- Nagmani R., Bonga J. M. (1985) Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Canadian Journal of Forest Research*, 15(6): 1088–1091
- Nunes S., Marum L., Farinha N., Pereira V. T., Almeida T., Sousa D., Mano N., Figueiredo J., Dias M. C., Santos C. (2018) Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1): 71–84
- Pullman G. S., Johnson S. (2002) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Annals of Forest Science*, 59(5–6): 663–668
- Pullman G. S., Bucalo K. (2014) Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forests*, 45(3): 353–377
- Santa-Catarina C., Silveira V., Guerra M. P., Steiner N., Macedo A. F., Floh E. I. S. (2012) The use of somatic embryogenesis for mass clonal propagation and biochemical and physiological studies in woody plants. *Current Topics in Plant Biology*, 13: 103–119

Song Y., Zhu J.J., Yan Q.L. (2020) The temperature and length for the release of primary and induction of secondary physiological dormancy in Korean pine (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) seeds. *New Forests*, 51(4): 657–669

Steiner N., Farias-Soares F. L., Schmidt É. C., Pereira M. L. T., Scheid B., Rogge-Renner G. D., Bouzon Z. L., Schmitz D., Maldonado S., Guerra M. P. (2016) Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Protoplasma*, 253(2): 487–501

Tret'yakova I. N., Voroshilova E. V., Shuvaev D. N. (2014) Callusogenesis and somatic embryogenesis induction in hybrid embryos from the seeds of *Pinus sibirica*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(2): 274–280

Tret'yakova I. N., Shuvaev D. N. (2015) Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation in vitro. *Russian Journal of Developmental Biology*, 46(5): 276–285

Tret'yakova I. N., Park M. E., Ivanitskaya A. S., Oreshkova N. V. (2016) Peculiarities of somatic embryogenesis of long-term proliferating embryogenic cell lines of *Larix sibirica* in vitro. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(6): 800–810

Vondráková Z., Eliášová K., Fischerová L., Vágner M. (2011) The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 6(4): 587–596

Yang X., Zhang X. (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1): 36–57

Zeng F., Zhang X., Cheng L., Hu L., Zhu L., Cao J., Guo X. (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*, 90(5): 620–628

EDN: JOHDBL

УДК 574

Effects of Fullerenes and Nanodiamonds in Hydroponic Culture of *Triticum aestivum*

Svetlana A. Pyatina*,
Natalia G. Menzhanova and Ekaterina I. Shishatskaya
Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation

Received 20.02.2023, received in revised form 20.06.2024, accepted 23.06.2024

Abstract. Currently, the prospects for increasing the efficiency of various agricultural technologies are associated with the use of nanomaterials as nanopesticides, nanofertilizers, nanoadaptogens, and seed priming agents. The successful development of nanoagricultural technologies is hampered by insufficient data on the mechanisms through which the biological activity of nanomaterials is realized at various stages of development of the plant organism. Therefore, in the present work, the effects of carbon nanoparticles – fullerenes (C₆₀F) and nanodiamonds (ND) – on the germination activity of grains and the functional status of the roots of 2-day-old wheat seedlings were studied in hydroponic wheat culture. The priming effect was detected only for C₆₀P (5 µg/mL). Carbon nanoparticles did not stimulate root growth. In the ND (25 and 50 µg/mL) treatments, root growth was inhibited. An increase in the population of border cells in the root apex was detected only in the C₆₀F (50 µg/mL) treatment, where the increase in the number of border cells was accompanied by an increase in the protein content in the mucilage cap of the root apex. A decrease in the number of border cells without changes in the protein content in the apical mucilage cap was detected in the ND (50 µg/mL) and C₆₀F (25 µg/mL) treatments. Both types of nanoparticles caused a dose-dependent increase in the secretory activity of border cells. Carbon nanoparticles had dose-dependent pro-oxidant activity. ND (5 µg/mL) and C₆₀F (5 and 25 µg/mL) increased the content of carbonylated proteins in the roots of 2-day-old seedlings. An increase in malondialdehyde content was observed only in the ND (50 µg/mL) treatment. The detected dose-dependent effects of carbon nanoparticles are not associated with their penetration into cells (the sizes of nanoparticles significantly exceed the sizes of nanopores in the cell wall of wheat). It is assumed that the biological activity of C₆₀F and ND can be realized through the induction of oxidative stress in the cell wall and apoplast. Results of the current study suggest that carbon nanoparticles (of certain size classes in certain concentrations) can be regarded as promising regulators of the physiology of the root

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: davebetik@mail.ru

ORCID: 0000-0003-3930-6923 (Pyatina S.); 0000-0001-7967-243X (Shishatskaya E.)

system, realizing their activity “extracellularly”, without translocation into the cell.

Keywords: carbon nanoparticles, oxidative stress, malondialdehyde, carbonylated proteins, root apex, border cells.

Citation: Pyatina S. A., Menzyanova N. G., Shishatskaya E. I. Effects of fullerenes and nanodiamonds in hydroponic culture of *Triticum aestivum*. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 160–176. EDN: JOHDBL



Эффекты фуллеренов и наноалмазов в гидропонной культуре *Triticum aestivum*

С. А. Пятина, Н. Г. Мензянова, Е. И. Шишацкая
Сибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. В настоящее время перспективы повышения эффективности различных агротехнологий связывают с использованием наноматериалов в качестве нанопестицидов, нанодобровений, наноадаптогенов, агентов для праймирования семян. Успешное развитие наноагротехнологий сдерживается недостаточной изученностью механизмов реализации биологической активности наноматериалов на различных этапах развития растительного организма. В связи с этим в гидропонной культуре пшеницы изучали влияние углеродных наночастиц, фуллеренов ($C_{60}F$) и наноалмазов (НА), на активность прорастания зерновок и функциональный статус корня 2-суточных проростков пшеницы. Эффект праймирования был выявлен только для $C_{60}F$ (5 мкг/мл). Углеродные наночастицы не стимулировали рост корня. Для НА (25 и 50 мкг/мл) отмечалось ингибирование роста корня. Увеличение численности популяции пограничных клеток в корневом апексе было выявлено только для $C_{60}F$ (50 мкг/мл). В этом случае увеличение численности пограничных клеток сопровождалось повышением содержания белка в гелевом чехле апекса. Уменьшение численности пограничных клеток без изменения содержания белка в гелевом чехле апекса было выявлено для НА (50 мкг/мл) и $C_{60}F$ (25 мкг/мл). Оба типа наночастиц вызывали дозозависимое увеличение секреторной активности пограничных клеток. Углеродные наночастицы обладали дозозависимой прооксидантной активностью. НА (5 мкг/мл) и $C_{60}F$ (5 и 25 мкг/мл) увеличивали содержание карбонилированных белков в корнях 2-дневных проростков. Увеличение содержания малонового диальдегида наблюдалось только для НА (50 мкг/мл). Выявленные дозозависимые эффекты углеродных наночастиц не связаны с их проникновением в клетки (размеры наночастиц значительно превышают размеры нанопор в клеточной стенке пшеницы). Предполагается, что биологическая активность $C_{60}F$ и НА может реализоваться через индукцию окислительного стресса в клеточной стенке и апопласте. Полученные результаты позволяют рассматривать углеродные наночастицы (определенных размерных классов в определенных концентрациях) как перспективные регуляторы физиологии корневой системы, реализующие свою активность «экстраклеточно», без транслокации в клетку.

Ключевые слова: углеродные наночастицы, окислительный стресс, малоновый диальдегид, карбонилированные белки, корневой апекс, пограничные клетки.

Цитирование: Пятина С. А. Эффекты фуллеренов и наноалмазов в гидропонной культуре *Triticum aestivum* / С. А. Пятина, Н. Г. Мензянова, Е. И. Шишацкая // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 160–176. EDN: JOHDBL

Введение

Нанотехнологии занимают ключевые позиции в современном мире. Успешное развитие электроники, энергетики, биомедицины, пищевой промышленности и агрокультуры зависит от наноматериалов. По прогнозам, в 2024 году мировой рынок нанотехнологий превысит 125 миллиардов долларов США и около 85 % этого рынка будут составлять наночастицы (НЧ) (Global nanotechnology market..., 2018). Эти прогнозы предполагают увеличение скорости накопления НЧ в окружающей среде. 60–90 % синтезированных НЧ (в составе различных продуктов) попадают на свалки, 10–25 % – в почву (Meramo et al., 2018). Накопление НЧ в почвенных экосистемах связано с их использованием в качестве фунгицидов, гербицидов, инсектицидов (Hafeez et al., 2021; Kamli et al., 2021), удобрений (Abdel-Aziz et al., 2021), для нанопрайминга семян (seed nano-priming) (Younas et al., 2023). Скорость развития наноагротехнологий значительно опережает формирование представлений о биологической активности НЧ, в частности их фитотоксичности.

Экспериментальные исследования свидетельствуют, что принцип классической токсикологии «доза – эффект» не всегда реализуется для НЧ. Нанотоксичность зависит от количества НЧ (Xiong et al., 2021), размеров (Montvydienė et al., 2021), химической природы (Liu et al., 2021), морфологии (Kladko et al., 2021), модификации поверхности (Rippner et al., 2020), поверхностного заряда (Bityutskii et al., 2021), способа получения (химический или биологический, «green» синтез) (Zhang et al., 2021b), сайта проникновения (корневая систе-

ма, листья) (Ahmed et al., 2018). Эффекты НЧ значительно варьируют в зависимости от вида растения (Jain et al., 2017), способа культивирования (гидропонные и почвенные культуры) (Ahmed et al., 2018) и стрессовых воздействий (Pandey et al., 2018). Активность депонирования НЧ в корневой системе и побегах также существенно различается (Ahmed et al., 2018). Все это определяет сложности прогнозирования эффектов НЧ в растительных экосистемах. Эта проблема особенно актуальна для углеродных НЧ, поскольку их влияние на ранние этапы развития проростка, формирование корневой системы и ризосферы изучено недостаточно, а имеющиеся экспериментальные данные противоречивы (Liu et al., 2020; Szöllösi et al., 2020). Сведения о влиянии углеродных НЧ на популяцию пограничных клеток (ПК) корневого апекса отсутствуют. Система ПК играет ключевую роль в формировании ризосферы и определяет устойчивость корневой системы и растения в целом к воздействию биотических и абиотических факторов: патогенам (Ropitiaux et al., 2020), водному дефициту (Carreras et al., 2020), высокой температуре (Pan et al., 2004), солевому стрессу (Ninmanont et al., 2021), индустриальным поллютантам (Nagayama et al., 2019). Можно предполагать, что формирование токсических профилей углеродных НЧ в значительной степени зависит от популяции ПК.

Изучение влияния различных абиотических факторов на популяцию ПК при культивировании растений в почве сопряжено с большими трудностями. Это определило использование гидропонных культур проростков как модельных систем для изучения биоло-

гии ПК. Разработанные Hawes и ее коллегами (Hawes, Rueppke, 1986) экспериментальные протоколы используются с небольшими модификациями и в настоящее время в исследованиях физиологии, транскриптома и метаболома ПК в гидропонных культурах (Shirakawa et al., 2023; Wang et al., 2023). Эти протоколы включают проращивание и культивирование проростков на дистиллированной воде. На ранних этапах проращивания рост проростка зависит от активности ферментов, которые включаются в гидролиз депонированных в эндосперме крахмала, липидов, белков, полифосфатов, и транспорта продуктов гидролиза (глюкоза, аминокислоты, фосфаты) к тканям проростка (Ali, Elozeiri, 2017). Это определяет возможность кратковременного (в течение нескольких дней в зависимости от вида) культивирования проростков на дистиллированной воде. В зависимости от задач исследования после кратковременного культивирования на дистиллированной воде проростки переносят на специализированные водные минеральные среды для продолжительного культивирования.

В случае изучения биологической активности НЧ культивирование проростков на дистиллированной воде позволяет исключить процессы агрегации НЧ. На простых минеральных средах НЧ агрегируют в крупные микроразмерные агрегаты, которые выпадают в осадок (Antal et al., 2023).

В связи с этим в представленной работе в гидропонной культуре *Triticum aestivum* изучали влияние углеродных НЧ, фуллеренов ($C_{60}F$) и наноалмазов (НА) на активность прорастания; активность роста корня; численность популяции ПК и содержание белка в гелевом чехле корневого апекса; содержание продуктов свободнорадикального окисления белков (карбонилированных белков, КБ) и липидов (малонового диальдегида, МДА) в корнях 2-суточных проростков.

Материалы и методы

Определение размеров агрегатов $C_{60}F$ и НА

Стабильные коллоидные водные суспензии $C_{60}F$ и модифицированных детонационных НА (Пузырь, Бондарь, 2005) были получены из лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН.

Распределение частиц по размеру кластеров в водных суспензиях определяли методом динамического рассеяния света с использованием технологии NIBS (неинвазивного обратного рассеивания) на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., Великобритания).

Гидропонная культура пшеницы

Зерно яровой короткоциклового пшеницы Новосибирская 15 было получено из Красноярского государственного аграрного университета. Сорт выведен в Сибирском научно-исследовательском институте растениеводства и селекции (Россия) и внесен в Государственный реестр сортов растений.

Подготовку зерна для гидропонного культивирования проводили в соответствии с общепринятыми протоколами (Wang et al., 2023) с небольшими модификациями. Зерно пшеницы промывали в течение 5–6 ч под проточной водой. Зерновки стерилизовали водным раствором 0,5 % $KMnO_4$ в течение 8 мин, затем несколько раз промывали дистиллированной водой (Дистиллятор GFL 2208, Германия). После стерилизации зерновки замачивали в дистиллированной воде на 24 ч при комнатной температуре. Для экспериментов отбирали проклюнувшиеся зерновки (зерновки с хорошо заметной coleorizой, у которых активировался процесс элонгации клеток зародышевого корешка) и раскладывали по чашкам Петри по 50 штук в каждую. В контрольном варианте в чашки

вносили по 7 мл дистиллированной воды. В экспериментальные варианты вносили по 7 мл стабильных коллоидных водных суспензий $C_{60}F$ или НА (концентрация НЧ 5, 25 и 50 мкг/мл). Контрольные и экспериментальные варианты были представлены пятью биологическими повторами (по 5 чашек Петри с зерновками). Зерно проращивали при комнатной температуре. На вторые сутки подсчитывали количество не проросших зерновок. У 2-суточных проростков определяли длину главного корня. Было проведено 6 независимых экспериментов.

Оценка численности свободных ПК

ПК получали активным смыванием с поверхности корневого апекса (Wang et al., 2023). Срезанные корни 2-суточных проростков погружали на 1 мин в ячейку культурального планшета с 1 мл дистиллированной воды, установленного на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия), скорость вращения 250 об/мин. Полученную суспензию клеток центрифугировали 900 g, 10 мин (Eppendorf 5430R, Германия). Супернатант после центрифугирования представлял собой водный раствор компонентов гелевого чехла (белков, полисахаридов и др.). В супернатанте определяли содержание общего белка по Лоури (Lowry et al., 1951). Полученный после центрифугирования осадок ПК суспендировали в дистиллированной воде и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Количество ПК и содержание белка в супернатанте пересчитывали на 1 корневой апекс.

Активность секреции ПК

Активность секреции ПК определяли как соотношение содержания белка в гелевом чехле одного апекса и количества свободных ПК в одном апексе.

Определение содержания КБ, МДА и пролина

У 2-суточных проростков срезали фрагменты корней с корневыми апексами длиной в 1 см. Полученную биомассу корней гомогенизировали в ручном стеклянном пестиковом гомогенизаторе в 0,05 М Трис-НСl буфере (рН=7,4), Т=4 °С. Гомогенаты центрифугировали (Eppendorf 5430R, Германия) для удаления грубого дебриса при 1200 g, 15 мин, Т=4 °С. В гомогенатах после осаждения дебриса определяли содержания КБ по методу Carty et al. (2000), МДА по методу Bailly et al. (1996), пролина по методу Bates et al. (1973), общего белка по Лоури (Lowry et al., 1951). Содержание КБ, МДА и пролина пересчитывали на 1 мг белка.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel и STATISTICA 8.0. Гипотеза о нормальном распределении была подтверждена с помощью критерия соответствия χ^2 (исходя из 5 % уровня значимости). Для проверки нулевой гипотезы о равенстве средних значений двух совокупностей использовали t-критерий Стьюдента (р<0,05). Полученные данные в таблице и на графиках представляли как $M \pm m$, где М – среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического.

Результаты

Характеристика углеродных НЧ

Результаты измерений показали, что в стабильных коллоидных водных суспензиях средний размер агрегатов НА составлял 54 нм, $C_{60}F$ – 95 нм, но индекс полидисперсности был значительно выше для $C_{60}F$. Агрегаты $C_{60}F$ и НА отличались по величине отрицательного дзета-потенциала (табл.).

Таблица. Размерные характеристики и дзета-потенциал углеродных наночастиц. НА – наноалмазы, $C_{60}F$ – фуллерены

Table. Size characteristics and charge of carbon nanoparticles. ND – nanodiamonds, $C_{60}F$ – fullerenes

Наночастицы	Средний диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ	Индекс полидисперсности, PdI $^{1/4}$
НА	$54,07 \pm 0,35$	- 42,4	$0,225 \pm 0,005$
$C_{60}F$	$94,64 \pm 3,12$	- 38,2	$0,482 \pm 0,031$

Активность прорастания

Количество проросших зерновок на среде с минимальной концентрацией $C_{60}F$ (5 мкг/мл) было в 1,5 раза больше, чем в контроле. В концентрации 50 мкг/мл $C_{60}F$ снижали количество проросших зерновок в 2,5 раза по сравнению с контрольным вариантом (рис. 1А). Для НА было выявлено только снижение активно-

сти прорастания: на средах с НА (25 и 50 мкг/мл) количество проросших зерновок было в 1,5 раза меньше, чем в контроле (рис. 1А).

Длина главного корня

2-суточных проростков

В изученных концентрациях $C_{60}F$ не влияли на скорость роста корня (рис. 1Б).

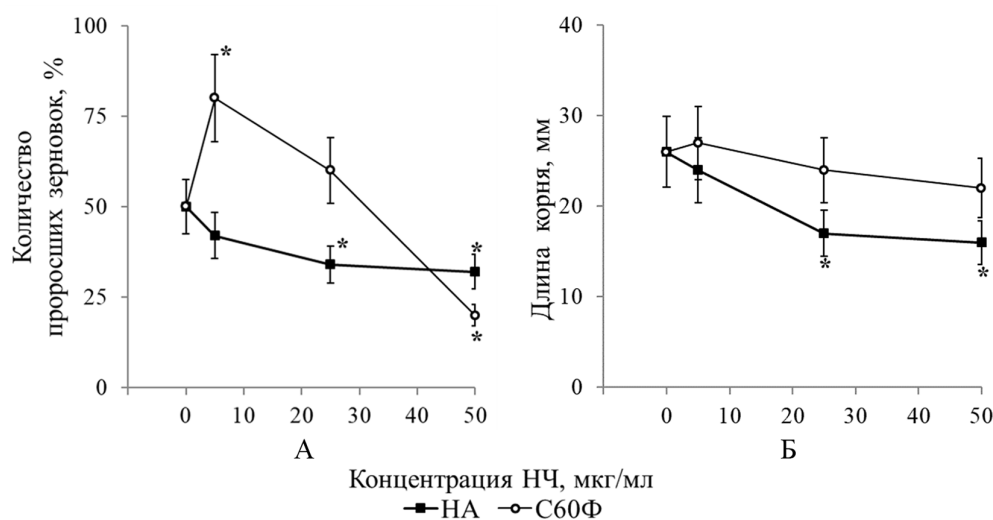


Рис. 1. Активность прорастания зерна (А) и длина корня 2-суточных проростков пшеницы (Б) на средах с углеродными наночастицами (НЧ). НА – наноалмазы, $C_{60}F$ – фуллерены. Количество проросших зерновок выражено в % от общего количества зерновок в чашке Петри. Точка 0 – контрольный вариант, дистиллированная вода. На этих графиках и на графиках на рис. 2–4 данные представлены как $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение из 6 независимых экспериментов, m – стандартная ошибка среднего. Звездочкой (*) отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта (точка «0» на графике), $p < 0,05$

Fig. 1. Grain germination activity (A) and root length of 2-day-old wheat seedlings (B) on media with carbon nanoparticles (NPs). ND, nanodiamonds; $C_{60}F$, fullerenes. The number of germinated grains is expressed as % of the total number of grains in a Petri dish. Point 0 – control, distilled water. In these graphs and in the graphs in Figures 2–4 data are presented as $M \pm m$, where M is the arithmetic mean of 6 independent experiments, m is the standard error of the mean. An asterisk (*) indicates values that are significantly different from the control (point “0” on the graph), $p < 0.05$

В концентрациях 25 и 50 мкг/мл НА ингибировали рост корня: длина корня на средах с НА была в 1,6 раза меньше, чем в контроле (рис. 1Б).

Численность ПК в корневом апексе 2-суточных проростков

$C_{60}F$ и НА вызывали дозозависимые изменения численности популяции свободных ПК корневого апекса (рис. 2А). НА (50 мкг/мл) и $C_{60}F$ (25 мкг/мл) снижали численность ПК в 1,9 и 1,6 раза соответственно, по сравнению с контролем. Увеличение численности ПК (в 1,5 раза) было выявлено только для $C_{60}F$ в концентрации 50 мкг/мл.

Содержание белка в гелевом чехле корневого апекса 2-суточных проростков

Углеродные НЧ вызывали дозозависимое увеличение содержания общего белка

в гелевом чехле корневого апекса и увеличение активности секреции ПК (рис. 2Б, 3А). Для $C_{60}F$ увеличение количества белка в гелевом чехле было выявлено только для концентрации 50 мкг/мл (в 2,6 раза по сравнению с контролем). Но увеличение активности секреции (в среднем в 1,7 раза) наблюдалось для двух концентраций $C_{60}F$: 25 и 50 мкг/мл (активность секреции выходила на плато при концентрации 25 мкг/мл) (рис. 3А). НА увеличивали содержание белка в гелевом чехле в концентрации 5 мкг/мл (в 1,5 раза), а активность секреции ПК – в концентрации 50 мкг/мл (в 1,6 раза по сравнению с контролем) (рис. 3А).

Различный характер индуцированных углеродными НЧ дозозависимых изменений содержания белка в гелевом чехле корневого апекса, количества ПК, секреторной активности ПК позволяет предполагать сложные

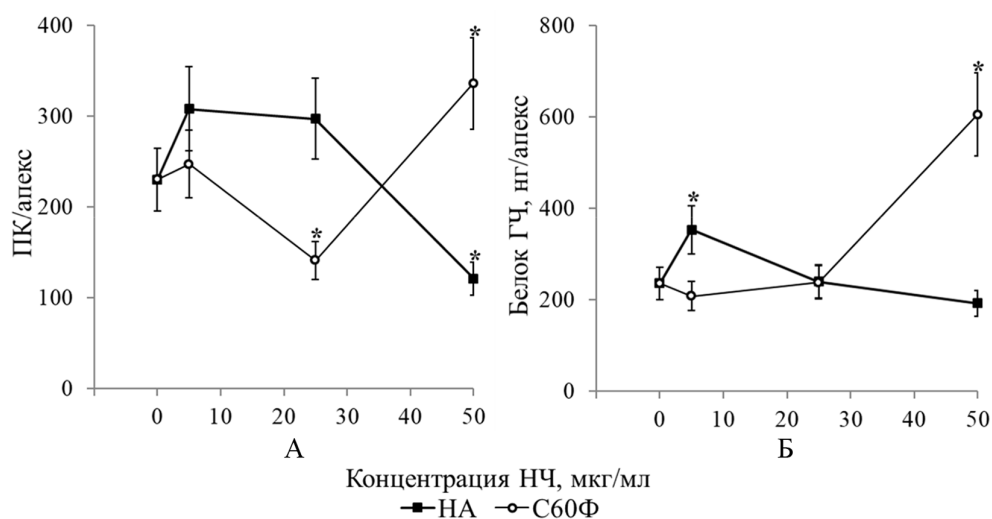


Рис. 2. Количество свободных пограничных клеток (ПК/апекс) (А) и содержание белка в гелевом чехле (Белок ГЧ, нг/апекс) (Б) корневого апекса 2-суточных проростков на средах с углеродными наночастицами (НЧ). НА – наноалмазы, $C_{60}F$ – фуллерены. Точка 0 – контрольный вариант, дистиллированная вода. Звездочкой (*) отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта (точка «0» на графике), $p < 0,05$

Fig. 2. The number of free border cells (BCs/apex) (A) and the protein content in the mucilage cap (MC protein, ng/apex) (B) of the root apex of 2-day-old seedlings on media with carbon nanoparticles (NPs). ND, nanodiamonds; $C_{60}F$, fullerenes. Point 0 – control, distilled water. An asterisk (*) indicates values that are significantly different from the control (point “0” on the graph), $p < 0.05$

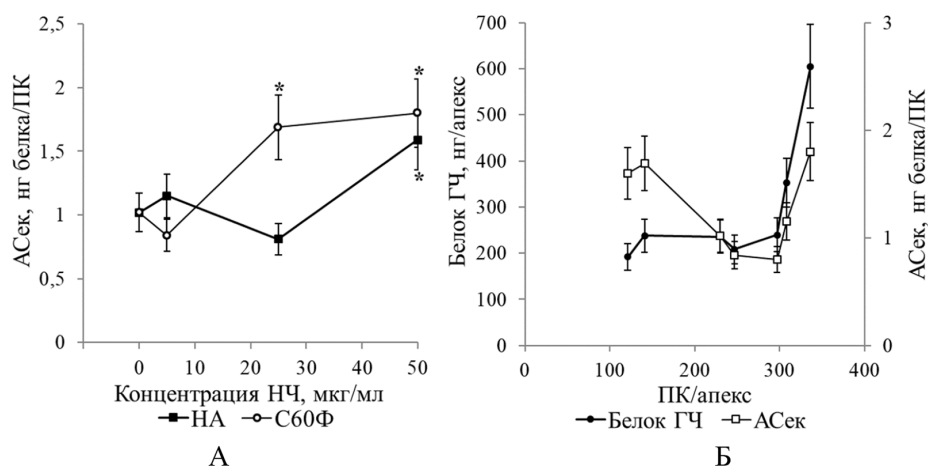


Рис. 3. Активность секреции свободных пограничных клеток корневого апекса (АСек, нг белка/ПК) (А) и соотношение содержания белка в гелевом чехле (Белок ГЧ, нг/апекс), активности секреции пограничных клеток (АСек, нг белка/ПК) и численности свободных пограничных клеток (ПК/апекс) (Б) у 2-суточных проростков на средах с углеродными наночастицами (НЧ). НА – наноалмазы, С₆₀Ф – фуллерены. Точка 0 – контрольный вариант, дистиллированная вода. Для рисунка (А) звездочкой (*) отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта (точка «0» на графике), $p < 0,05$

Fig. 3. The secretion activity of free border cells of the root apex (SecA, ng protein/BC) (A) and the ratio of the protein content in the mucilage cap (MC protein, ng/apex), the secretion activity of border cells (SecA, ng protein/BC) and the number of free border cells (BC/apex) (B) in 2-day-old seedlings on media with carbon nanoparticles (NPs). ND, nanodiamonds; C₆₀F, fullerenes. Point 0 – control, distilled water. In figure (A), an asterisk (*) indicates values that are significantly different from the control (point “0” on the graph), $p < 0.05$

нелинейные взаимоотношения между этими функциональными параметрами. В связи с этим полученные результаты были представлены в другом формате: количество белка в гелевом чехле и секреторная активность ПК анализировались как функция численности популяции ПК в корневом апексе (рис. 3Б). Зависимость содержания белка в гелевом чехле от количества ПК в корневом апексе имела нелинейный характер (рис. 3Б): начальное увеличение численности ПК от 100 до 300 клеток на апекс не сопровождалось изменениями содержания белка в гелевом чехле. Когда численность ПК достигала «порогового» значения 300 клеток на апекс, количество белка в гелевом чехле резко возрастало. Зависимость активности клеточной секреции от численности популяции ПК в корневом апексе характеризовалась U-образной кривой: высокий уровень секреторной активности отмечался

для популяций ПК, численность которых различалась 3 раза (рис. 3Б).

Таким образом, увеличение содержания белка в гелевом чехле может реализоваться за счет увеличения численности ПК и их секреторной активности. С другой стороны, в случае снижения численности популяции ПК содержание белка в гелевом чехле может поддерживаться на некотором постоянном уровне за счет компенсаторного увеличения секреторной активности ПК (рис. 3Б). Это предполагает ключевую роль ПК в регуляции молекулярного гомеостаза гелевого чехла корневого апекса.

Содержание МДА, КБ и пролина в корнях 2-суточных проростков

Известно, что НЧ могут реализовать свою биологическую активность через индукцию окислительного стресса (Horie, Tabei,

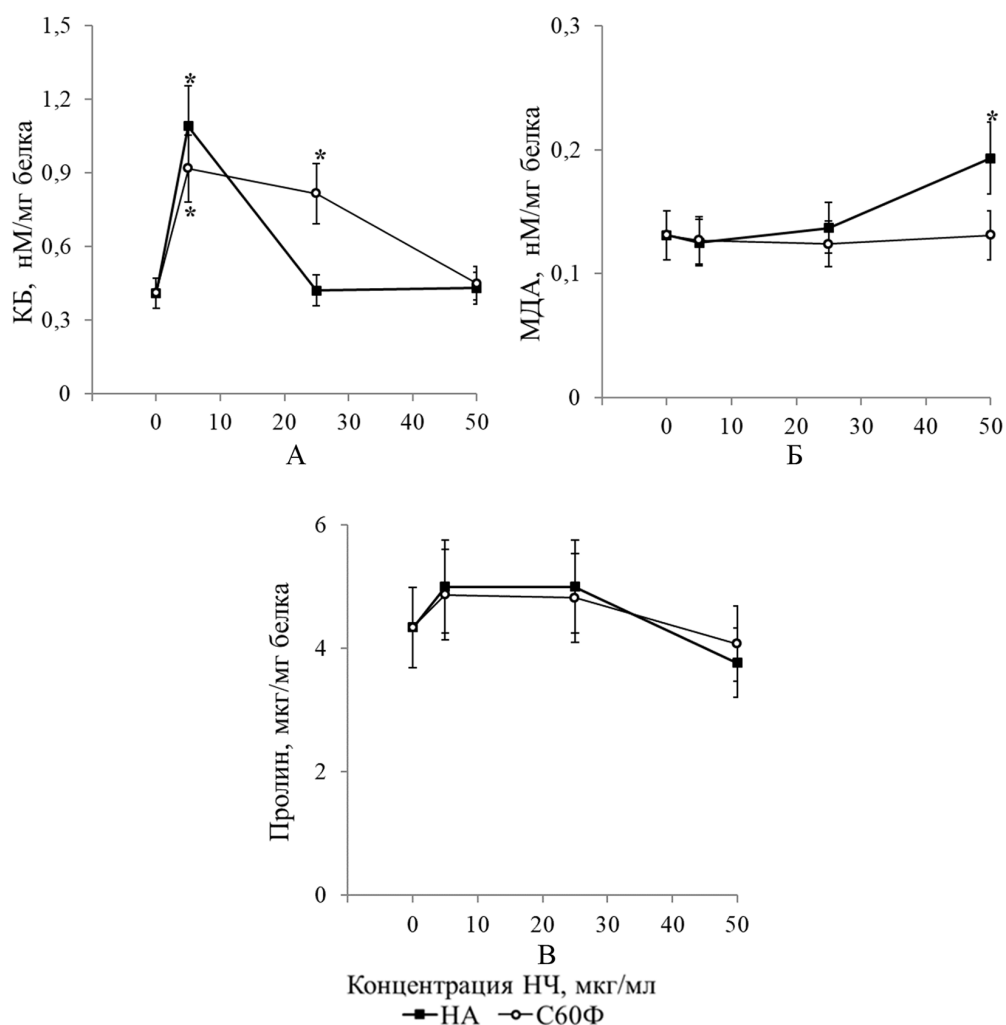


Рис. 4. Содержание карбонилированных белков (КБ, нМ/мг белка) (А), малонового диальдегида (МДА, нМ/мг белка) (Б) и пролина (Пролин, мкг/мг белка) (В) в корнях 2-суточных проростков на средах с углеродными наночастицами (НЧ). НА – наноалмазы, С₆₀Ф – фуллерены. Точка 0 – контрольный вариант, дистиллированная вода. Звездочкой (*) отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта (точка «0» на графике), $p < 0,05$

Fig.4. Content of carbonylated proteins (CB, nM/mg protein) (A), malondialdehyde (MDA, nM/mg protein) (B), and proline (Proline, μg/mg protein) (C) in the roots of 2-day-old seedlings on media with carbon nanoparticles (NPs). ND, nanodiamonds; C₆₀F, fullerenes. Point 0 – control, distilled water. An asterisk (*) indicates values that are significantly different from the control (point “0” on the graph), $p < 0.05$

2021). В связи с этим на следующем этапе работы в корнях проростков определяли содержание продуктов свободнорадикального окисления белков (КБ) и липидов (МДА).

НА (в концентрации 5 мкг/мл) и С₆₀Ф (в концентрациях 5 и 25 мкг/мл) вызвали увеличение содержания КБ (в 2,7 и 2 раза

соответственно) по сравнению с контролем (рис. 4А). Увеличение содержания МДА отмечалось только для НА в концентрации 50 мкг/мл (в 1,5 раза по сравнению с контролем) (рис. 4Б). Дозозависимое увеличение содержания КБ и МДА свидетельствует о проокислительной активности С₆₀Ф и НА. Следует

отметить, что НЧ не влияли на содержание низкомолекулярного скавенджера свободных радикалов пролина (рис. 4В).

Обсуждение

Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о влиянии НЧ на активность различных физиологических и биохимических систем двудольных и однодольных растений.

Механизмы реализации биологической активности НЧ изучены недостаточно. Предполагается, что как индукторы окислительного стресса НЧ реализуют свое влияние на различные эффекторные системы через сигналинг, зависящий от активных форм кислорода (АФК), окислительных модификаций белков, ДНК, липидов, полисахаридов. Следует также отметить противоречивость экспериментальных данных о взаимосвязи между активностью проникновения НЧ через клеточную стенку в клетку и масштабами структурно-функциональных перестроек внутриклеточных систем (Zafar et al., 2023).

Размеры пор в клеточной стенке различных видов варьируют от 1,5 нм до 20 нм (Schwab et al., 2016). Экспериментальные исследования свидетельствуют, что НЧ, размеры которых больше радиуса пор в клеточной стенке, не выявляются в клетках (Hu et al., 2020; Molnar et al., 2020).

В представленной работе размер агрегатов в стабильных коллоидных водных суспензиях $C_{60}F$ варьировал от 78 нм до 712 нм, в стабильных коллоидных водных суспензиях НА – от 15 нм до 59 нм. Диаметр пор в клеточной стенке клеток пшеницы составляет 1,5–3 нм (Chesson et al., 1997). Сравнение размеров агрегатов и пор в клеточной стенке позволяет заключить, что ни один размерный класс агрегатов исследованных углеродных НЧ не проникает через клеточную стенку.

Однако внесение углеродных НЧ в среду проращивания приводит к дозозависимым изменениям исследованных параметров.

Так, на среде с $C_{60}F$ (5 мкг/мл) активность прорастания зерновок была выше, чем в контроле (дистиллированная вода без НЧ) (рис. 1А). Прорастание связано с проникновением воды в зерновку через поры в клеточных стенках. Нанопрайминг стимулирует прорастание, увеличивая активность поглощения воды зерновками (Anand et al., 2019). Предполагается, что НЧ могут инициировать формирование в клеточной стенке дополнительных нанопор для молекул воды (Nile et al., 2022). Порообразующая активность $C_{60}F$ может реализоваться через ремоделирование клеточной стенки, зависящее от АФК. Известно, что при облучении видимым светом молекулы фуллеренов переходят в возбужденное триплетное состояние ($3C_{60}^*$). Такая молекула может играть роль фотосенсилизатора, так как способна передавать энергию молекуле обычного триплетного кислорода, превращая его в синглетный кислород (Пиотровский, Киселев, 2006).

На среде с концентрацией $C_{60}F$ 50 мкг/мл активность прорастания была значительно ниже, чем на контроле (рис. 1А). Снижение активности прорастания может быть связано с процессами агрегации НЧ на поверхности клеточной стенки (Chen et al., 2018). Осаждение на поверхности клеточной стенки большого количества НЧ и формирование крупных агрегатов *in situ* блокируют нанопоры в клеточной стенке и нарушают процессы транспорта воды и кислорода в ткани зерновки, что в результате ингибирует развитие молекулярно-клеточных событий прорастания.

НА – группа углеродных НЧ, которая характеризуется локализацией на поверхности различных функциональных групп (в основ-

ном –ОН и –COОН) и большого количества С=С-связей (Kaluç, Thomas, 2022). Особенно-сти поверхностной химии НА определяют их потенциал как антиоксидантов и скавенджеров свободных радикалов (Antal et al., 2023), а также их прооксидантную активность (Caruso et al., 2021; Zhang et al., 2021a).

В отличие от $C_{60}F$ для НА было выявлено только снижение активности прорастания (концентрации 25 и 50 мкг/мл). Это может быть обусловлено высокой активностью формирования крупных агрегатов НА на поверхности клеточной стенки и ингибированием транспорта воды и кислорода в результате механического блокирования нанопор для воды.

На средах с НА (концентрации 25 и 50 мкг/мл) у проростков наблюдалось ингибирование роста корня в длину (рис. 1Б). На ранних этапах развития проростка рост корня в длину в значительной степени определяется активностью процессов удлинения клеток в зоне элонгации (Zimmermann et al., 2022). Зона элонгации характеризуется высоким уровнем потребления кислорода (Zimmermann et al., 2022). Можно полагать, что выявленное на средах с НА ингибирование роста корня в длину обусловлено формированием крупных агрегатов НА на поверхности корня и механическим блокированием нанопор клеточных стенок, что в результате снижает активность диффузии кислорода в корень. Гипоксия в зоне элонгации корня нарушает процессы ремоделирования клеточных стенок, необходимые для удлинения клеток (Xu et al., 2023), что приводит к уменьшению длины корня проростков на средах с НА.

Одной из эффекторных мишеней НЧ является специфическая популяция клеток корневого апекса – ПК. Дифференцировка ПК сопровождается структурными перестройками клеточных стенок и отделением ПК от поверхности корневого апекса. После отделения

секреторная активность ПК значительно возрастает. Продуктом секреторной активности ПК является гелевый чехол – молекулярный матрикс, который удерживает отделившиеся ПК вблизи корневого апекса. В настоящее время гелевый чехол, сформированный из экзометаболитов ПК, рассматривается как высокоэффективная функциональная система – корневая экстраклеточная ловушка (англ. “root extracellular trap”, RET) (Vincent et al., 2020). Иммобилизация в матриксе RET экотоксикантов различных химических классов и НЧ снижает активность их проникновения в апикальную меристему (Yang et al., 2016; Zhang et al., 2017; Nagayama et al., 2019). Показано, что взаимодействие НЧ со свободными ПК увеличивает активность секреции экзометаболитов, что в результате повышает эффективность иммобилизации НЧ в матриксе RET (Avellan et al., 2017). Следует отметить, что данные о влиянии углеродных НЧ, в частности НА и $C_{60}F$, на RET и популяцию свободных ПК в проанализированной литературе отсутствуют.

В нашей работе было определено влияние углеродных НЧ на численность свободных ПК и содержание белка в гелевом чехле, то есть в матриксе RET. По аналогии с НЧ металлов (Avellan et al., 2017) для объяснения выявленных эффектов углеродных НЧ можно предположить следующий сценарий развития молекулярно-клеточных событий в корневом апексе. Иммобилизация НА и $C_{60}F$ в матриксе RET запускает окислительный стресс. В случае НА (50 мкг/мл) и $C_{60}F$ (25 мкг/мл) повышение концентрации АФК в RET приводит к нарушению процессов ремоделирования клеточных стенок ПК, связанных с поверхностью корневого апекса, снижению активности их отделения и уменьшению численности свободных ПК. Находясь в матриксе RET, НА сорбируются на клеточной стенке свободных

ПК и увеличивают активность секреции экзометаболитов. Увеличение активности секреции компенсирует дефицит свободных ПК и позволяет поддерживать содержание белка в матриксе RET на уровне контрольного варианта (рис. 2Б, 3А).

Выявленное для $C_{60}F$ в концентрации 50 мкг/мл увеличение численности свободных ПК и связанное с этим повышение содержания белка в матриксе RET может быть обусловлено увеличением сорбции $C_{60}F$ на клеточной стенке ПК, еще связанных с поверхностью апекса, и активацией их отслаивания.

Еще один аспект биологической активности НА и $C_{60}F$ связан с индукцией внутриклеточного окислительного стресса в корнях 2-суточных проростков. У растений в клеточной стенке локализуются ферменты, ответственные за продукцию активных форм кислорода в апопласте: пероксидазы III класса, аминоксидазы, гермин-подобные оксалакисидазы, хинин-редуктазы, липоксигеназы (Dauphin et al., 2022). Индуцированное углеродными НЧ ремоделирование клеточных стенок активирует эти ферменты и увеличивает продукцию активных форм кислорода в апопласте. Активные формы кислорода из апопласта переходят через плазматическую мембрану в цитоплазму, вызывают падение трансмембранного потенциала в митохондриях и активную генерацию вторичных АФК, что ведет к развитию «окислительного взрыва» (феномен АФК индуцированного образования АФК) (Zorov et al., 2000).

Снижение прооксидантной активности углеродных НЧ (уменьшение содержания КБ) при увеличении концентрации их в среде может быть обусловлено формированием на поверхности клеточных стенок крупных агрегатов НЧ, теряющих способность к генерации АФК (Yu et al., 2020).

С другой стороны, осаждение крупных агрегатов углеродных НЧ на поверхности корня и блокирование нанопор может приводить к развитию гипоксии в клетках корня. Выявленное для НА (50 мкг/мл) увеличение содержания МДА в корнях 2-суточных проростков, вероятно, является следствием индукции окислительного стресса в клетках в условиях развивающейся гипоксии (Merelli et al., 2021).

Различия выявленных дозозависимых эффектов могут быть обусловлены химическими группами, экспонированными на поверхности НЧ. Поверхностные химические группы НЧ могут определять особенности качественного и количественного спектра активных форм кислорода (Čapek, Roušar, 2021) и в результате специфику процессов ремоделирования клеточной стенки. Различия в размерной гетерогенности суспензий НА и $C_{60}F$ (средний диаметр и Pdl $1/4$ для НА в 1,8 и 2 раза соответственно меньше, чем для $C_{60}F$) не позволяют однозначно связать особенности выявленных эффектов с химией поверхности этих углеродных НЧ. Для оценки вклада химии поверхности в вариabельность эффектов НА и $C_{60}F$ необходимо использование одинаковых размерных классов НЧ. Использование в экспериментах монодисперсных суспензий НА и $C_{60}F$ позволит оценить размер-зависимую вариabельность биологической активности и выделить наиболее перспективные размерные классы НЧ, способные оказывать регуляторное воздействие на физиологию развивающегося корня проростка через индукцию «мягкого» окислительного стресса без проникновения НЧ в клетки («экстраклеточная» регуляция).

Заключение

Углеродные НЧ, $C_{60}F$ и НА оказывали влияние на процессы прорастания зерновок

пшеницы и физиологический статус развивающегося проростка: активность роста корня; численность популяции свободных ПК и их секреторную активность (содержание белка в матриксе RET); активность образования продуктов окислительной модификации белков (КБ) и липидов (МДА) в корнях проростков.

$C_{60}F$ в концентрации 5 мкг/мл увеличивали активность прорастания (эффект нанопрайминга), но не влияли на скорость роста корня развивающихся проростков. Снижение активности прорастания, выявленное для НА в концентрации 25 и 50 мкг/мл, сопровождалось ингибированием роста корня проростков. Вызванное $C_{60}F$ (50 мкг/мл) увеличение численности популяции ПК со-

провождалось повышением содержания белка в матриксе RET. НА (50 мкг/мл) и $C_{60}F$ (25 мкг/мл) снижали численность ПК без изменения содержания белка в матриксе RET. Углеродные НЧ обладали дозозависимой прооксидантной активностью. НА (5 мкг/мл) и $C_{60}F$ (5 и 25 мкг/мл) вызывали увеличение содержания КБ в корнях 2-суточных проростков. Увеличение содержания МДА наблюдалось только для НА в концентрации 50 мкг/мл.

Сравнение размеров пор в клеточной стенке и размеров агрегатов углеродных НЧ позволяет заключить, что биологическая активность исследованных $C_{60}F$ и НА не связана с их проникновением в клетку, а реализуется «экстраклеточно».

Список литературы / References

Пузырь А. П., Бондарь В. С. (2005) Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью. Патент на изобретение RU 2252192 С 2, Российская Федерация. Международная патентная классификация С 01В 31/06. Заявитель и патентообладатель Пузырь А. П. Номер заявки 2003119416/15; Дата регистрации: 26.06.2003; Дата публикации: 20.05.2005, Бюл. № 14 [Puzyr' A. P., Bondar' V. S. (2005) Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability. Patent for invention RU 2252192 С 2, Russian Federation. International Patent Classification С 01В 31/06. Applicant and patent holder Puzyr' A. P. Application number 2003119416/15; Date of registration: 26.06.2003; Date of publication: 20.05.2005, Bulletin No. 14 (in Russian)]

Пиотровский Л. Б., Киселев О. И. (2006) *Фуллерены в биологии*. Санкт-Петербург, Росток, 336 с. [Piotrovsky L. B., Kiselev O. I. (2006) *Fullerenes in biology*. St. Petersburg, Rostock, 336 p. (in Russian)]

Abdel-Aziz H. M. M., Soliman M. I., Abo Al-Saoud A. M., El-Sherbeny G. A. (2021) Waste-derived NPK nanofertilizer enhances growth and productivity of *Capsicum annuum* L. *Plants*, 10(6): 1144

Ahmed B., Khan M. S., Musarrat J. (2018) Toxicity assessment of metal oxide nano-pollutants on tomato (*Solanum lycopersicon*): A study on growth dynamics and plant cell death. *Environmental Pollution*, 240: 802–816

Ali A. S., Elozeiri A. A. (2017) Metabolic processes during seed germination. *Advances in Seed Biology*. Jimenez-Lopez J. C. (Ed.) InTech, p. 141–166

Anand A., Kumari A., Thakur M., Koul A. (2019) Hydrogen peroxide signaling integrates with phytohormones during the germination of magnetoprimed tomato seeds. *Scientific Reports*, 9(1): 8814

Antal T. K., Volgusheva A. A., Baizhumanov A. A., Kukarskikh G. P., Mezzi A., Caschera D., Ciasca G., Lambrea M. D. (2023) Nanodiamond particles reduce oxidative stress induced by methyl

viologen and high light in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6): 5615

Avellan A., Schwab F., Masion A., Chaurand P., Borschneck D., Vidal V., Rose J., Santaella C., Levard C. (2017) Nanoparticle uptake in plants: gold nanomaterial localized in roots of *Arabidopsis thaliana* by X-ray computed nanotomography and hyperspectral imaging. *Environmental Science & Technology*, 51(15): 8682–8691

Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Côme D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, 97(1): 104–110

Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1): 205–207

Bityutskii N. P., Yakkonen K. L., Puzanskiy R., Lukina K. A., Shavarda A. L., Semenov K. N. (2021) Fullerenol changes metabolite responses differently depending on the iron status of cucumber plants. *Plos One*, 16(5): e0251396

Čapek J., Roušar T. (2021) Detection of oxidative stress induced by nanomaterials in cells – the roles of reactive oxygen species and glutathione. *Molecules*, 26(16): 4710

Carreras A., Bernard S., Durambur G., Gügi B., Loutelier C., Pawlak B., Boulogne I., Vicré M., Driouich A., Goffner D., Follet-Gueye M. L. (2020) *In vitro* characterization of root extracellular trap and exudates of three Sahelian woody plant species. *Planta*, 251(1): 19

Carty J. L., Bevan R., Waller H., Mistry N., Cooke M., Lunec J., Griffiths H. R. (2000) The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2): 729–735

Caruso G., Fresta C. G., Costantino A., Lazzarino G., Amorini A. M., Lazzarino G., Tavazzi B., Lunte S. M., Dhar P., Gulisano M., Caraci F. (2021) Lung surfactant decreases biochemical alterations and oxidative stress induced by a sub-toxic concentration of carbon nanoparticles in alveolar epithelial and microglial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5): 2694

Chen J., Yang L., Li S., Ding W. (2018) Various physiological response to graphene oxide and amine-functionalized graphene oxide in wheat (*Triticum aestivum*). *Molecules*, 23(5): 1104

Chesson A., Gardner P. T., Wood T. J. (1997) Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(3): 289–295

Dauphin B. G., Ranocha P., Dunand C., Burlat V. (2022) Cell-wall microdomain remodeling controls crucial developmental processes. *Trends in Plant Science*, 27(10): 1033–1048

Global Nanotechnology Market (by Component and Applications), Funding & Investment, Patent Analysis and 27 Companies Profile & Recent Developments–Forecast to 2024 (2018) Available at: <https://www.researchandmarkets.com/research/zc7qgf/global?w=5> (accessed 6.02.22)

Hafeez M., Zeb M., Khan A., Akram B., Abdin Z. U., Haq S., Zaheer M., Ali S. (2021) *Populus ciliata* mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Microscopy Research and Technique*, 84(3): 480–488

Hawes M. C., Pueppke S. G. (1986) Sloughed peripheral root cap cells: yield from different species and callus formation from single cells. *American Journal of Botany*, 73(10): 1466–1473

Horie M., Tabei Y. (2021) Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radical Research*, 55(4): 331–342

- Hu P., An J., Faulkner M. M., Wu H., Li Z., Tian X., Giraldo J. P. (2020) Nanoparticle charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles. *ACS Nano*, 14(7): 7970–7986
- Jain N., Bhargava A., Pareek V., Akhtar M. S., Panwar J. (2017) Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles? *Ecotoxicology*, 26(2): 238–249
- Kaluç N., Thomas P. B. (2022) A carboxylated nanodiamond reduces oxidative stress and shows no sign of toxicity in yeast. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 30(4): 487–494
- Kamli M. R., Srivastava V., Hajrah N. H., Sabir J. S. M., Hakeem K. R., Ahmad A., Malik M. A. (2021) Facile bio-fabrication of Ag-Cu-Co trimetallic nanoparticles and its fungicidal activity against *Candida auris*. *Journal of Fungi*, 7(1): 62
- Kladko D. V., Falchevskaya A. S., Serov N. S., Prilepskii A. Y. (2021) Nanomaterial shape influence on cell behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10): 5266
- Liu Y., Ma Y., Jiao C., Liu M., Luo W., Dong C., Fan S., He X., Yang F., Zhang Z. (2021) Comparative toxicity of rod-shaped nano-CeO₂ and nano-CePO₄ to lettuce. *Metallomics*, 13(7): mfab033
- Liu Y., Pan B., Li H., Lang D., Zhao Q., Zhang D., Wu M., Steinberg C. E. W., Xing B. (2020) Can the properties of engineered nanoparticles be indicative of their functions and effects in plants? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205: 111128
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275
- Meramo S. I., Bonfante-Alvarez H., De Avila-Montiel G., Herrera-Barros A., Gonzalez-Delgado A. D. (2018) Environmental assessment of a large-scale production of TiO₂ nanoparticles via green chemistry. *Chemical Engineering Transactions*, 70: 1063–1068
- Merelli A., Repetto M., Lazarowski A., Auzmendi J. (2021) Hypoxia, oxidative stress, and inflammation: three faces of neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 82(s1): S 109–S 126
- Molnár Á., Rónavári A., Béteky P., Szöllösi R., Valyon E., Oláh D., Razga Z., Ordog A., Konya Z., Kolbert Z. (2020) ZnO nanoparticles induce cell wall remodeling and modify ROS/RNS signalling in roots of Brassica seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206: 111158
- Montvydienė D., Jagminas A., Jurgelėnė Ž., Kazlauskas M., Butrimienė R., Žukauskaitė Z., Kazlauskienė N. (2021) Toxicological effects of different-sized Co–Fe (CoFe₂O₄) nanoparticles on *Lepidium sativum* L.: towards better understanding of nanophytotoxicity. *Ecotoxicology*, 30(2): 277–291
- Nagayama T., Nakamura A., Yamaji N., Satoh S., Furukawa J., Iwai H. (2019) Changes in the distribution of pectin in root border cells under aluminum stress. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1216
- Nile S. H., Thiruvengadam M., Wang Y., Samynathan R., Shariati M. A., Rebezov M., Nile A., Sun M., Venkidasamy B., Xiao J., Kai G. (2022) Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture – recent developments and future perspectives. *Journal of Nanobiotechnology*, 20: 254
- Ninmanont P., Wongchai C., Pfeiffer W., Chaidee A. (2021) Salt stress of two rice varieties: root border cell response and multi-logistic quantification. *Protoplasma*, 258(5): 1119–1131
- Pan J. W., Ye D., Wang L. L., Hua J., Zhao G. F., Pan W. H., Han N., Zhu M. Y. (2004) Root border cell development is a temperature-insensitive and Al-sensitive process in barley. *Plant and Cell Physiology*, 45(6): 751–760

- Pandey K., Lahiani M.H., Hicks V.K., Hudson M.K., Green M.J., Khodakovskaya M. (2018) Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. *PloS One*, 13(8): e0202274
- Rippner D.A., Lien J., Balla H., Guo T., Green P.G., Young T.M., Parikh S.J. (2020) Surface modification induced cuprous oxide nanoparticle toxicity to duckweed at sub-toxic metal concentrations. *Science of the Total Environment*, 722: 137607
- Ropitiaux M., Bernard S., Schapman D., Follet-Gueye M. L., Vitré M., Boulogne I., Driouich A. (2020) Root border cells and mucilage secretions of soybean, *Glycine Max* (Merr) L.: characterization and role in interactions with the oomycete *Phytophthora parasitica*. *Cells*, 9(10): 2215
- Schwab F., Zhai G., Kern M., Turner A., Schnoor J.L., Wiesner M.R. (2016) Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants—Critical review. *Nanotoxicology*, 10(3): 257–278
- Shirakawa M., Matsushita N., Fukuda K. (2023) Visualization of root extracellular traps in an ectomycorrhizal woody plant (*Pinus densiflora*) and their interactions with root-associated bacteria. *Planta*, 258(6): 112
- Szőllősi R., Molnár Á., Kondak S., Kolbert Z. (2020) Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: Stimulation vs. phytotoxicity. *Plants*, 9(12): 1745
- Vincent D., Rafiqi M., Job D. (2020) The multiple facets of plant–fungal interactions revealed through plant and fungal secretomics. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1626
- Wang Q., Zhou X., He S., Wang W., Ma D., Wang Y., Zhang H. (2023) Receptor plants alleviated allelopathic stress from invasive *Chenopodium ambrosioides* L. by upregulating the production and autophagy of their root border cells. *Plants*, 12(22): 3810
- Xiong T., Zhang S., Kang Z., Zhang T., Li S. (2021) Dose-dependent physiological and transcriptomic responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to copper oxide nanoparticles—insights into the phytotoxicity mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7): 3688
- Xu J., Yang C., Ji S., Ma H., Lin J., Li H., Chen S., Xu H., Zhong M. (2023) Heterologous expression of MirMAN enhances root development and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1118548
- Yang J., Qu M., Fang J., Shen R.F., Feng Y.M., Liu J.Y., Bian J.F., Wu L.S., He Y.M., Yu M. (2016) Alkali-soluble pectin is the primary target of aluminum immobilization in root border cells of pea (*Pisum sativum*). *Frontiers in Plant Science*, 7: 1297
- Younas A., Xiukang W., Yousaf Z., Fiaz S., Riaz A., Hussain S., Huang S. (2023) Physiological and biochemical changes induced by Qiangdi nano-863 biological assistant growth apparatus during rice seed priming under temperature stress. *Brazilian Journal of Biology*, 83: e245206
- Yu Z., Li Q., Wang J., Yu Y., Wang Y., Zhou Q., Li P. (2020) Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Research Letters*, 15(1): 115
- Zafar H., Javed R., Zia M. (2023) Nanotoxicity assessment in plants: an updated overview. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(41): 93323–93344
- Zhang B., Gao Y., Zhang L., Zhou Y. (2021a) The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1): 251–272
- Zhang H., Chen S., Jia X., Huang Y., Ji R., Zhao L. (2021b) Comparison of the phytotoxicity between chemically and green synthesized silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 752: 142264

Zhang Y., Wu Y., Xu G., Song J., Wu T., Mei X., Liu P. (2017) Effects of iron toxicity on the morphological and biological characteristics of rice root border cells. *Journal of Plant Nutrition*, 40(3): 332–343

Zimmermann M. J., Bose J., Kramer E. M., Atkin O. K., Tyerman S. D., Baskin T. I. (2022) Oxygen uptake rates have contrasting responses to temperature in the root meristem and elongation zone. *Physiologia Plantarum*, 174(2): e13682

Zorov D. B., Filburn C. R., Klotz L. O., Zweier J. L., Sollott S. J. (2000) Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7): 1001–1014

EDN: VWZMMZ

УДК 574

Effect of Exogenous Salicylic Acid on the Superoxide Dismutase Activity in Cucumber Seedlings (*Cucumis sativus* L.) Under Chilling

Natalia S. Repkina*,

Anna A. Ignatenko and Vera V. Talanova

Institute of Biology, Karelian Research Centre RAS

Petrozavodsk, Russian Federation

Received 25.01.2023, received in revised form 20.06.2024, accepted 24.06.2024

Abstract. Phytohormones play a key role in adaptation to stress factors, including low temperature. There are data indicating a protective effect of salicylic acid (SA), a phenolic compound, on plants under chilling. Previously, it was shown that SA application had a positive effect on antioxidant enzyme activity but less data are available about changes in expression of genes encoding antioxidant enzymes. For this reason, the effects of exogenous SA on the superoxide dismutase (SOD) activity and *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* gene expression in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under chilling stress (12 °C and 4 °C) were investigated. An analysis of electrolyte leakage from leaf cells and malondialdehyde (MDA) content showed that cucumber seedlings could survive at the temperature of 12 °C, but the temperature of 4 °C caused a significant damage. SOD activity in leaves increased gradually for 3 days at 12 °C, while at 4 °C, it increased during the first 5 h of exposure with a further decrease. The temperature of 12 °C induced accumulation of *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* gene transcripts in leaves, whereas 4 °C did not affect gene expression. Exogenous salicylic acid (SA) (100 µM) application reduced the level of electrolyte leakage and MDA concentration but increased SOD activity and *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* gene expression at both 12 °C and 4 °C. It is suggested, that the protective role of SA under the chilling stress is associated with its involvement in the regulation of the antioxidant system of plants, particularly the activity of SOD and expression of genes encoding SOD isoforms.

Keywords: *Cucumis sativus*, antioxidants, low temperature, phytohormone, gene expression.

Acknowledgements. The study was carried out under the state order (Project FMEN-2022–0004).

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: nrt9@ya.ru

ORCID: 0000-0002-8555-4701 (Repkina N.)

Citation: Repkina N. S., Ignatenko A. A., Talanova V. V. Effect of exogenous salicylic acid on the superoxide dismutase activity in cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) under chilling. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 177–189. EDN: VWZMMZ



Влияние экзогенной предобработки салициловой кислотой на активность супероксиддисмутазы у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) при холодовом стрессе

Н. С. Репкина, А. А. Игнатенко, В. В. Таланова
*Институт биологии Карельского научного центра
Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН)
Российская Федерация, Петрозаводск*

Аннотация. Фитогормоны играют ключевую роль в адаптации растений к действию разных стресс-факторов, в том числе низких температур. Известно, что салициловая кислота (СК) – соединение фенольной природы, оказывает проекторное действие на растения в условиях гипотермии. Ранее было показано, что обработка СК положительно влияет на активность антиоксидантных ферментов, однако наряду с этим практически нет данных об ее влиянии на экспрессию генов, кодирующих эти ферменты. Учитывая это, цель данной работы заключалась в изучении влияния экзогенной обработки СК на активность супероксиддисмутазы (СОД) и экспрессию генов *Cu/Zn-SOD* и *Mn-SOD* у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) при холодовом стрессе (12 °C and 4 °C). Анализ выхода электролитов из клеток листа и содержания малонового диальдегида (МДА) показал, что проростки огурца адаптируются к действию температуры 12 °C, тогда как температура 4 °C оказывает повреждающее действие. Активность СОД в листьях огурца увеличивалась в течение 3 дней при 12 °C, тогда как при температуре 4 °C повышение активности СОД наблюдалось через 5 часов от начала воздействия, снижаясь при более длительной экспозиции. Кроме того, температура 12 °C приводила к накоплению транскриптов генов *Cu/Zn-SOD* и *Mn-SOD* в листьях огурца, в отличие от этого температура 4 °C не оказывала эффекта на экспрессию исследуемых генов. Экзогенная предобработка СК (100 мкМ) способствовала снижению выхода электролитов, концентрации МДА, а также стимулировала активность СОД и повышение экспрессии генов *Cu/Zn-SOD* и *Mn-SOD* в листьях огурца при действии низких температур 12 °C и 4 °C. Предполагается, что защитная роль СК при холодовом стрессе связана с ее участием в регуляции активности антиоксидантных ферментов, в частности СОД и экспрессии генов, кодирующих изоформы данного фермента.

Ключевые слова: *Cucumis sativus*, антиоксидантные ферменты, низкая температура, фитогормоны, экспрессия генов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания FMEN-2022–0004.

Цитирование: Репкина Н. С. Влияние экзогенной предобработки салициловой кислотой на активность супероксиддисмутазы у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) при холодовом стрессе / Н. С. Репкина, А. А. Игнатенко, В. В. Таланова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 177–189. EDN: VWZMMZ

Introduction

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is an important fruit vegetable belonging to the family Cucurbitaceae (Jeffrey, 1980). Cucumber is sensitive to low temperatures and suffers injuries at temperatures above 0 °C that affect the yield and quality of fruits (Lu, Lu, 2020). Low temperatures as well as other stresses lead to over production of reactive oxygen species (ROS) in plants that damage macromolecules (proteins, lipids, nucleic acids), which ultimately results in oxidative stress (Pal et al., 2013; Dumanović et al., 2021). Plants possess very efficient enzymatic (superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, etc.) and non-enzymatic (ascorbic acid, glutathione, phenolic compounds, etc.) antioxidant defense systems which work in concert to deal with the cascades of uncontrolled oxidation and protect plant cells from oxidative damage by scavenging ROS (Carmody et al., 2016). Superoxide dismutases (SODs) are the key enzymes catalyzing dismutation of the superoxide radical into hydrogen peroxide and oxygen (Perry et al., 2010; Dinakar et al., 2012; Miller, 2012; Dumanović et al., 2021). Based on the metal co-factor used by the enzyme, SODs are classified into three groups: iron SOD (Fe-SOD), manganese SOD (Mn-SOD) and copper-zinc SOD (Cu/Zn-SOD) (Bowler et al., 1994). Mn-SOD is present in mitochondria and peroxisomes; Cu/Zn-SOD is mainly a cytosolic, mitochondrial and plastidic enzyme; Fe-SOD has been found in the chloroplasts, cytosol, mitochondria and peroxisomes (Mittler et al., 2004; Szóllósi, 2014). One of the features of plant SOD isozymes is the multiplicity of isoforms, the number of which is species-specific. For instance, leaves of cucumber have four isoforms of Mn-SOD and

two isoforms of Cu/Zn-SOD, Fe-SOD isoforms were not observed in this plant (Lee, Lee, 2000).

SOD plays an important role in plant adaptation to different stressors by protecting cells from ROS accumulation. Previously, it was shown that SOD activity in plants increased under various stresses, such as water deficit (Zhang et al., 2007; Sánchez-Rodríguez et al., 2016), salt stress (Mandhanja et al., 2006; Yan et al., 2016), UV radiation (Tang et al., 2010; Inostroza-Blancheteau et al., 2016), heavy metals (Goswami, Das, 2016), high (Asthir et al., 2012; Chen et al., 2014) and low temperatures (Fortunato et al., 2010) and others. On the other hand, there are data indicating a decrease in activity of SOD under stress: heavy metals (Dandan et al., 2011), low temperatures (Lado et al., 2016), salt stress (Oufdou et al., 2014) and so on. This demonstrates the ambiguity of the antioxidant system reactions to stress; these reactions may vary depending on the duration and intensity of stress.

It is well known that phytohormones including salicylic acid (SA) play an essential role in plant stress tolerance (Hayat et al., 2010; Mir et al., 2021). Quite a large number of studies suggest the involvement of this important signal molecule in plant resistance to biotic stresses, whereas the information about its role in the tolerance to abiotic stress is scarce (Janda, Ruelland, 2015). It has been hypothesized that one of the mechanisms for building up resistance to abiotic stress is based on the SA effect on the antioxidant enzyme activity which prevents the development of oxidative stress and protects cells against ROS-induced damage (Pál et al., 2013; Yan et al., 2018). However, the effect of SA application on the antioxidant enzyme activity, particularly SOD, under the stress conditions is ambiguous. For instance, both positive and negative

effects of exogenous treatments with SA on SOD activity in plants were observed under cadmium stress (Agami, Mohamed, 2013; Saidi et al., 2013; Lopez-Orenes et al., 2014) and UV radiation (Choudhary, Agrawal, 2014).

The aim of this study was to investigate the effects of exogenous salicylic acid on the activity of superoxide dismutase and its encoding genes (*Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD*) in cucumber seedlings under low temperatures.

Material and methods

Plant materials and treatments

Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Zozulya) plants were grown on Hoagland nutrient solution (pH 6.2–6.4) in the growth chamber for 7 d at the air temperature of 22 °C, air relative humidity of 60–70 %, photosynthetic photon flux density (PPFD) of 180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and 14-h photoperiod. At the age of 1 week, seedlings were placed on the SA water solution (100 μM) for 24 hours, then placed back on Hoagland solution and exposed to low temperatures (12 °C or 4 °C) for 72 h. Seedlings without the SA pre-treatment served as the control.

Dry weight (DW) was evaluated after drying the leaves to a constant weight at 80 °C.

Analysis of relative electrolyte leakage

Relative electrolyte leakage (REL) was measured by the electrical conductivity method as described by Luo et al. (2005) with slight modifications. Fresh leaves were cut into pieces of 0.5 cm^2 , rinsed with deionised water and put into 30 mL of deionised water in a test tube. After 10-min infiltration of leaf samples using a vacuum pump, the tubes were stored at room temperature for 4 h. Initial electrolyte leakage (EL0) was measured using a conductometer (HANNA, Italy). The tubes were subsequently boiled at 100 °C for 30 min to release all the electrolytes into the solution, cooled to 25 °C and final electrolytic leakage (EL1)

was measured. REL was calculated according to the formula: $(\text{EL0}/\text{EL1}) \times 100$ and expressed as percentage of total conductivity.

Determination of lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation was assessed by malondialdehyde (MDA) content determined by the thiobarbituric acid reaction using the Stewart and Bewley method (1980). Cucumber leaves (0.1 g) were homogenized with 2 cm^3 5 % thiobarbituric acid in 20 % trichloroacetic acid and centrifuged at 10,000 $\times$ g for 15 min at 4 °C. The mixture was heated at 95 °C in the water bath for 30 min, then cooled quickly in the icebath and centrifuged at 10,000 $\times$ g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm and corrected for non-specific turbidity by subtracting the absorbance at 600 nm. The MDA content was calculated using the extinction coefficient of 155 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and expressed as nmol g^{-1} FW (fresh weight).

Analysis of SOD activity

Leaves of cucumber plants were separated from the stem, rapidly weighed (0.3 g fresh weight) and crushed with a pestle in an ice-cold mortar with 3 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.8). The homogenates were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C. SOD (EC 1.15.1.1) activity was determined according to Beauchamp and Fridovich (1971). One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit 50 % of photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). The reaction mixture (2 ml) contained 0.1 M K, Na-phosphate buffer (pH 7.8), 9.3 mM methionine, 152.3 μM NBT, 1.1 μM EDTA, 2.4 % Triton X-100, 111.3 μM riboflavin, and 100 μl of enzyme extract. Riboflavin was added last. The tubes were shaken and illuminated at 180 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 30 min. The tubes were then immediately covered with black cloth and the absorbance was measured spectrophotometrically at

560 nm. Total leaf soluble proteins were measured according to Bradford (1976).

Analysis of genes expression

Frozen leaf tissues were homogenised with liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total RNA was extracted using the TRizol reagent (Evrogen, Russia) as instructed by the manufacturer. Total RNA was treated with RNase-free DNase (Syntol, Russia) to remove genomic DNA. The purity and concentrations of RNA samples were determined spectrophotometrically (NanoPhotometer C 40, IMPLen, Germany), and the resultant A260/A280 ratios were within 1.8–2.0. One µg of total RNA was reverse-transcribed using the MMLV RT kit (Evrogen, Russia) following the supplier's recommendations. A quantitative real-time PCR was performed using the CFX96 Real-time System with the C 1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). PCRs were performed using the SYBR Green PCR kit (Evrogen, Russia). The PCR procedure consisted of denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 56 °C for 40 s and extension at 72 °C for 45 s. A dissociation curve was generated at the end of each PCR cycle to verify that a single product was amplified using the software with the iCycler iQ Real-time PCR Detection System. To minimize sample variations, mRNA expression of the target gene was normalized relative to the expression of the housekeeping gene encoding actin. The mRNA levels of target genes (*Cu/Zn-SOD* and *MnSOD*) were quantified in comparison to the control by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001). PCR primers of *Cu/Zn-SOD*, *MnSOD* and *actin* genes are listed below:

Cu/Zn-SOD (EF121763), forward (fw) –
5'-GACTGGGCCACATTTCACACC-3'
and reverse (rv) –
5'-GCCTTGCCATCTTCACCAA-3';

MnSOD (EF203086), fw –

5'-CAATGGCGGAGGTCACATTA-3'

and rv – 5'-AGAGCAAGCCACACCCATC-3';

actin (AB 010922), fw –

5'-GGTCGTGACCTTACTGATGC-3' and

rv – 5'-CAATAGAGGAACTGCTCTTTG-3'.

Statistical analyses

The experiment had three replicates. The data were subjected to the analysis of variance (ANOVA). Data were processed using Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and analyzed using the Statgraphics Plus 5.0 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA) statistical software. Data are presented as mean values $\pm$ standard error (SE). The Fisher's least significant difference (LSD) test was used to compare the treatment means. Differences at $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. The research was carried out using the equipment of the Core Facility Sharing of KarRC of RAS.

Results

Dry weight

At the temperature of 12 °C leaf DW of cucumber seedlings increased on day 3, whereas at 4 °C DW remained at the same level throughout the experiment (Table). SA pre-treatment did not affect cucumber leaf DW accumulation under the low temperatures.

Values include mean $\pm$ SE (n=15). Different letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ (ANOVA).

Relative electrolyte leakage

The exposure to the temperature of 12 °C resulted in a slight increase in electrolyte leakage (EL) from leaves of cucumber seedlings after one day of treatment, followed by a decrease on the 3rd day, and reached the initial values (Table). After one day at 4 °C, electrolyte leakage was 4-fold higher than the initial level and remained

Table. Effect of SA on leaf DW, electrolyte leakage and MDA content in cucumber seedlings under low temperatures

Exposure, h	Temperature, °C			
	12		4	
	SA concentration, µM		SA concentration, µM	
	0	100	0	100
Leaves DW, mg				
0	16.9 ± 0.2 ^b	17.3 ± 0.4 ^b	16.9 ± 0.2 ^b	17.3 ± 0.4 ^b
24	17.9 ± 0.5 ^{ab}	18.1 ± 0.6 ^{ab}	17.4 ± 0.3 ^b	17.8 ± 1.0 ^{ab}
72	19.4 ± 0.7 ^a	20.1 ± 0.8 ^a	17.2 ± 0.4 ^b	17.2 ± 0.5 ^b
Electrolyte leakage, %				
0	15.12 ± 0.41 ^f	14.11 ± 0.27 ^g	15.12 ± 0.41 ^f	14.11 ± 0.27 ^g
24	18.37 ± 0.67 ^e	15.30 ± 0.70 ^f	54.73 ± 1.94 ^c	45.16 ± 1.69 ^d
72	13.93 ± 0.44 ^h	12.27 ± 0.51 ⁱ	86.17 ± 1.26 ^a	74.02 ± 1.40 ^b
MDA content, nmol g ⁻¹ fresh mass				
0	8.8 ± 0.5 ^f	10.1 ± 0.4 ^e	8.8 ± 0.5 ^f	10.1 ± 0.4 ^e
24	12.1 ± 0.3 ^d	11.0 ± 0.3 ^e	15.9 ± 0.7 ^c	12.8 ± 1.1 ^d
72	16.1 ± 0.6 ^c	12.8 ± 0.5 ^d	41.7 ± 1.6 ^a	35.1 ± 1.5 ^b

increased during 3 days. It is important to note, that SA pretreatment reduced electrolyte leakage from leaf cells at optimal growth condition prior to exposure to low temperature. After one day of chilling SA pre-treatment repressed the increase of electrolyte leakage from leaf cells in comparison to untreated plants at both 12 °C and 4 °C (Table).

Lipid peroxidation rate

MDA content of leaves increased after one day of low temperature exposure (12 °C and 4 °C) and remained increased on the 3rd day of the experiment (Table). At 4 °C, the MDA content increased more significantly compared to the influence of the 12 °C exposure. SA application resulted in an increase in MDA at 12 °C on the 3rd day but its amount was lower compared to untreated plants. The same pattern was observed at 4 °C (Table).

SOD activity

It was found that the temperatures of 12 °C and 4 °C influenced SOD activity in cucumber

leaves differently. The temperature of 12 °C promoted SOD activity during 3 days of the experiment (Fig. 1A), while the temperature of 4 °C increased the activity of SOD in the initial period (5 hours), but after one day it decreased (Fig. 1B). SA treatment of cucumber seedlings had a positive effect on SOD activity. Particularly, SA-pretreatment lead to an increase in enzyme activity under 12 °C with further increase during 3 days (Fig. 1A). SA application also enhanced SOD activity at 4 °C, but on the 3rd day the enzyme activity decreased to the initial level (Fig. 1B).

Relative gene expression

The exposure of cucumber seedlings to 12 °C caused accumulation of transcripts of *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes in leaves (Fig. 2A, B). SA application resulted in an increase in the mRNA content of both *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes. With SA, *Cu/Zn-SOD* gene expression increased prior to chilling treatments as well as when exposed to 12 °C during 3 days. On the

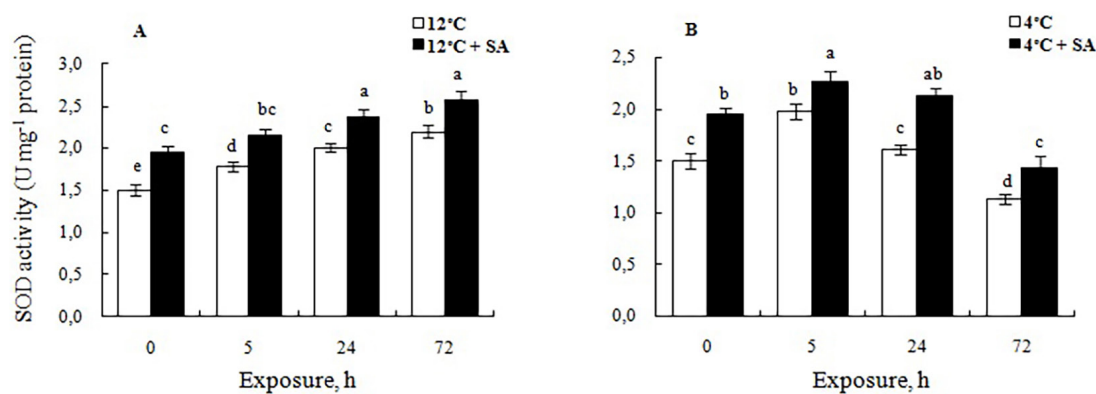


Fig. 1. Effect of low temperatures 12 °C (A) and 4 °C (B) with and without SA pre-treatment on SOD activity in the leaves of cucumber. Means $\pm$ SEs, ($n = 12$). Different letters indicate significant differences between means at $p < 0.05$ (ANOVA)

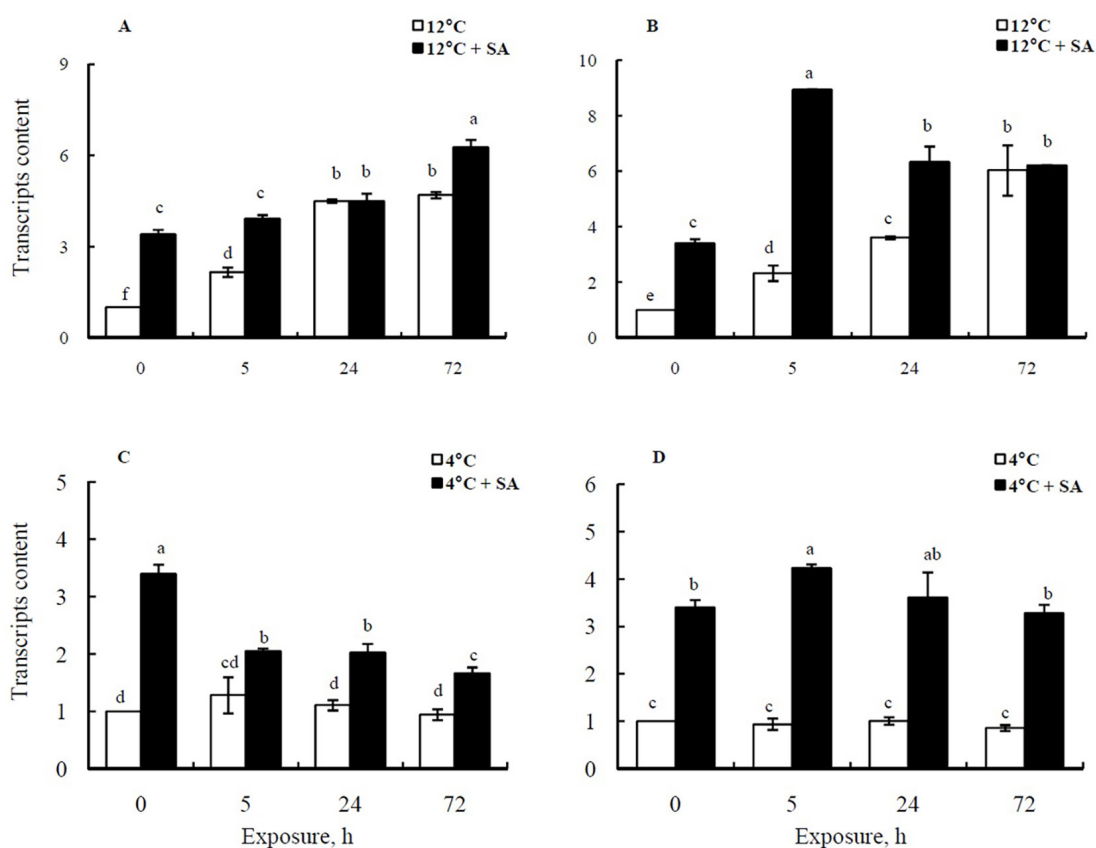


Fig. 2. Effect of low temperatures 12 °C (A, B) and 4 °C (C, D) with and without SA pre-treatment on *Cu/Zn-SOD* (A, C) and *MnSOD* (B, D) genes expression in the leaves of cucumber. Means $\pm$ SEs, ($n = 12$). Different letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$ (ANOVA)

3rd day the mRNA of *Cu/Zn-SOD* content was higher in SA-treated seedlings compared to untreated plants. In contrast, the *Mn-SOD* gene

expression was higher in SA-treated compared to untreated plants on the 1st day, but on the 3rd day no difference was observed (Fig. 2A, B).

The temperature of 4 °C did not affect the expression of *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes during 3 days of the experiment (Fig. 2C, D). SA application caused an increase in *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes expression. Moreover, mRNA content of these both genes was higher even on the 3rd day of the experiment, compared to untreated plants (Fig. 2C, D).

Discussion

It is generally accepted that environmental stresses are detrimental to plants by reducing their growth and biomass production. Nevertheless, inhibition of growth in response to low positive temperatures is one of the prerequisites for the adaptation to cold (Klimov, 2009). In the present study leaf DW increased on the 3rd day of 12 °C exposure, i.e. cucumber was capable of growing under this temperature, whereas at 4 °C DW accumulation did not occur. The decrease in DW accumulation under low temperatures was also observed previously (Cao et al., 2014). However, in our experiments SA-application did not increase DW in cucumber. A similar effect was described by Miao et al. (2020). This effect can be associated with the dose of SA; the dose-dependent effect on growth parameters was also shown by Barba-Espín et al. (2011).

It is known that one of non-specific reactions of plants to low temperatures is disturbance of membrane permeability and, consequently, an increase in electrolyte leakage from cells. In our experiments, a 24 h exposure to the temperature of 4 °C already caused an increase in electrolyte leakage from the cells of cucumber leaves, indicating a damaging effect. This effect was also supported by the data on MDA content in leaves. In contrast, even 3-day exposure to 12 °C did not negatively affect membrane permeability in leaves. According to these data, it can be assumed that cucumber plants are able to adapt to the temperature of 12 °C. It was noted, that

low temperatures can have a negative effect, but over time plants can adapt to them (hardening temperatures), while low temperatures closer to 0 °C have an extremely negative effect, which over time will lead to the death of plants (damaging temperatures). Our data are consistent with the results of other authors. For example, electrolyte leakage from the cells of cucumber plants was intensified by exposure to the temperatures of 8 °C and 2 °C (Hu et al., 2006; Qian et al., 2013), while at 12 °C the increase of electrolyte leakage was not detected (Erez et al., 2002). The MDA level also increased in cucumber plants subjected to a low temperature (Hu et al., 2006; Liu et al., 2020).

Our results indicated the protective effect of SA application on cucumber seedlings under low temperatures influence including 4 °C, when there was a considerable reduction in electrolyte leakage from the leaf cells and MDA concentration. There are data about a protective effect of SA on cell membranes of cucumber subjected to 10 °C (Lei et al., 2010), 4 °C (Sayyari, 2012) and cucumber fruits under 2 °C (Zhang et al., 2015). The dose-dependent effect of SA application on MDA content in cucumber was also described (Nie et al., 2018). These data suggest that SA pre-treatment can neutralize the negative effect of chilling on cucumber.

Low temperatures directly or indirectly intensify generation of ROS that can damage macromolecules and disrupt physiological and biochemical processes in plants. An important role in plant cell protection from ROS is performed by antioxidant enzymes that are capable of scavenging them (Pal et al., 2013; Dumanović et al., 2021). Particularly, SOD is a key enzyme which converts superoxide radicals into molecular oxygen and hydrogen peroxide (Perry et al., 2010; Zeinali et al., 2015). In our study, it was shown that SOD activity depends on the intensity and duration of exposure to low temperatures. The

12 °C treatment resulted in an increase in SOD activity in cucumber leaves, which indicates its involvement in plant adaptation to chilling. In contrast, an increase in SOD activity under the damaging temperature (4 °C) was only short-term, and a more prolonged exposure negatively affected the activity of the enzyme. Previously, it was shown that at low temperatures SOD activity increased in cucumber (Gao et al., 2009; Yang et al., 2011; Chen et al., 2015), barley (Mutlu et al., 2013), chickpea (Kazemi-Shahandashti et al., 2014), wheat (Li et al., 2014; Scebba et al., 1999). However, the response of SOD activity to chilling was ambiguous. For instance, SOD activity in cucumber plants exposed to 15 °C rose on the 2nd day of the treatment but declined on the 4th day (Gao et al., 2009; Cao et al., 2014).

In the present study, it was shown that SA application stimulated an increase in SOD activity under 12 °C and 4 °C. The positive effect of SA on SOD activity was demonstrated previously in barley under low temperatures (Mutlu et al., 2013), soybean (Ardebili et al., 2014) and radish (Bukhat et al., 2020) at high salinity, as well as in wheat and bean plants under cadmium stress (Agami, Mohamed, 2013; Saidi et al., 2013). These data suggest that regulation of the antioxidant enzyme activity by SA under stress conditions, including low temperatures, is associated with generation of hydrogen peroxide (Hayat et al., 2010). It is possible, that SA enhances tolerance of cucumber seedlings under chilling due to the increase in SOD activity and consequently, generation of H₂O₂ as a key signaling molecule involved in the cascade of reactions resulting in activation of plant defense mechanisms.

In our experiments, the temperature of 12 °C increased SOD activity in parallel with the rise in expression of *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes encoding SOD isoforms. Similar results were obtained in plants of cucumber at the temperature of 15 °C: accumulation of transcripts

of *Cu/Zn-SOD* gene was observed on the 2nd day of the exposure, but on the 4th day, their content decreased, whereas an increase in the level of *Mn-SOD* transcripts did not occur (Gao et al., 2009). In the present study, the temperature of 4 °C did not affect gene expression. Overall, these data indicate that there is no direct relation between the activity of SOD and the content of transcripts of SOD encoding genes. It could mean that regulation of SOD activity can be performed at the transcriptional and post-transcriptional levels. This conclusion is also supported by another set of data on the low activity of SOD along with up-regulation of *Cu/Zn-SOD* gene expression in cucumber under a low temperature (Cao et al., 2014). In contrast, the content of transcripts of *Cu/Zn-SOD* and *Mn-SOD* genes decreased in cucumber at dehydration, but at the same time SOD activity increased (Huang et al., 2013). In our experiments, SA application led to an increase in accumulation of *Mn-SOD* and *Cu/Zn-SOD* gene transcripts in the leaves of cucumber at hardening (12 °C) and damaging (4 °C) temperatures. It should be noted that the data on the effect of SA on the expression of the SOD encoding gene are fragmentary. According to our data, it is possible to propose, that SA can regulate SOD activity at the transcriptional level. However, the mechanisms of regulation of the expression of SOD encoding genes by SA at chilling needs further research.

Conclusions

In conclusion, it is supposed that the enzyme activity of SOD in the leaves of cucumber seedlings depends on the intensity and duration of low temperature exposure, and changes differently at hardening and damaging temperatures. Considering the fact that SA pre-treatment improved tolerance to chilling stress and led to an increase in SOD activity and accumulation of transcripts of *Cu/Zn-SOD* and

Mn-SOD genes in the leaves, we can assume that SA plays an important role in regulation of SOD activity contributing to greater plant resistance to cold stress. Thus, activation of SOD may be one of the key processes in adaptation to low temperatures induced by SA in cucumber plants.

References

- Agami R. A., Mohamed G. F. (2013) Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 164–171
- Ardebili N. O., Saadatmand S., Niknam V., Khavari-Nejad R. A. (2014) The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(12): 3199–3205
- Asthir B., Koundal A., Bains N. S. (2012) Putrescine modulates antioxidant defense response in wheat under high temperature stress. *Biologia Plantarum*, 56(4): 757–761
- Barba-Espín G., Clemente-Moreno M. J., Álvarez S., García-Legaz M. F., Hernández J. A., Díaz-Vivancos P. (2011) Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants. *Plant Biology*, 13(6): 909–917
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1): 276–287
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Asada K. (1994) Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3): 199–218
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2): 248–254
- Bukhat S., Manzoor H., Athar H.-U.-R., Zafar Z. U., Azeem F., Rasul S. (2020) Salicylic acid induced photosynthetic adaptability of *Raphanus sativus* to salt stress is associated with antioxidant capacity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(2): 809–822
- Cao Y.-Y., Yang M.-T., Li X., Zhou Z.-Q., Wang X.-J., Bai J.-G. (2014) Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents. *Scientia Horticulturae*, 179: 67–77
- Carmody M., Waszczak C., Idänheimo N., Saarinen T., Kangasjärvi J. (2016) ROS signaling in a destabilized world: A molecular understanding of climate change. *Journal of Plant Physiology*, 203: 69–83
- Chen J., Zhao Y., Chen X., Peng Y., Hurr B. M., Mao L. (2014) The role of ethylene and calcium in programmed cell death of cold-stored cucumber fruit. *Journal of Food Biochemistry*, 38(3): 337–344
- Chen A., Yang Z., Zhang N., Zhao S., Chen M. (2015) Effects of cold shock intensity on physiological activity of harvested cucumbers during storage. *Scientia Horticulturae*, 197: 420–427
- Choudhary K. K., Agrawal S. B. (2014) Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 122–132
- Dandan L., Dongmei Z., Peng W., Nanyan W., Xiangdong Z. (2011) Subcellular Cd distribution and its correlation with antioxidant enzymatic activities in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4): 874–881
- Dinakar C., Djilianov D., Bartels D. (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science*, 182: 29–41

- Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., Jačević V. (2021) The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. *Frontiers in Plant Science*, 11: 552969
- Erez A., Cohen E., Frenkel C. (2002) Oxygen-mediated cold-acclimation in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 115(4): 541–549
- Fortunato A.S., Lidon F.C., Batista-Santos P., Leitão A.E., Pais I.P., Ribeiro A.I., Ramalho J.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167(5): 333–342
- Gao J.-J., Li T., Yu X.-C. (2009) Gene expression and activities of SOD in cucumber seedlings were related with concentrations of Mn^{2+} , Cu^{2+} , or Zn^{2+} under low temperature stress. *Agricultural Sciences in China*, 8(6): 678–684
- Goswami S., Das S. (2016) Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126: 211–218
- Hayat Q., Hayat S., Irfan M., Ahmad A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1): 14–25
- Hu W.H., Shi K., Song X.S., Xia X.J., Zhou Y.H., Yu J.Q. (2006) Different effects of chilling on respiration in leaves and roots of cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11–12): 837–843
- Huang Y.-W., Nie Y.-X., Wan Y.-Y., Chen S.-Y., Sun Y., Wang X.-J., Bai J.-G. (2013) Exogenous glucose regulates activities of antioxidant enzyme, soluble acid invertase and neutral invertase and alleviates dehydration stress of cucumber seedlings. *Scientia Horticulturae*, 162: 20–30
- Inostroza-Blancheteau C., Acevedo P., Loyola R., Arce-Johnson P., Alberdi M., Reyes-Díaz M. (2016) Short-term UV-B radiation affects photosynthetic performance and antioxidant gene expression in highbush blueberry leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107: 301–309
- Janda M., Ruelland E. (2015) Magical mystery tour: Salicylic acid signaling. *Environmental and Experimental Botany*, 114: 117–128
- Jeffrey C. (1980) A review of the Cucurbitaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 81(3): 233–247
- Kazemi-Shahandashti S.-S., Maali-Amiri R., Zeinali H., Khazaei M., Talei A., Ramezanpour S.-S. (2014) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171(13): 1106–1116
- Klimov S.V. (2009) Freezing tolerance of winter wheat plants depends on adaptation of photosynthesis and respiration in different time intervals. *Biology Bulletin*, 36(3): 259–266
- Lado J., Rodrigo M.J., López-Climent M., Gómez-Cadenas A., Zacarías L. (2016) Implication of the antioxidant system in chilling injury tolerance in the red peel of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111: 214–223
- Lee D.H., Lee C.B. (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 159(1): 75–85
- Lei T., Feng H., Sun X., Dai Q.-L., Zhang F., Liang H.-G., Lin H.-H. (2010) The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 60(1): 35–42

- Li X., Cai J., Liu F., Dai T., Cao W., Jiang D. (2014) Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 34–43
- Liu F., Zhang X., Cai B., Pan D., Fu X., Bi H., Ai X. (2020) Physiological response and transcription profiling analysis reveal the role of glutathione in H₂S-induced chilling stress tolerance of cucumber seedlings. *Plant Science*, 291: 110363
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. *Methods*, 25(4): 402–408
- López-Orenes A., Martínez-Pérez A., Calderón A. A., Ferrer M. A. (2014) Pb-induced responses in *Zygophyllum fabago* plants are organ-dependent and modulated by salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84: 57–66
- Lu Y., Lu R. (2020) Enhancing chlorophyll fluorescence imaging under structured illumination with automatic vignetting correction for detection of chilling injury in cucumbers. *Computers and Electronics in Agriculture*, 168: 105145
- Luo Q., Yu B., Liu Y. (2005) Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress. *Journal of Plant Physiology*, 162(9): 1003–1012
- Mandhania S., Madan S., Sawhney V. (2006) Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 50(2): 227–231
- Miao Y., Luo X., Gao X., Wang W., Li B., Hou L. (2020) Exogenous salicylic acid alleviates salt stress by improving leaf photosynthesis and root system architecture in cucumber seedlings. *Scientia Horticulturae*, 272: 109577
- Miller A.-F. (2012) Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586(5): 585–595
- Mir R. A., Aryendu, Somasundaram R. (2021) Salicylic acid and salt stress tolerance in plants: a review. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 17(3): 32–50
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490–498
- Mutlu S., Karadağoglu Ö., Atici Ö., Taşgin E., Nalbantoğlu B. (2013) Time-dependent effect of salicylic acid on alleviating cold damage in two barley cultivars differing in cold tolerance. *Turkish Journal of Botany*, 37(2): 343–349
- Nie W., Gong B., Chen Y., Wang J., Wei M., Shi Q. (2018) Photosynthetic capacity, ion homeostasis and reactive oxygen metabolism were involved in exogenous salicylic acid increasing cucumber seedlings tolerance to alkaline stress. *Scientia Horticulturae*, 235: 413–423
- Oufdou K., Benidire L., Lyubenova L., Daoui K., El Abidine Fatemi Z., Schröder P. (2014) Enzymes of the glutathione–ascorbate cycle in leaves and roots of rhizobia-inoculated faba bean plants (*Vicia faba* L.) under salinity stress. *European Journal of Soil Biology*, 60: 98–103
- Pál M., Szalai G., Kovács V., Gondor O. K., Janda T. (2013) Salicylic acid-mediated abiotic stress tolerance. *Salicylic acid*. Hayat S., Ahmad A., Alyemeni M. (Eds.) Springer, Dordrecht, p. 183–247
- Pal R.S., Agrawal P.K., Bhatt J.C. (2013) Molecular approach towards the understanding of defensive systems against oxidative stress in plant: A critical review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(2): 131–138

- Perry J.J. P., Shin D.S., Getzoff E.D., Tainer J.A. (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 1804(2): 245–262
- Qian C.-L., Mi H.-B., Zhao Y.-Y., He Z.-P., Mao L.-C. (2013) Effect of maturity stage on the gene expression of antioxidative enzymes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruits under chilling stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(8): 1495–1500
- Saidi I., Ayouni M., Dhieb A., Chtourou Y., Chaïbi W., Djebali W. (2013) Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants: Protective role of salicylic acid. *South African Journal of Botany*, 85: 32–38
- Sánchez-Rodríguez E., Romero L., Ruiz J.M. (2016) Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. *Journal of Plant Physiology*, 190: 72–78
- Sayyari M. (2012) Improving chilling resistance of cucumber seedlings by salicylic acid. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 12(2): 204–209
- Scebba F., Sebastiani L., Vitagliano C. (1999) Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: Responses to cold acclimation. *Journal of Plant Physiology*, 155(6): 762–768
- Stewart R.R. C., Bewley J.D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65(2): 245–248
- Szöllősi R. (2014) Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview. *Oxidative damage to plants*. Ahmad P. (Ed.) The Netherlands, Elsevier, p. 89–129
- Tang K., Zhan J.-C., Yang H.-R., Huang W.-D. (2010) Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 167(2): 95–102
- Yan H., Li Q., Park S.-C., Wang X., Liu Y.-J., Zhang Y.-G., Tang W., Kou M., Ma D.-F. (2016) Overexpression of *CuZnSOD* and *APX* enhance salt stress tolerance in sweet potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109: 20–27
- Yan Y., Pan C., Du Y., Li D., Liu W. (2018) Exogenous salicylic acid regulates reactive oxygen species metabolism and ascorbate–glutathione cycle in *Nitraria tangutorum* Bobr. under salinity stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(4): 577–589
- Yang H., Wu F., Cheng J. (2011) Reduced chilling injury in cucumber by nitric oxide and the antioxidant response. *Food Chemistry*, 127(3): 1237–1242
- Zeinali F., Homaei A., Kamrani E. (2015) Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79: 627–637
- Zhang M., Duan L., Tian X., He Z., Li J., Wang B., Li Z. (2007) Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*, 164(6): 709–717
- Zhang Y., Zhang M., Yang H. (2015) Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage. *Food Chemistry*, 174: 558–563

EDN: YQATDI

УДК 574.24

Helophyte *Typha latifolia* L. as an Underestimated Biomonitor and Phytoremediator at Ultra-High Copper Concentrations: An *In-Situ* and *Ex-Situ* Study of Adaptive Responses

Grigory I. Shiryaev^a,
Galina G. Borisova^a, Maria G. Maleva^{*a},
Artem V. Sobenin^b and Adarsh Kumar^c

^aUral Federal University
named after the first President of Russia B. N. Yeltsin

^bInstitute of Mining of the Ural Branch of RAS
Ekaterinburg, Russian Federation

^cGandhi Institute of Technology and Management
Visakhapatnam, Andhra Pradesh, India

Received 22.10.2023, received in revised form 21.06.2024, accepted 24.06.2024

Abstract. *Typha latifolia* (broadleaf cattail) is a helophyte widely used for the treatment of wastewater and surface waters contaminated with multiple metals, including copper. At the same time, its potentials as a biomonitor and phytoremediator in habitats with ultra-high levels of copper pollution have not been sufficiently studied. To deal with this issue, the morphophysiological parameters of cattail were studied *in situ* at the site with extreme polymetallic pollution near the Karabash Copper Smelter (Karabash, the Chelyabinsk Region, Russia). In addition, pot-scale (*ex-situ*) experiment spiked with 2000 and 6000 mg Cu/kg of soil was carried out to study its seed progeny. Plants from the natural population exhibited a fairly high copper resistance and viability of seeds (germination index 40 %). The copper content in cattail organs was positively correlated with its concentration in the substrate. *T. latifolia* showed predominant Cu accumulation in underground organs, especially in the roots, which was 179.9 mg/kg of dry weight under natural conditions, surging to 1407.5 mg/kg of dry weight under model conditions. Helophyte seed progeny also demonstrated high copper tolerance, with biomass, leaf length, and plant height only decreasing at a copper concentration as high as 6000 mg Cu/kg soil. The content of photosynthetic pigments remained constant. An increase in the contents of hydrogen peroxide and malondialdehyde (30 % on average) was accompanied by the accumulation of non-enzymatic antioxidants

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: maria.maleva@mail.ru

ORCID: 0000-0002-1210-4283 (Shiryaev G.); 0000-0001-6663-9948 (Borisova G.); 0000-0003-1686-6071 (Maleva M.); 0000-0001-5513-5680 (Sobenin A.); 0000-0001-5343-0117 (Kumar A.)

and a significant decrease in the activities of catalase and ascorbate peroxidase. The highest correlation with Cu concentration in soil was observed for protein and non-protein thiols (0.76 on average, $p < 0.05$), which puts them forward as potential biomarkers of copper contamination. Thus, *T. latifolia* can be used for biomonitoring and phytoremediation (phytostabilization and rhizofiltration) not only at high, but also at ultra-high levels of copper pollution.

Keywords: broadleaf cattail, heavy metals, seed progeny, pot-scale experiment, photosynthetic pigments, redox reactions, biomonitoring, phytostabilization, rhizofiltration.

Acknowledgements. The reported study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the UrFU Development Program in accordance with the strategic academic leadership program “Priority-2030”.

Citation: Shiryayev G. I., Borisova G. G., Maleva M. G., Sobenin A. V., Kumar A. Helophyte *Typha latifolia* L. as an underestimated biomonitor and phytoremediator at ultra-high copper concentrations: An *in-situ* and *ex-situ* study of adaptive responses. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 190–210. EDN: YQATDI



Гелофит *Typha latifolia* L. как недооцененный биомонитор и фиторемедиатор при сверхвысоком содержании меди: исследование адаптивных реакций *in-situ* и *ex-situ*

Г. И. Ширяев^а, Г. Г. Борисова^а,
М. Г. Малева^а, А. В. Собенин^б, А. Кумар^в

^аУральский федеральный университет
им. первого Президента России Б. Н. Ельцина

^бИнститут горного дела Уральского отделения РАН
Российская Федерация, Екатеринбург

^вГанди институт технологии и менеджмента
Индия, Висакхапатнам, Андхра-Прадеш

Аннотация. *Typha latifolia* (рогоз широколистный) – гелофит, широко использующийся для очистки сточных и поверхностных вод при загрязнении металлами, включая медь. В то же время возможности его использования в качестве биомонитора и фиторемедиатора местообитаний со сверхвысоким уровнем загрязнения медью изучены недостаточно. Для решения данной проблемы были исследованы морфофизиологические параметры рогоза *in-situ* на участке с экстремальным полиметаллическим загрязнением вблизи Карабашского медеплавильного комбината (г. Карабаш, Челябинская область, Россия), а также его семенного потомства в горшечных культурах (*ex-situ*) при добавлении 2000 и 6000 мг Cu/кг почвы. Растения из природной популяции отличались достаточно высокой устойчивостью и жизнеспособностью семенного материала (индекс прорастания 40 %). Содержание меди в органах рогоза положительно коррелировало с ее концентрацией в субстрате. Рогоз показал преимущественное накопление меди в подземных

органах, особенно в корнях: в естественных условиях ее содержание составляло 179,9 мг/кг сухого веса, в то время как в модельных условиях достигало 1407,5 мг/кг сухого веса. Семенное потомство гелофита также продемонстрировало высокую устойчивость к меди: снижение биомассы, длины листьев и высоты растений наблюдалось лишь при 6000 мг Cu/кг почвы. При этом содержание фотосинтетических пигментов оставалось на постоянном уровне. Увеличение содержания пероксида водорода и малонового диальдегида (в среднем на 30 %) сопровождалось накоплением неэнзиматических антиоксидантов и существенным снижением активности каталазы и аскорбатпероксидазы. Наиболее высокая корреляция с концентрацией меди в почве была отмечена для белковых и небелковых тиолов (в среднем 0,76, $p < 0,05$), что позволяет рекомендовать их в качестве биомаркеров загрязнения этим металлом. Таким образом, рогоз может быть использован для биомониторинга и фиторемедиации (фитостабилизации и ризофилтрации) не только при высоком, но и сверхвысоком уровне загрязнения медью.

Ключевые слова: рогоз широколистный, тяжелые металлы, семенное потомство, горшечные эксперименты, фотосинтетические пигменты, редокс-реакции, биомониторинг, фитостабилизация, ризофилтрация.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Программы развития УрФУ в соответствии с программой стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Цитирование: Ширяев Г. И. Гелофит *Typha latifolia* L. как недооцененный биомонитор и фиторемедиатор при сверхвысоком содержании меди: исследование адаптивных реакций *in-situ* и *ex-situ* / Г. И. Ширяев, Г. Г. Борисова, М. Г. Малева, А. В. Собенин, А. Кумар // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 190–210. EDN: YQATDI

Introduction

There is a rapid and continuous increase in the emission of pollutants, including heavy metals (HMs). Metals can accumulate in various components of aquatic and terrestrial ecosystems, resulting in toxic effects on living organisms and increasing risks to human health (Kabata-Pendias, Mukherjee, 2007; Ashraf et al., 2019; Amir et al., 2020; Kumar et al., 2022). Water pollution by trace elements is an important factor for both geochemical cycling of the elements and environmental health (Kabata-Pendias, 2010). Helophytes (wetland plants) play an important role in purification of aquatic ecosystems due to their direct contact with both the aquatic environment and bottom sediments and ability to transform and/or accumulate the pollutants entering the hydro-

ecosystems (Grisey et al., 2012; Vroom et al., 2018; Rana et al., 2022). Thus, the search for plant species with high HM tolerance is relevant to biomonitoring and phytoremediation.

Typha latifolia L. (better known as broadleaf cattail) is one of the wetland plants that can grow in habitats with high levels of toxic elements and under low pH (Klink et al., 2013; Kumari, Tripathi, 2015). It is a large, perennial, rhizomatous plant, which belongs to helophytes with a wide habitat. Studies of the *T. latifolia* accumulative ability with respect to different HMs were carried out in natural habitats including constructed wetlands both in Russia (Kurilenko, Osmolovskaya, 2006; Brekhovskikh et al., 2009; Sviridenko et al., 2015; Maleva et al., 2019; Petrov et al., 2023; Shiryaev et al., 2024) and other countries (Grisey et al., 2012;

Klink, 2017; Parzych et al., 2016; Aucour et al., 2017; Ben Salem et al., 2017; Bonanno, Cirelli, 2017; Rana, Maiti, 2018; Hejna et al., 2020; Haghazadeh et al., 2021; Rana et al., 2022). Many researchers showed the high accumulative ability of *T. latifolia* in relation to HMs (Lyubenova, Schröder, 2011; Parzych et al., 2016; Bonanno, Cirelli, 2017; Yang, Shen, 2020; Abbas et al., 2021). However, most of the studies investigated *T. latifolia* plants growing in water bodies with low or moderate levels of pollution. Several authors carried out studies in model systems using *T. latifolia* plants treated with relatively low concentrations of HMs. For example, for copper (Cu), the range of concentrations was 0.5–10 mg L⁻¹ (Saygıdeğer et al., 2009) or 10–100 µmol L⁻¹ (Lyubenova et al., 2015); for lead (Pb), it was 5.0–7.5 mg L⁻¹ (Alonso-Castro et al., 2009), 10–250 µmol L⁻¹ (Lyubenova, Schröder, 2011) or 1–5 mmol L⁻¹ (Amir et al., 2020); and for cadmium (Cd), it was 0–30 mg kg⁻¹ (Yang, Shen, 2020) or 10–250 µmol L⁻¹ (Lyubenova, Schröder, 2011).

Among HMs, copper plays an important and ambiguous role. In small concentration, it is an essential element for living organisms, while its excessive amount negatively affects the growth and metabolism of plants, changing the processes of photosynthesis and respiration (Kumar et al., 2021; Mir et al., 2021). A major source of copper pollution is the non-ferrous metal mining and processing industries. Their activities result in the formation of artificial geochemical provinces (Yurkevich et al., 2015; Ashraf et al., 2019). One of these artificial geochemical provinces was formed in the vicinity of the city of Karabash (Russia, Chelyabinsk Region) because of the impact of the Karabash Copper Smelter (KCS) (Yurkevich et al., 2015; Tripti et al., 2021). For more than a century of KCS operation, emissions into the atmosphere and discharges of untreated industrial, mining, and domestic wastewater into the river system have led to considerable

pollution of the soil, water bodies, bottom sediments, and the atmosphere, soil degradation, and the disappearance of the surrounding vegetation (Minkina et al., 2018; Kumar et al., 2020; Shiryayev et al., 2024).

Previously, local populations of *T. latifolia* were studied in water bodies with varying degrees of polymetallic pollution, at different distances from the KCS, as compared to relatively clean natural habitats (Maleva et al., 2019; Shiryayev et al., 2024). A high positive correlation was found between the concentration of HMs in sediments and their content in aboveground and, especially, in underground organs of *T. latifolia*, which indicated the high stabilizing capacity of this helophyte and its potential as a bioindicator. Moreover, a significant increase was noted in the level of non-enzymatic antioxidants such as soluble phenolic compounds, free proline, and soluble thiols in helophyte leaves, which presumably contributed to an increase in the resistance of this species to anthropogenic impacts.

Reproductive ability is one of the most important functions for maintaining the viability of plant populations. Preserving seed productivity is especially important in conditions of high HM pollution. The danger of HM accumulation in plants lies not only in a decrease in their growth and physiological functions, but also in a significant change in the viability and quality of seed progeny. According to Vasilyev (2021), the reliability of plant adaptation mechanisms to excess HMs should be judged not only by the development indicators of treated plants, but also by the quality of their progeny, which is a guarantor of population stability.

Seeds of helophytes are material for redevelopment of plant communities and can be valuable in the wetland conservation and restoration if the seeds germinate and survive (Meng et al., 2016). There are a few works aimed at identifying optimal conditions for germination

of *T. latifolia* seeds (Bonnewell et al., 1983; Meng et al., 2016). Of particular interest is the research of the responses of metal-stressed cattail seed progeny grown in laboratory conditions from seeds of plants initially growing in habitats with extreme levels of polymetallic pollution. However, such studies are very limited. For example, Ye et al. (1997) investigated tolerance to lead, zinc, and cadmium of *T. latifolia* grown from seeds collected in metal-contaminated and non-contaminated sites, but the metal concentrations used in the experiments were low and reached 20 mg L⁻¹ (for Pb), 5.0 mg L⁻¹ (for Zn), and 0.5 mg L⁻¹ (for Cd).

Thus, despite numerous publications on HM accumulation by *T. latifolia*, there is still insufficient information about the ability of this species to grow under extreme polymetallic stress. The adaptive physiological responses that allow this helophyte to survive at ultra-high concentrations of metals, including copper, are not well understood. In addition, there are virtually no data on the ability of the seed progeny of *T. latifolia* to accumulate copper and survive at ultra-high Cu concentrations.

The specific objectives of the study include: (a) estimation of metal accumulation and morphophysiological characteristics of *T. latifolia* plants growing *in situ* at a natural heavily polluted site close to copper smelter tailing, (b) evaluating the tolerance of *T. latifolia* seed progeny plants grown *ex situ* in pot-scale experiment at high and ultra-high concentrations of copper (2000 and 6000 mg kg⁻¹ of dry soil, respectively) and the effect of copper on the growth and physiological parameters of plants, and (c) assessment of the possibility of using some physiological traits of the plant as biomarkers of contamination.

Materials and methods

The helophyte *T. latifolia* has formed natural local populations near the tailings dump of the

KCS (JSC “Karabashmed”), which has been operating for more than 100 years in the city of Karabash, the Chelyabinsk Region, Russia. The local population of *T. latifolia* growing at the tailings water site (55°27'15" N 60°12'48" E) with an extremely high level of polymetallic pollution, which subsequently forms the Ryzhiy stream (Shiryayev et al., 2024), was selected for the study (Fig. 1a).

The *in-situ* surveys of *T. latifolia* population were conducted in mid-July 2019. The morphological characteristics of 20 plants in the flowering–fruiting phase (length of shoots, length and width of leaves) were examined under natural conditions. In addition, five randomly selected plants were carefully uprooted with part of the sediments to preserve the underground organs (rhizome and roots). Surface water samples were taken in 5 replicates from the cattail site in 0.5-L plastic bottles pre-cleaned with dilute HNO₃. Plant samples with sediments were placed in separate sterile 10-L plastic containers so that their underground organs remained completely immersed in water from the study site to avoid drying and immediately transferred to the laboratory for further analysis. In addition, in early September 2019, ripe seeds were collected from *T. latifolia* growing at the study site.

The water samples (0.5 L) were fixed by 70 % HNO₃ (by lowering the pH below 2.0), digested to reduce the final volume to 10 mL by warm evaporation, and stored at 4 °C until analysis for metals. Sediment samples were taken from each *T. latifolia* root zone, air dried, homogenized, passed through a sieve (< 2 mm), and preserved for further metal analysis. The plant samples were cleaned to remove soil particles, washed with running water, treated with ultrasonication (UM-4, Unitra Unima, Olsztyn, Poland), and finally washed in deionized water (Milli-Q system, Millipore SAS, Molsheim, France). One part of the fresh plant material (leaves, rhizome, and roots)

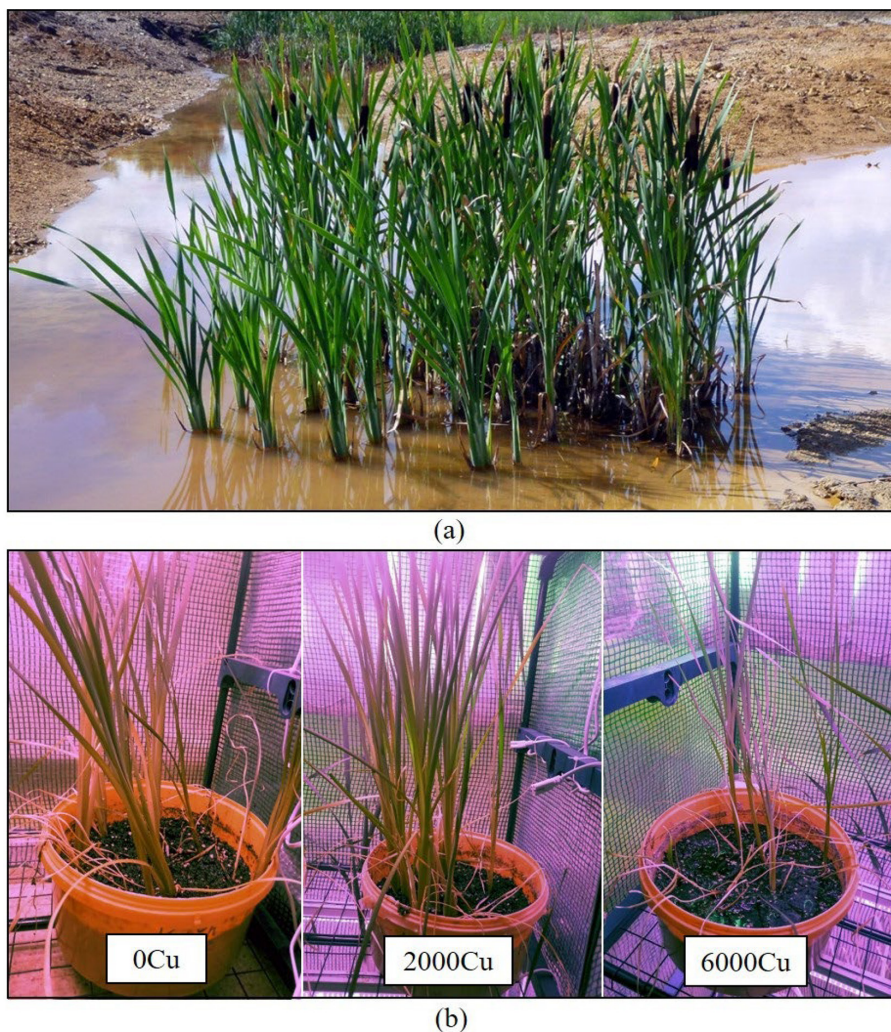


Fig. 1. The local population of *Typha latifolia* at the natural contaminated site (a) and the plant seed progeny in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations (b)

was fixed at 105 °C for 2 h and dried at 75 °C for 24 h for further metal analysis. The other part of the plant material (fresh leaves) was weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C to further measure physiological and biochemical parameters such as the content of photosynthetic pigments, lipid peroxidation products (malondialdehyde, MDA), free proline, soluble phenolic compounds, thiols, and protein. For the estimation of dry weight (DW), weighed fresh leaves (FW) were dried in a hot air oven at 75 °C for 24 h, and the ratio of FW/DW was calculated.

T. latifolia seeds previously collected *in situ* from a natural population exposed to long-term anthropogenic impact were tested for germination index in Petri dishes (100 seeds in four replicates). Then, the seedlings were grown for a year (from March 2020 to April 2021) on a watered peat substrate under natural light and at room temperature, with the addition of Hoagland's nutrient solution (200 mL per two-liter plastic container once every three weeks). After that, they were transplanted into larger (4-L) containers, to which copper (sulfate

form) was added at concentrations of 2000 and 6000 mg per kg of dry soil (Fig. 1b). The peat-based substrate containing 250 mg L⁻¹ nitrogen (NH₄+NO₃), 280 mg L⁻¹ phosphorus (P₂O₅), and 400 mg L⁻¹ potassium (K₂O) with pH 5.5 (NORD PALP, LLC, Russia) was used for pot-scale experiment. Plants grown on the Cu-free substrate were used as the control. Each treatment included 8 plants in two independent replicates. *T. latifolia* plants were grown for 4 months in a growth chamber at a temperature of 23 ± 2 °C, photoperiod of 14:10 (day: night), and lighting of 150 ± 20 μmol m⁻² s⁻¹ (using plant grow lights ULI-P10–18V/SPFR IP40). At the end of experiment, plants were carefully uprooted, cleaned to remove substrate particles, cut into organs (leaves, rhizome, and roots), and washed with running water and twice in deionized water. The growth parameters such as plant height, leaf length and width, and fresh biomass of aboveground and underground organs were measured. Part of the plant material and substrate samples were dried for further metal analysis. Some of the weighed fresh leaves were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C for further biochemical analysis.

The dried *in-situ* and *ex-situ* plant samples were weighed and digested with concentrated HNO₃ (analytical grade) using a MARS 5 Digestion Microwave System (CEM, U.S.A.). The available forms of metals in sediments and peat substrates were analyzed by extracting the soil sample (5 g) using 10 mL of 0.5 M nitric acid solution as described elsewhere (Filimonova et al., 2020). The Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Pb, Cd, and Co concentrations in all samples were determined using an AA240FS flame atomic absorption spectrometer (Varian Australia Pty Ltd., Australia). The bioconcentration factor (BCF) was calculated as the ratio of metal concentration in the *T. latifolia* leaves/rhizome/roots to its available concentration in the sediment/substrate. The metal translocation factor (TF) was calculated

as the ratio of metal content in the aboveground part (leaves) to its content in the underground organs (rhizome or roots).

Physiological and biochemical parameters in *T. latifolia* leaves were determined spectrophotometrically using an Infinite M200 PRO multimode plate reader (Tecan, Austria). The photosynthetic pigment contents were determined at 470, 647, and 663 nm after preliminary homogenization of fresh leaf cuttings (about 50 mg) and their extraction in 10 mL of 80 % cold acetone; calculations were done according to Lichtenthaler (1987). The chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*), and carotenoid contents were expressed as mg per g DW. The content of lipid peroxidation products was measured based on the level of MDA in the reaction with thiobarbituric acid by the absorption at 532 and 600 nm (Heath and Packer, 1968). The concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) was measured using a method based on the peroxide-mediated oxidation of Fe²⁺ followed by the reaction of Fe³⁺ with xylenol orange according to Bellincampi et al. (2000). The accumulation of peroxides was expressed as nmol H₂O₂ per g DW.

The content of free proline was determined after 10-min extraction of fresh leaf cuttings in boiling water (100 °C) using a modified method (Kalinkina et al., 1990) at a wavelength of 520 nm. Staining was carried out with a ninhydrin solution with the addition of glacial acetic acid in an equivalent ratio, using exact concentrations of proline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) as a standard, and expressed as mg per g DW.

The amount of soluble phenolic compounds (total phenolics and flavonoids) was determined after 24-h extraction of fresh leaf cuttings with an 80 %-ethanol solution (in darkness). The total phenolic content was measured in the reaction with the Folin–Ciocalteu reagent at 725 nm. Gallic acid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) was used as a standard (Singleton et al., 1999).

The amount of flavonoids was measured at 412 nm after reacting with 10 % aluminum chloride, using rutin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) as a standard (Chang et al., 2002).

The extraction and determination of protein and non-protein thiols were described in detail elsewhere (Maleva et al., 2009; Borisova et al., 2016). The total content of soluble thiols (–SH) was determined after reaction with Elman's reagent (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid) at 412 nm. The content of protein thiols was calculated by subtracting the amount of non-protein thiols previously obtained by precipitation of proteins with 50 % trichloroacetic acid (w/v) from the total soluble thiol fraction. Reduced glutathione (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) was used as a standard. The content of protein thiols (PT) and non-protein thiols (NPT) was expressed in μmol of –SH per g DW. The content of soluble protein was determined at a wavelength of 595 nm according to Bradford (1976) using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) as a standard.

For the determination of antioxidant activity of enzymes such as catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), and guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7), fresh leaf cuttings (0.5 g) frozen in liquid nitrogen were homogenized with a mortar and pestle and then placed into a cool 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). The homogenate was centrifuged for 20 min at $15000\times g$ at 4 °C, and the supernatant was collected for enzyme assay (Maleva et al., 2016). The activity of CAT was measured by tracking the decrease in H_2O_2 quantity in time at 240 nm (extinction coefficient of $0.036 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and was expressed as mmol of H_2O_2 decomposed per mg of protein per min. The activity of APX was measured through ascorbate oxidation in time at 290 nm (extinction coefficient of $2.8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and was expressed as mmol of oxidized ascorbate per mg of protein per min. The activity of GPX

was determined by an increase in the absorbance of the reaction medium at 470 nm as a result of guaiacol oxidation (extinction coefficient of $26.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and was expressed as mmol of oxidized tetraguaiacol per mg of protein per min.

Statistical processing of the results was carried out using STATISTICA 10.0 and Excel 16.0 software. After checking the normality by the Shapiro–Wilk test and the homogeneity of variance by Levene's test, the differences between the treatments were determined with the non-parametric Kruskal–Wallis H test and Mann–Whitney U test at $p < 0.05$. The relationship between different parameters was estimated by Spearman's rank correlation coefficient. The figures and the tables show the arithmetic mean values (Means) and their standard errors (SE); significant differences between the treatments are indicated by different letters.

Results and discussion

Determination of the chemical composition of surface water at the site where the local *T. latifolia* population was growing showed high concentrations of all studied HMs, which exceeded their maximum permissible concentrations (MPCs) for fishery water bodies (Water quality standards ..., 2016). The greatest excess was noted for Cu (2600 times), Zn, Mn (1330 times), Fe (460 times), and Ni (79 times), while Pb, Cd, and Co concentrations were 10 times higher than their MPCs on average (Table 1). The average concentrations of HMs were significantly higher compared to the data reported in other studies carried out in anthropogenically disturbed habitats of this helophyte species. For example, the concentrations of Cu, Mn, Zn, and Fe in water were several hundred times higher compared to their maximal levels in mixed samples from five ponds in the southwest of Poland (Klink et al., 2013).

Table 1. Heavy metal contents in surface water and sediments at the natural contaminated site and in the organs of *T. latifolia*

Metal	Contaminated site		<i>T. latifolia</i> organs		
	Water, g L ⁻¹	Sediments*, g kg ⁻¹ DW	Leaves, g kg ⁻¹ DW	Rhizome, g kg ⁻¹ DW	Roots, g kg ⁻¹ DW
Fe	0.046 ± 0.003	78.20 ± 3.17	0.67 ± 0.013	12.10 ± 0.42	30.81 ± 0.64
Zn	0.013 ± 0.001	9.35 ± 0.46	0.27 ± 0.013	0.46 ± 0.01	3.37 ± 0.16
	mg L ⁻¹	mg kg ⁻¹ DW	mg kg ⁻¹ DW	mg kg ⁻¹ DW	mg kg ⁻¹ DW
Mn	13.32 ± 0.94	4472.32 ± 213.76	774.03 ± 12.02	272.28 ± 10.84	515.76 ± 16.14
Cu	2.58 ± 0.11	2965.46 ± 85.66	94.62 ± 2.06	146.35 ± 8.21	179.86 ± 7.05
Ni	0.79 ± 0.03	536.98 ± 11.79	34.05 ± 0.76	139.87 ± 2.87	69.15 ± 2.27
Pb	0.061 ± 0.003	451.50 ± 17.02	8.39 ± 0.48	27.11 ± 1.26	53.58 ± 1.93
Cd	0.024 ± 0.001	23.82 ± 1.31	0.60 ± 0.03	7.99 ± 0.89	45.07 ± 2.29
Co	0.173 ± 0.004	95.39 ± 0.88	1.62 ± 0.04	2.55 ± 0.15	10.85 ± 0.48

*Available form of metals. Data are presented as Means ± SE (n = 5).

The average concentrations of HMs in sediments from the natural contaminated site (Table 1) were also considerably higher compared to the data for other contaminated habitats of *T. latifolia* reported by other authors. For example, in the present research, the concentrations of Cu and Cd were 35, Ni and Zn 28, and Mn and Pb 6 times higher than their concentrations in sediments of urban wetland (Sicily, Italy) subjected to municipal wastewater and metal contaminations (Bonanno, Cirelli, 2017). The contents of Zn and Cd in sediments were 100 times higher, Cu 40 times higher, Mn, Ni and Pb on average 10 times higher compared to the data reported for 10 sites of Bahmanshir River, Iran (Haghnazar et al., 2021). The concentrations of all studied metals in water and sediments were also considerably higher than their maximal levels measured in small water bodies of Saint Petersburg (Kurilenko, Osmolovskaya, 2006). The previous estimation of the geoaccumulation index (I_{geo}) in the water body near the study site (the Ryzhiy stream) revealed its extreme contamination ($I_{geo} > 5$) by Cu and Zn (5.3 and 6.6, respectively); heavy contamination ($3 > I_{geo} > 5$) by Ni and Cd (3.5 and 4.5, respectively); and

moderate to heavy contamination ($2 < I_{geo} < 3$) by Pb (2.8) (Shiryaev et al., 2024).

The contents of the studied HMs in *T. latifolia* organs could be arranged in the following sequences: Mn>Fe>Zn>Cu>Ni>Pb>Co>Cd in leaves and Fe>Zn>Mn>Cu>Ni>Pb>Cd>Co in both rhizome and roots (Table 1). The cattail plants accumulated HMs mainly in rhizome and roots. The contents of most metals were higher in the roots than in the rhizome: 1.9 times for Fe, Mn, Cu, and Pb, and 5.7 times for Zn, Cd, and Co, on average. The exception was nickel, the content of which in the roots was half of that in the rhizome. The preferential accumulation of HMs in the roots, compared with the rhizome, was also noted by other authors who studied their accumulation in *T. latifolia* organs (Klink et al., 2013; Bonanno, Cirelli, 2017).

The leaves of *T. latifolia* accumulated twice more Mn than the underground organs (Table 1), while the TF for other HMs was less than one. That could be explained by the developed barrier mechanisms demonstrated for cattail previously (Grisey et al., 2012; Yang, Shen, 2020). The results obtained in the current study are consistent with the data of other authors,

who found that *T. latifolia* accumulates HMs predominantly in its underground part (Alonso-Castro et al., 2009; Grisey et al., 2012; Parzych et al., 2016; Rana, Maiti, 2018; Haghazadeh et al., 2021). Moreover, some researchers reported that the TF for manganese was higher than one (Rana et al., 2022). TF values below one indicate that the plant has low efficiency of metal translocation from roots to leaves and, thus, can be used for phytostabilization purposes (Elizareva et al., 2016; Bonanno, Cirelli, 2017).

According to Chaney (1989) and Kabata-Pendias (2010), the following metal concentrations are considered critical for plants: Cu: 20–100; Ni: 10–100; Zn: 500–1500; Mn: 300–500; Pb: 30–300; Cd: 5–7 mg kg⁻¹ DW. The concentrations of Cu, Ni, Zn, and Pb in the rhizome and/or roots of *T. latifolia* were higher than their critical values by 1.6 times on average (Table 1). At the same time, the contents of most studied HMs in the leaves did not exceed critical values; the only exception was Mn, whose content was significantly (1.5 times) higher than its maximum critical concentration.

Although concentrations of metals in plant organs were higher than the critical ones, the morphological characteristics of *T. latifolia* corresponded to the usual sizes of this helophyte in a natural habitat (Table 2). For example, Lisitsyna and Papchenkov (2000) reported that *T. latifolia* height varied from 100 to 200 cm and leaf width from 1.5 to 2.0 cm. The variability of these parameters in plants from the study site was not considerable: the coefficient of variation (CV) was no more than 16 % (Table 2). The remarkable ability of this helophyte to form aboveground biomass regardless of environmental conditions and its well-developed root system are the reasons for recommending *T. latifolia* for rhizofiltration of contaminated wastewater (Lyubenova, Schröder, 2011; Elizareva et al., 2016).

As is known, excess metals can initiate the formation of reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative degradation of lipids, resulting in the accumulation of thiobarbituric acid reaction products, such as MDA, in plant cells (Sharova, 2016; Hasanuzzaman et al., 2020;

Table 2. Morphophysiological parameters of *T. latifolia* plants from the natural contaminated site

Parameters	Means ± SE	CV, %	Lim (min–max)
Plant height, cm	124.50 ± 4.08	10.36	109.10–145.04
Leaf length, cm	55.6 ± 1.75	9.97	45.01–63.02
Leaf width, cm	1.34 ± 0.07	15.81	1.10–1.80
MDA, nmol g ⁻¹ DW	151.60 ± 3.53	5.70	140.91–162.53
Chlorophyll <i>a</i> , mg g ⁻¹ DW	2.88 ± 0.23	22.74	2.12–3.77
Chlorophyll <i>b</i> , mg g ⁻¹ DW	0.97 ± 0.08	22.66	0.65–1.20
Carotenoids, mg g ⁻¹ DW	0.88 ± 0.07	22.58	0.68–1.18
Proline, mg g ⁻¹ DW	0.61 ± 0.01	10.68	0.45–0.68
Total phenolics, mg g ⁻¹ DW	19.34 ± 0.68	6.86	16.38–20.83
Flavonoids, mg g ⁻¹ DW	7.46 ± 0.30	10.92	6.48–8.03
PT, μmol g ⁻¹ DW	5.44 ± 0.39	17.61	4.38–7.12
NPT, μmol g ⁻¹ DW	0.95 ± 0.09	22.09	0.73–1.26
Soluble protein, mg g ⁻¹ DW	35.69 ± 2.61	17.94	28.30–42.40

Data are presented as means ± SE (for morphological parameters *n* = 20, for physiological and biochemical parameters *n* = 5). SE – standard error; CV – the coefficient of variation; Lim – the minimum and maximum parameter values; MDA – malondialdehyde; PT – protein thiols; NPT – non-protein thiols.

Mir et al., 2021). In a previous study (Shiryaev et al., 2024), it was reported that the MDA content in *T. latifolia* significantly correlated with the degree of sediment contamination ($r_s = 0.987$ at $p < 0.01$) and reached its maximum – 149.8 nmol g⁻¹ DW – at the most polluted site (the Ryzhiy stream). The MDA content in the leaves of *T. latifolia* growing at the study site was approximately at the same level (Table 2). The total chlorophyll content in cattail leaves was 3.9 mg g⁻¹ DW (Table 2), which approximately corresponded to its amount in *T. latifolia* watered with metalliferous water (Manios et al., 2003). The Chl *a* to Chl *b* ratio was close to 3.0 while the ratio of total chlorophyll to carotenoids was 4.4 on average. The previous study showed that the content of free proline varied from 0.43 to 0.61 mg g⁻¹ DW, soluble phenolics – from 17.5 to 35.1 mg g⁻¹ DW, and soluble thiols – from 3.0 to 6.9 µmol g⁻¹ DW. At the same time, a high positive correlation was found between these parameters and the degree of sediment contamination (Shiryaev et al., 2024). The content of these non-enzymatic antioxidants in the leaves of *T. latifolia* plants from the natural contaminated site (Table 2) was close to the previously reported values (Shiryaev et al., 2024).

The germination index of *T. latifolia* seeds collected from the natural contaminated site averaged 40 %, which indicates its fairly high viability. As is known, this index directly depends on external factors and can vary in cattail from 10 to 55 % (Bonnewell et al., 1983; Meng et al., 2016). Of particular interest is the comparison of the accumulative capacity and some morphophysiological traits of *T. latifolia* plants from the natural contaminated site (Table 2) with the responses of their seed progeny to high (2000 mg kg⁻¹ of soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of soil, 6000Cu) copper concentrations in pot-scale experiment.

With the addition of 2000Cu and 6000Cu, copper content in cattail leaves was found to be lower than in the roots by a factor of 10 and 37, respectively (Fig. 2). Compared to the control (0Cu), the copper content in plants treated with 6000Cu increased by 83 times in the roots and 3 times in the leaves. A high positive correlation was found between copper content in the soil and its accumulation in cattail organs ($r_s = 0.86$, $p < 0.001$).

Such calculated parameters as BCF and TF for copper treatments were below one (Table 3). Their values were close to those in plants from

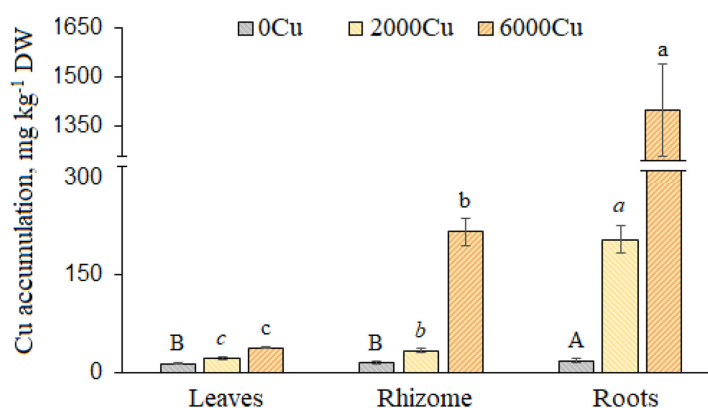


Fig. 2. Copper accumulation in different organs of *T. latifolia* in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations. Data are presented as Means ± SE (n = 5). Different letters indicate significant differences between the treatments at $p < 0.05$

Table 3. Available Cu content in soil, bioconcentration factor (BCF), and translocation factor (TF) of *T. latifolia* in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations

Parameters		Treatments		
		0Cu	2000Cu	6000Cu
Available Cu content, mg kg ⁻¹ of dry soil*		5.20 ± 0.22	1609.42 ± 90.01	3374.93 ± 45.75
Bioconcentration factor (BCF)	Leaves	2.495	0.013	0.011
	Rhizome	2.668	0.021	0.064
	Roots	3.352	0.127	0.417
Translocation factor (TF)	Leaves/Rhizome	0.935	0.640	0.175
	Leaves/Roots	0.741	0.104	0.027

*Data are presented as Means ± SE (n = 5).

Table 4. Morphophysiological parameters of *T. latifolia* in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations

Parameters		Treatment		
		0Cu	2000Cu	6000Cu
Plant height, cm		57.90 ± 5.12 b	72.37 ± 5.51 a	48.86 ± 5.65 c
Leaf length, cm		70.20 ± 6.80 b	86.50 ± 6.98 a	56.29 ± 6.45 c
Leaf width, cm		0.74 ± 0.06 a	0.64 ± 0.06 a	0.49 ± 0.05 b
Plant fresh biomass, g	Aboveground	7.27 ± 1.78 a	7.39 ± 1.14 a	4.49 ± 0.64 b
	Underground	6.96 ± 0.88 a	9.58 ± 1.18 a	2.07 ± 0.29 b
Chlorophyll <i>a</i> content, mg g ⁻¹ DW		5.96 ± 0.34 a	6.10 ± 0.29 a	6.26 ± 0.32 a
Chlorophyll <i>b</i> content, mg g ⁻¹ DW		1.97 ± 0.09 a	2.04 ± 0.11 a	2.17 ± 0.10 a

Data are presented as Means ± SE (n = 8).

the natural contaminated site: 0.05 and 0.59, on average, for BCF and TF, respectively. However, the copper BCF values calculated for *in-situ* and *ex-situ* *T. latifolia* plants were lower than the data reported by other authors (Rana, Maiti, 2018; Haghazadeh et al., 2021). This fact can be explained by the considerable concentrations of copper in the substrate, which was tens of times higher than the copper concentrations in sediments of polluted water bodies reported by other authors (Bonanno, Cirelli, 2017; Haghazadeh et al., 2021).

Copper at 2000 mg kg⁻¹ stimulated plant growth while 6000 mg kg⁻¹ inhibited it (Table 4). The negative effect of the highest copper concentration (6000Cu) was also exhibited as

the development of more necrotic lesions of *T. latifolia* leaves and their partial drying (Fig. 1).

The addition of 2000Cu increased leaf length (by 25 % of the control) and underground biomass (by 37 %), but no effect on the aboveground biomass of cattail was detected (Table 4). At ultra-high copper concentration, the length and width of the leaves, as well as the aboveground and underground biomass, significantly decreased (by half on average).

The study showed that there were no significant differences in the contents of Chl *a* and Chl *b* and in the Chl *a*/Chl *b* ratio between the treatments with and without Cu (Table 4). Interestingly, the total chlorophyll content in pot-scale experiment was higher by a factor of two compared with plants

from the natural contaminated site (Table 2), but the Chl *a*/Chl *b* ratios were similar (about 3.0 on average). The resistance of this parameter to environmental pollution by HMs was previously revealed by Shiryaev et al. (2024).

Since Cu is a redox active metal, it catalyzes the formation of ROS, such as superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals, which are involved in free radical chain reactions of membrane lipids and proteins, thus causing oxidative degradation (Mir et al., 2021). ROS and antioxidants interacting with them are considered as functionally related compounds and are defined as redox active molecules, which are the main components of redox processes involving oxygen (Pradedova et al., 2017).

In *T. latifolia* plants treated with high and ultra-high Cu concentrations, the H₂O₂ content increased by 40 % on average and MDA by 20 %, compared with the control (Fig. 3a, b), and the H₂O₂ and MDA contents were positively correlated ($r_s = 0.59$ and 0.68 , $p < 0.05$) with copper accumulation in cattail leaves. Nevertheless, the MDA level in *T. latifolia* seed progeny from pot-scale experiment was 24 % lower than in the plants from the natural contaminated site (Fig. 3b,

Table 2). The MDA content is generally considered as an indicator of cell oxidative damage (Amir et al., 2020; Hasanuzzaman et al., 2020). A significant (30–70 %) increase in its content in cattail plants treated with different HMs was also noted by other authors (Tang et al., 2005; Mamine et al., 2022). What is more, the treatment of *T. latifolia* plants with Pb and Hg increased the MDA content by 2.3–3.5 times depending on the concentration of metals (Amir et al., 2020).

Proline accumulation is a general physiological response of plants subjected to various abiotic stresses (Kaur, Asthir, 2015; Aslam et al., 2017). The content of free proline in *T. latifolia* treated with 2000Cu was the same as in the control, but at 6000Cu it increased by 20 % (Fig. 4a). However, a positive correlation ($r_s = 0.58$, $p < 0.05$) was found between soil copper concentration and proline content in cattail leaves. The rise in *T. latifolia* proline content with the increase in copper concentration to 10 mg L⁻¹ was also noted by other authors (Saygıdeger et al., 2009).

The application of 2000Cu non-significantly increased the content of carotenoids in cattail leaves, whereas at 6000Cu it was higher by

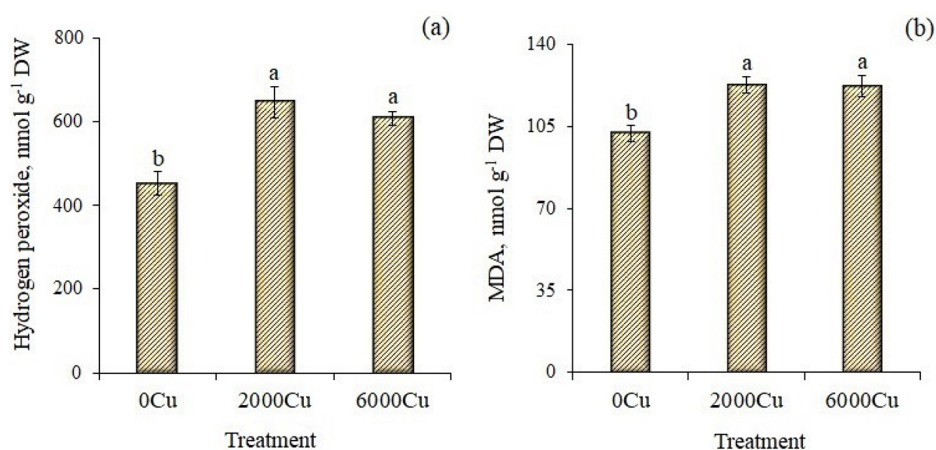


Fig. 3. Prooxidant content in the leaves of *T. latifolia* in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations: (a) hydrogen peroxide and (b) malondialdehyde (MDA)

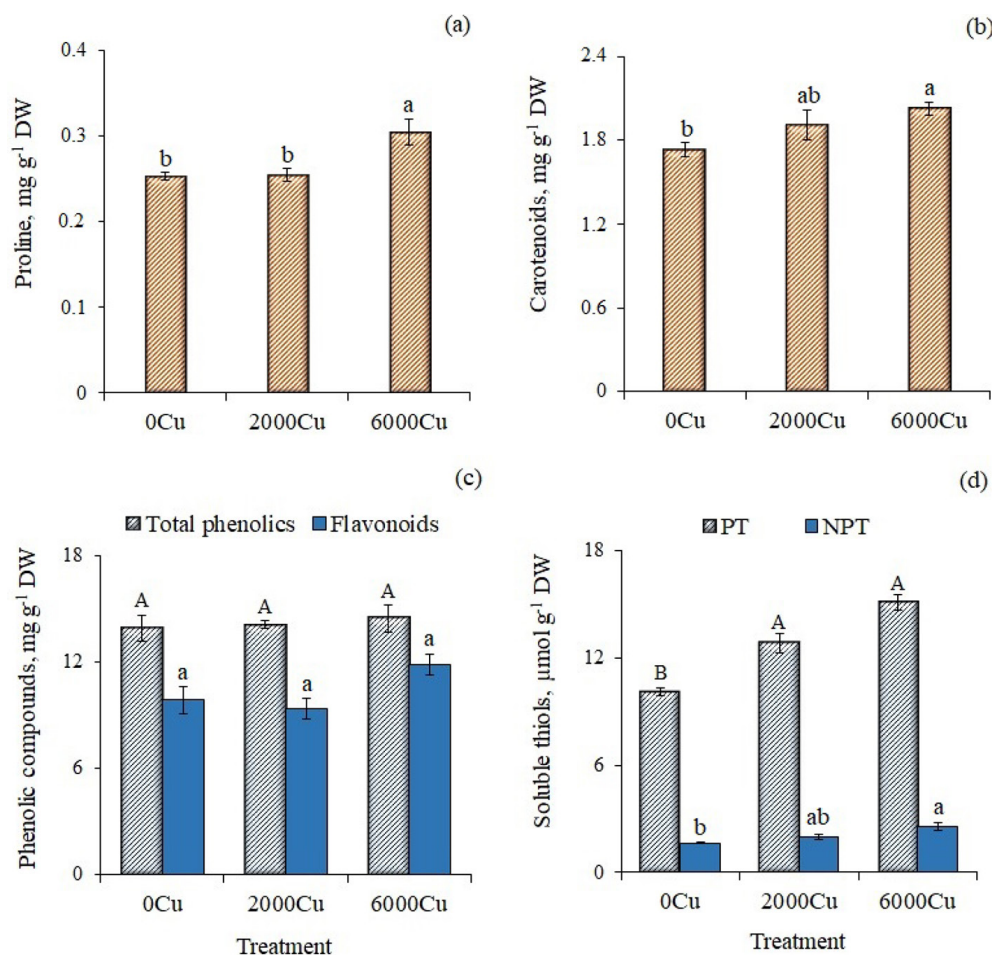


Fig. 4. Non-enzymatic antioxidant content in the leaves of *T. latifolia* in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations: (a) free proline; (b) carotenoids; (c) soluble phenolics and flavonoids; (d) soluble protein thiols (PT) and non-protein thiols (NPT). Data are presented as means $\pm$ SE (n = 9). Different letters indicate significant differences between the treatments at $p < 0.05$.

16 % (Fig. 4b). The Chl ($a + b$)/carotenoids ratio remained approximately at the same level and was slightly decreasing (from 4.6 to 4.2) with the addition of copper. In general, these values corresponded to those of *T. latifolia* from the *in-situ* site (Table 2). As is known, carotenoids are not only auxiliary photosynthetic pigments, but also important antioxidants. The antioxidant effect of carotenoids is associated with quenching of triplet chlorophyll and singlet oxygen. In addition, there is evidence of the ability of carotenoids to inhibit lipid peroxidation (Sharova, 2016).

No significant differences were found between the treatments in the total content of soluble phenolic compounds, including flavonoids in *T. latifolia* (Fig. 4c). The total content of phenolics in plants from pot-scale experiment was lower by a factor of 1.7 compared to plants in the natural contaminated site (Table 2, Fig. 4c). The opposite trend was observed for the content of flavonoids: their amount in seed progeny plants was 1.5 times higher than in the *in-situ* plants. Thus, the proportion of flavonoids in the total amount of soluble phenolics increased from 28 %

(natural contaminated site) to 74 % (pot-scale experiment).

The treatment of *T. latifolia* with copper led to an increase in the content of soluble thiols, both protein and non-protein ones, by 1.4 times on average compared to the control (Fig. 4d). At the same time, the proportion of protein thiols in their total amount was quite stable (about 86 %). There was a high positive correlation between copper concentration in leaves and soluble thiols ($r_s = 0.82$ and 0.69 , $p < 0.05$ for protein and non-protein thiols, respectively). The important role of Cu and other metals in thiol synthesis was confirmed by

our previous studies, which showed a high positive correlation between HM accumulation and soluble thiol content in several submerged and floating macrophytes (Borisova et al., 2016). The results of the present study are also consistent with research of Mamine et al. (2022), who found an increase in glutathione content by 40 % in *T. latifolia* treated with HM-polluted wastewaters. Lyubenova et al. (2015) also noted an increase in glutathione level in cattail treated with copper sulfate and cupric nitrate (by 20 and 60 %, respectively). Thus, the soluble thiols can be used as biomarkers of Cu contamination of water and sediment.

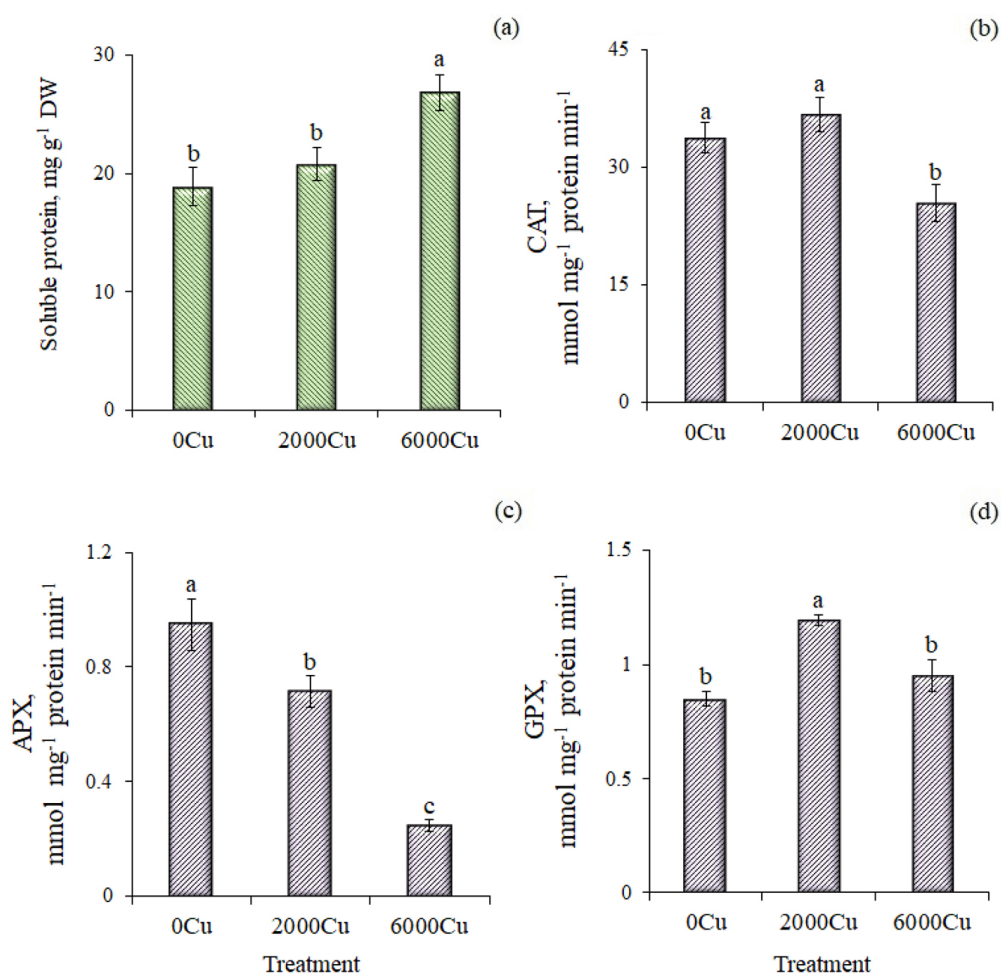


Fig. 5. Soluble protein content (a) and enzymatic antioxidant activity: (b) catalase (CAT), (c) ascorbate peroxidase (APX), and (d) guaiacol peroxidase (GPX) in the leaves of *T. latifolia* in pot-scale experiment at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil, 2000Cu) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil, 6000Cu) copper concentrations. Data are presented as Means ± SE (n = 4). Different letters indicate significant differences between the treatments at $p < 0.05$

There were no significant differences in soluble protein content between control plants and plants treated with 2000Cu. At 6000Cu, though, the content of soluble proteins increased 1.4 times compared to the control (Fig. 5a). An increase in the soluble protein content in the HM-contaminated habitats was also observed in our previous study of the *T. latifolia* responses (Shiryaev et al., 2019). The same trend was found when studying submerged and floating macrophytes (Chukina, Borisova, 2010; Shiryaev et al., 2021). Various proteins are involved in the antioxidant defense system of plants. They are capable of both directly chelating HMs and acting as enzymes, catalyzing the reactions of ROS neutralization (Kulaeva, Tsyganov, 2011).

The activity of CAT in *T. latifolia* plants treated with 2000Cu changed insignificantly, whereas at 6000Cu it decreased by 25 % compared to the control (Fig. 5b). Both copper concentrations significantly reduced the APX activity: by 25 and 74 %, respectively, for high and ultra-high concentrations (Fig. 5c). The treatment with 2000Cu stimulated GPX activity increasing it by 40 % compared with the control, while 6000Cu did not affect the activity of this enzyme (Fig. 5d). Data on changes in the activity of antioxidant enzymes in metal-stressed *T. latifolia* plants are limited. It was previously shown that activity of CAT in *T. latifolia* shoots increased with rising Cu concentrations from 10 μmol to 50 μmol , but this inductive effect was almost lost at the highest concentration (100 μmol). At the same time, APX activity in cattail shoots was significantly lower compared to the control while POX activities remained at the same level (Lyubenova et al., 2015). Lyubenova and Schröder (2011) reported that with an increase in the concentrations of Pb, Cd, and As from 10 μmol to 250 μmol , the activities of CAT and POX in the leaves of *T. latifolia* increased.

Thus, comparison of the results of *ex-situ* and *in-situ* studies did not reveal same-direction trends in changes of most parameters under polymetallic stress and single copper action. The most sensitive biomarkers of copper stress were the contents of lipid peroxidation products (MDA) and soluble thiols.

Conclusions

The present study focused on copper accumulative ability and adaptive responses of *T. latifolia* in a natural multi-metal contaminated site (*in situ*) and in pot-scale experiment (*ex situ*) at high (2000 mg kg⁻¹ of dry soil) and ultra-high (6000 mg kg⁻¹ of dry soil) copper concentrations.

In addition, the study estimated the ability of plants from the natural contaminated site to accumulate other metals.

Results of the study demonstrated that *T. latifolia* is highly resistant to long-term anthropogenic impact in the area close to the Karabash Copper Smelter, which is heavily contaminated by copper. Furthermore, the seed progeny of this helophyte in pot-scale experiment also showed resistance to high copper concentrations, which neither affected the stability of the photosynthetic pigment complex nor produced any considerable inhibitory effect on plant growth. A decrease in plant biomass was observed only at the ultra-high copper concentration in the soil, but no plant death occurred. *T. latifolia* predominantly accumulated copper in roots and rhizomes: its content was tens of times higher than phytotoxic concentrations. That was accompanied by the generation of hydrogen peroxide and accumulation of malondialdehyde and other lipid peroxidation products. The high plant resistance to Cu was apparently achieved by increasing the level of free proline and soluble thiols. Hence, helophyte *T. latifolia* is a promising species for

biomonitoring and phytoremediation processes wastewater and water bodies not only at high, but (such as phytostabilization and rhizofiltration) in also at ultra-high copper concentrations.

References

- Abbas N., Butt M. T., Ahmad M. M., Deebea F., Hussain N. (2021) Phytoremediation potential of *Typha latifolia* and water hyacinth for removal of heavy metals from industrial wastewater. *Chemistry International*, 7(2): 103–111
- Alonso-Castro A. J., Carranza-Álvarez C., Alfaro-De la Torre M. C., Chávez-Guerrero L., García-De la Cruz R. F. (2009) Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha latifolia* exposed to single and mixed metal solutions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(4): 688–696
- Amir W., Farid M., Ishaq H. K., Farid S., Zubair M., Alharby H. F., Bamagoos A. A., Rizwan M., Raza N., Hakeem K. R., Ali S. (2020) Accumulation potential and tolerance response of *Typha latifolia* L. under citric acid assisted phytoextraction of lead and mercury. *Chemosphere*, 257: 127247
- Ashraf S., Ali Q., Zahir Z. A., Ashraf S., Asghar H. N. (2019) Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174: 714–727
- Aslam M., Saeed M. S., Sattar S., Sajad S., Sajjad M., Adnan M., Iqbal M., Sharif M. T. (2017) Specific role of proline against heavy metals toxicity in plants. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(6): 27–34
- Aucour A. M., Bedell J. P., Queyron M., Thole R., Lamboux A., Sarret G. (2017) Zn speciation and stable isotope fractionation in a contaminated urban wetland soil–*Typha latifolia* system. *Environmental Science and Technology*, 51(15): 8350–8358
- Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. (2000) Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 122(4): 1379–1385
- Ben Salem Z., Laffray X., Al-Ashoor A., Ayadi H., Aleya L. (2017) Metals and metalloid bioconcentrations in the tissues of *Typha latifolia* grown in the four interconnected ponds of a domestic landfill site. *Journal of Environmental Sciences*, 54: 56–68
- Bonanno G., Cirelli G. L. (2017) Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: *Typha domingensis*, *Typha latifolia* and *Typha angustifolia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143: 92–101
- Bonnewell V., Koukkari W. L., Pratt D. C. (1983) Light, oxygen, and temperature requirements for *Typha latifolia* seed germination. *Canadian Journal of Botany*, 61(5): 1330–1336
- Borisova G., Chukina N., Maleva M., Kumar A., Prasad M. N. V. (2016) Thiols as biomarkers of heavy metal tolerance in the aquatic macrophytes of Middle Urals, Russia. *International Journal of Phytoremediation*, 18(10): 1037–1045
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2): 248–254
- Brekhovskikh V. F., Volkova Z. V., Savenco A. V. (2009) Higher aquatic vegetation and accumulation processes in the delta of river Volga. *Arid Ecosystems [Aridnye ekosistemy]*, 15(3): 34–45 (in Russian)

Chaney R. L. (1989) Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food chains. *Inorganic contaminants in the vadose zone. Ecological Studies. Vol. 74.* Bar-Yosef B., Barrow N. J., Goldshmid J. (eds.) Berlin, Heidelberg, Springer, p. 140–158

Chang C.-C., Yang M.-H., Wen H.-M., Chern J.-C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): Article 3

Chukina N. V., Borisova G. G. (2010) Structural and functional parameters of higher aquatic plants from habitats differing in levels of anthropogenic impact. *Inland Water Biology*, 3(1): 44–50

Elizareva E. N., Yanbaev Yu. A., Kulagin A. Yu. (2016) Selection of phytoremediation technologies of heavy metal-contaminated land and wastewater. *Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences* [Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya Biologiya. Nauki o Zemle], 26(3): 7–19 (in Russian)

Filimonova E., Lukina N., Glazyrina M., Borisova G., Tripti, Kumar A., Maleva M. (2020) A comparative study of *Epipactis atrorubens* in two different forest communities of the Middle Urals, Russia. *Journal of Forestry Research*, 31(6): 2111–2120

Grisey E., Laffray X., Contoz O., Cavalli E., Mudry J., Aleya L. (2012) The bioaccumulation performance of reeds and cattails in a constructed treatment wetland for removal of heavy metals in landfill leachate treatment (Etueffont, France). *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(4): 1723–1741

Haghnazar H., Hudson-Edwards K. A., Kumar V., Pourakbar M., Mahdavianpour M., Aghayani E. (2021) Potentially toxic elements contamination in surface sediment and indigenous aquatic macrophytes of the Bahmanshir River, Iran: Appraisal of phytoremediation capability. *Chemosphere*, 285: 131446

Hasanuzzaman M., Bhuyan M. H. M. B., Zulfikar F., Raza A., Mohsin S. M., Mahmud J. A., Fujita M., Fotopoulos V. (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8): 681

Heath R. L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189–198

Hejna M., Moscatelli A., Stroppa N., Onelli E., Pili S., Baldi A., Rossi L. (2020) Bioaccumulation of heavy metals from wastewater through a *Typha latifolia* and *Thelypteris palustris* phytoremediation system. *Chemosphere*, 241: 125018

Kabata-Pendias A. (2010) *Trace elements in soils and plants*. USA, CRC Press LLC, 548 p.

Kabata-Pendias A., Mukherjee A. B. (2007) *Trace elements from soil to human*. Heidelberg, Springer-Verlag, 550 p.

Kalinkina L. G., Nazarenko L. V., Gordeeva E. E. (1990) Modified method for extraction of free amino acids and their determination in amino acid analyzer. *Soviet Plant Physiology* [Fiziologiya rastenii], 37(3): 617–621 (in Russian)

Kaur G., Asthir B. (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*, 59(4): 609–619

Klink A. (2017) A comparison of trace metal bioaccumulation and distribution in *Typha latifolia* and *Phragmites australis*: implication for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4): 3843–3852

Klink A., Macioł A., Wisłocka M., Krawczyk J. (2013) Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L. (cattail) and their potential use in bioindication. *Limnologica*, 43(3): 164–168

- Kulaeva O.A., Tsyganov V.E. (2011) Molecular-genetic basis of cadmium tolerance and accumulation in higher plants. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 1(5): 349–360
- Kumar A., Tripti, Maleva M., Kiseleva I., Maiti S.K., Morozova M. (2020) Toxic metal(loid)s contamination and potential human health risk assessment in the vicinity of century-old copper smelter, Karabash, Russia. *Environmental Geochemistry and Health*, 42(12): 4113–4124
- Kumar A., Tripti, Raj D., Maiti S.K., Maleva M., Borisova G. (2022) Soil pollution and plant efficiency indices for phytoremediation of heavy metal(loid)s: two-decade study (2002–2021). *Metals*, 12(8): 1330
- Kumar V., Pandita S., Singh Sidhu G.P., Sharma A., Khanna K., Kaur P., Bali A.S., Setia R. (2021) Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere*, 262: 127810
- Kumari M., Tripathi B.D. (2015) Efficiency of *Phragmites australis* and *Typha latifolia* for heavy metal removal from wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112: 80–86
- Kurilenko V.V., Osmolovskaya N.G. (2006) Ecological-biogeochemical role of macrophytes in aquatic ecosystems of urbanized territories (an example of small water bodies of St. Petersburg). *Russian Journal of Ecology*, 37(3): 147–151
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382
- Lisitsyna L.I., Papchenkov V.G. (2000) *Flora of Russian reservoirs: Key to Vascular plants*. Moscow, Nauka, 237 p. (in Russian)
- Lyubenova L., Bipuah H., Belford E., Michalke B., Winkler B., Schröder P. (2015) Comparative study on the impact of copper sulphate and copper nitrate on the detoxification mechanisms in *Typha latifolia*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1): 657–666
- Lyubenova L., Schröder P. (2011) Plants for waste water treatment – Effects of heavy metals on the detoxification system of *Typha latifolia*. *Bioresource Technology*, 102(2): 996–1004
- Maleva M., Borisova G., Chukina N., Kumar A., Prasad M.N.V. (2016) High dose of urea enhances the nickel and copper toxicity in Brazilian elodea (*Egeria densa* Planch. Casp.). *Brazilian Journal of Botany*, 39(3): 965–972
- Maleva M.G., Borisova G.G., Shiryayev G.I., Kumar A., Morozova M.V. (2019) Adaptive potential of *Typha latifolia* L. under extreme technogenic pollution. *AIP Conference Proceedings*, 2063(1): 030013
- Maleva M.G., Nekrasova G.F., Malec P., Prasad M.N.V., Strzałka K. (2009) Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere*, 77(3): 392–398
- Mamine N., Khaldi F., Grara N. (2022) *Typha latifolia* as a tool for biomonitoring of hazardous domestic effluents. *Disaster risk reduction for resilience*. Eslamian S., Eslamian F. (eds.) Switzerland, Springer Nature Switzerland AG, p. 191–204
- Manios T., Stentiford E.I., Millner P.A. (2003) The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecological Engineering*, 20(1): 65–74
- Meng H., Wang X., Tong S., Lu X., Hao M., An Y., Zhang Z. (2016) Seed germination environments of *Typha latifolia* and *Phragmites australis* in wetland restoration. *Ecological Engineering*, 96: 194–199

- Minkina T. M., Linnik V. G., Nevidomskaya D. G., Bauer T. V., Mandzhieva S. S., Khoroshavin V. Y. (2018) Forms of Cu (II), Zn (II), and Pb (II) compounds in technogenically transformed soils adjacent to the Karabashmed copper smelter. *Journal of Soils and Sediments*, 18(6): 2217–2228
- Mir A. R., Pichtel J., Hayat S. (2021) Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *BioMetals*, 34(4): 737–759
- Parzych A., Cymer M., Macheta K. (2016) Leaves and roots of *Typha latifolia* L. and *Iris pseudacorus* L. as bioindicators of contamination of bottom sediments by heavy metals. *Limnological Review*, 16(2): 77–83
- Petrov D. S., Korotaeva A. E., Pashkevich M. A., Chukaeva M. A. (2023) Assessment of heavy metal accumulation potential of aquatic plants for bioindication and bioremediation of aquatic environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(1): 122
- Pradedova E. V., Nimaeva O. D., Salyaev R. K. (2017) Redox processes in biological systems. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(6): 822–832
- Rana V., Bandyopadhyay S., Maiti S. K. (2022) Potential and prospects of weed plants in phytoremediation and eco-restoration of heavy metals polluted sites. *Phytoremediation technology for the removal of heavy metals and other contaminants from soil and water*. Kumar V., Shah M. P., Shahi S. K. (eds.) Amsterdam, Elsevier Inc., p. 187–205
- Rana V., Maiti S. K. (2018) Municipal wastewater treatment potential and metal accumulation strategies of *Colocasia esculenta* (L.) Schott and *Typha latifolia* L. in a constructed wetland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(6): 328
- Saygıdeğer S. D., Dogan M., Gültekin Z. G. (2009) Effects of copper on amounts of photosynthetic pigments, nitrogen and free proline in the aquatic macrophyte *Typha latifolia* L. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(5): 543–548
- Sharova E. I. (2016) *Antioxidants of plants*. St. Petersburg, St. Petersburg University, 140 p. (in Russian)
- Shiryayev G. I., Maleva M. G., Borisova G. G. (2019) Estimation of phytoremediation potential of *Phragmites australis* and *Typha latifolia* in the activity area of copper smelter. *Proceeding of XV International Scientific-Practical Symposium and Exhibition «Clean water of Russia»*. Prokhorova N. B., Valek N. A., Krylova E. I., Kochev A. B. (eds.) Ekaterinburg, p. 110–113 (in Russian)
- Shiryayev G. I., Borisova G. G., Shchukina D. A., Chukina N. V., Sobenin A. V., Maleva M. G. (2021) Redox reactions in *Hydrocharis morsus-ranae* L. under industrial impacts. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 14(3): 296–305
- Shiryayev G., Maleva M., Borisova G., Tripti, Voropaeva O., Kumar A. (2024) Phytomitigation potential and adaptive responses of helophyte *Typha latifolia* L. to copper smelter-influenced heavily multi-metal contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 31: 38821–38834
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178
- Sviridenko B. F., Sviridenko T. V., Murashko Yu. A., Kravchenko I. V. (2015) Content of heavy metals and petrochemicals in the ecotopes of aquatic macrophytes in the forest and the forest-steppe zones of the West Siberian Plain. *Surgut State University Journal [Vestnik Surgutskogo gosudarstvennogo universiteta]*, 3: 53–60 (in Russian)

Tang C. F., Liu Y. G., Zeng G. M., Li X., Xu W. H., Li C. F., Yuan X. Z. (2005) Effects of exogenous spermidine on antioxidant system responses of *Typha latifolia* L. under Cd²⁺ stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(4): 428–434

Tripti, Kumar A., Maleva M., Borisova G., Chukina N., Morozova M., Kiseleva I. (2021) Nickel and copper accumulation strategies in *Odontarrhena obovata* growing on copper smelter-influenced and non-influenced serpentine soils: a comparative field study. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(4): 1401–1413

Vasilyev D. V. (2021) Effect of zinc contaminated soil on the seeds progeny about barley. *European Journal of Natural History*, 1: 3–6

Vroom R. J. E., Xie F., Geurts J. J. M., Chojnowska A., Smolders A. J. P., Lamers L. P. M., Fritz C. (2018) *Typha latifolia* paludiculture effectively improves water quality and reduces greenhouse gas emissions in rewetted peatlands. *Ecological Engineering*, 124: 88–98

Water quality standards for fishery water bodies, including standards for maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of fishery water bodies (2016) [Electronic resource] Access: <https://docs.cntd.ru/document/420389120?ysclid=lna7bc13ca152097771> (in Russian)

Yang Y., Shen Q. (2020) Phytoremediation of cadmium-contaminated wetland soil with *Typha latifolia* L. and the underlying mechanisms involved in the heavy-metal uptake and removal. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(5): 4905–4916

Ye Z. H., Baker A. J. M., Wong M. H., Willis A. J. (1997) Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*. *New Phytologist*, 136(3): 469–480

Yurkevich N. V., Saeva O. P., Karin Y. G. (2015) Geochemical anomalies in two sulfide-bearing waste disposal areas: Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, and As in contaminated waters and snow, Kemerovo and Chelyabinsk regions, Russia. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 97(1): 76–89

EDN: SVPDIQ

УДК 504.054

The Current Ecological State of Water and Bottom Sediments in Lakes Krugloye and Maltsevo in the Tomsk Region

Irina S. Korol*,

Daria I. Chuikina and Natalia A. Mukhortina

Tomsk Branch of Trofimuk

Institute of Petroleum-Gas Geology and Geophysics SB RAS

Tomsk, Russian Federation

Received 08.04.2022, received in revised form 20.06.2024, accepted 25.06.2024

Abstract. The state of freshwater ecosystems has been studied for several decades and extensively reported in the scientific literature. Programs aimed at water protection and water quality management should include geochemical monitoring of the pollutants and evaluation of the physical-chemical and biochemical processes in natural water ecosystems (both surface water and bottom sediment). The purpose of the present study was to assess the initial state of the surface water and bottom sediments (BS) of Lakes Krugloye and Maltsevo as the basis for further environmental monitoring and evaluation of the anthropogenic impact on them. The methods used to achieve this aim included extraction and determination of organic and inorganic compounds using high-performance chromatography, capillary electrophoresis, electron spectrophotometry, and X-ray fluorescence analysis. The study shows that bottom sediments of these lakes can be classified as moderately polluted, with the total content of hydrocarbons in them varying from 58.14 to 82.20 ng/g. The content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the surface water samples varies from 0.01 to 0.13 µg/L for different compounds and in the bottom sediments – from 0.11 to 14.44 ng/g. The mixture of PAHs in the water samples contains increased amounts of such compounds as naphthalene, fluorene, phenanthrene, and benza[a]ntracene. The lighter bi- or tricyclic polyarenes, which have higher solubility, predominate in water, in contrast to bottom sediments. The contents of ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , and F^-) and heavy metals do not exceed their maximum permissible concentration (MPC) values. The natural pigments identified in the BS suggest the satisfactory hydrobiological status of the lakes and indicate normal function of algal communities. The study demonstrates that Lakes Maltsevo and Krugloye can be regarded as reference water bodies, and the proposed integrated approach is an efficient tool for

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: irinakorol@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-5906-2148 (Chuikina D.)

assessing the ecological status of the lakes, which can be used as the basis for further lake monitoring.

Keywords: surface waters, bottom sediments, polyaromatic hydrocarbons, heavy metals, natural pigments, anthropogenic impact.

Acknowledgements. This research was performed as part of State Assignment FWZZ-2022–0016.

Citation: Korol I. S., Chuikina D. I., Mukhortina N. A. The current ecological state of water and bottom sediments in Lakes Krugloye and Maltsevo in the Tomsk Region. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 211–224. EDN: SVPDIQ



Первичная оценка экологического состояния вод и донных отложений озер Круглое и Мальцево Томской области

И. С. Король, Д. И. Чуйкина, Н. А. Мухортина
*Институт нефтегазовой геологии и геофизики
им. А. А. Трофимука СО РАН, Томский филиал
Российская Федерация, Томск*

Аннотация. Состояние пресноводных экосистем изучается уже на протяжении многих десятилетий, и результаты этих исследований широко освещаются в научной литературе. Разработка программ, направленных на охрану и контроль качества вод, должна включать геохимический мониторинг загрязняющих веществ, оценку физико-химических и биохимических процессов в природных водных экосистемах (как поверхностных водах, так и в донных отложениях). Целью работы было определение исходного состояния поверхностных вод и донных отложений (ДО) озер Круглое и Мальцево для дальнейшего экологического мониторинга и оценки влияния на них антропогенной нагрузки. Комплексный подход для решения этой задачи включал в себя такие методы, как экстракция, определение органических и неорганических соединений с применением высокоэффективной хроматографии, капиллярного электрофореза, электронной спектрофотометрии, рентгенофлуоресцентного анализа. Показано, что донные отложения этих озер могут быть отнесены к умеренно загрязненным, суммарное содержание углеводородов изменяется от 58,14 до 82,2 нг/г. Содержание полиароматических соединений (ПАУ) в изученных пробах поверхностных вод изменяется от 0,01 до 0,13 нг/л для различных соединений, а в донных отложениях от 0,11 до 14,44 нг/г. В смеси ПАУ в водных образцах отмечается повышенное содержание таких соединений, как нафталин, флуорен и фенантрен, а также бенз[а]антрацен. В целом в воде, по сравнению с донными отложениями, преобладают более легкие 2–3-ядерные полиарены, обладающие лучшей растворимостью. Содержание ионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , F^-), а также тяжелых металлов не превышает предельно допустимых концентраций (ПДК). Природные пигменты, определенные в ДО, позволяют охарактеризовать гидробиологическое состояние озер как удовлетворительное и указывают на нормальное

функционирование водорослевых сообществ. Исследования показали, что озера Мальцево и Круглое могут рассматриваться как фоновые объекты, а предложенный комплексный подход эффективен для оценки экологического состояния озер и может использоваться как основа для дальнейших мониторинговых исследований.

Ключевые слова: поверхностные воды, донные отложения, полиароматические углеводороды, тяжелые металлы, природные пигменты, антропогенная нагрузка.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного задания FWZZ-2022–0016.

Цитирование: Король И. С. Первичная оценка экологического состояния вод и донных отложений озер Круглое и Мальцево Томской области / И. С. Король, Д. И. Чуйкина, Н. А. Мухортина // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 211–224. EDN: SVPDIQ

Introduction

The ecological state of natural water bodies has attracted considerable research effort since the second half of the 20th century. In 1972, the National Service for Observation and Monitoring of the State of the Environment (NSOM), based on weather stations, was established in Russia. The major tasks of special observations and research performed in the framework of the NSOM are as follows:

- to identify the common mechanisms of self-purification;
- to determine the impact of the pollutants accumulated in bottom sediments on the water quality;
- to analyze balance of pollutants (chemical substances) in the water bodies or water course segments;
- to assess the dispersal of the chemical substances through the river outlet; to assess the transfer of chemical substances with the collector and drainage waters, etc. (Petin et al., 2006).

The assessment of the ecological status of water bodies should be based on an integrated approach. However, the studies dealing with the state of natural objects frequently focus on determining the contents of polyaromatic hydrocarbons and natural pigments in the

surface waters and bottom sediments (Belyaeva et al., 2018; Zimnik, Semenov, 2011; Kramer, Tikhonova, 2012; Semenov et al., 2017). Furthermore, the monitoring studies are generally carried out at large lakes of great importance (such as Lake Baikal, Lake Ladoga, etc. (Zimnik, Semenov, 2011; Takhteev et al., 2020; Belkina et al., 2015; Sharipova, 2015)), while small lakes remain overlooked.

In order to understand the reasons for the changes in the ecological and trophic states of the lakes and to get an insight into the mechanisms of these changes, it is necessary to conduct continuous monitoring taking into account a variety of biological, climatic, and anthropogenic factors influencing the water systems. The necessity to conduct long-term monitoring of the hydrologic regimes of the water bodies is caused by water level variations, which frequently result from the improper use of the lakes and adjacent areas. It is known for a fact that water level fluctuations give rise to variations in the chemical and biological characteristics of the water systems (Hydrology, 2010; Savkin et al., 2005).

“Lake System of the Settlement of Samus’” is a local-scale nature conservation area, which is located in the vicinity of the settlement of Samus’, 21 km north of Tomsk (the Tomsk

Region), on the right bank of the Tom River arm across from the Kizhirovskii island. The area was given the preferential conservation status in order to preserve a unique water ecosystem of an environmental, scientific, esthetic, recreational, and health-promoting significance for the citizens of the towns of Seversk and Tomsk. This area includes a unique natural site with small forest lakes Maltsevo, Krugloye, and Yakovo. The total area of this ecosystem is 3732 ha.

All of these lakes have sandy bottoms; their water has a deep brown shade, as the lakes are supplied by the streams originating in the peat bogs. Lakes Maltsevo and Krugloye form a single limnetic system connected by a stream; they are associated with the second terrace rising above the floodplain of the Tom River and form a cascade in the local relief.

The status of the nature conservation area does not protect Lakes Maltsevo and Krugloye from the anthropogenic impact. The lakes and the neighboring area are a favorite recreational zone of the local population, with the beach and barbecue sites.

The purpose of the present study was to characterize the current state of the surface waters and bottom sediments (BS) of Lakes Krugloye and Maltsevo in order to provide the

basis for their further ecological monitoring and assessment of the anthropogenic impact.

Materials and methods

The small area of the water surface of the Lakes – Krugloye about 0.23 km² and Maltsevo 0.28 km² – makes it possible to sample water from the opposite shores as an essential minimum for a primary assessment of their geochemical and ecological state (Fig.). The lakes have gently sloping bottoms; the maximum depth is 4–5 meters.

Samples were collected from two sites in each lake (Fig.; Site 1 – N 56°45'00,8" E 84°44'33,8"; Site 2 – N 56°45'02,1" E 84°44'14,1"; Site 3 – N 56°45'08,6" E 84°42'22,1"; Site 4 – N 56°45'13,6" E 84°42'44,9") in August 2021. The water samples were collected from a depth of 0.4–0.6 m from the surface, followed by their n-hexane preservation. The BS samples were taken from a depth of 0–10 cm using a PDO-500 sampler; they consisted of fine-grained sand with single inclusions of plant debris.

In the water and BS samples, we determined the total content of hydrocarbons (HCs) using the Russian Federation environmental protection regulation documents PND F 14.1:2.116–97 and RD 52.18.647–2003. Extraction of organic

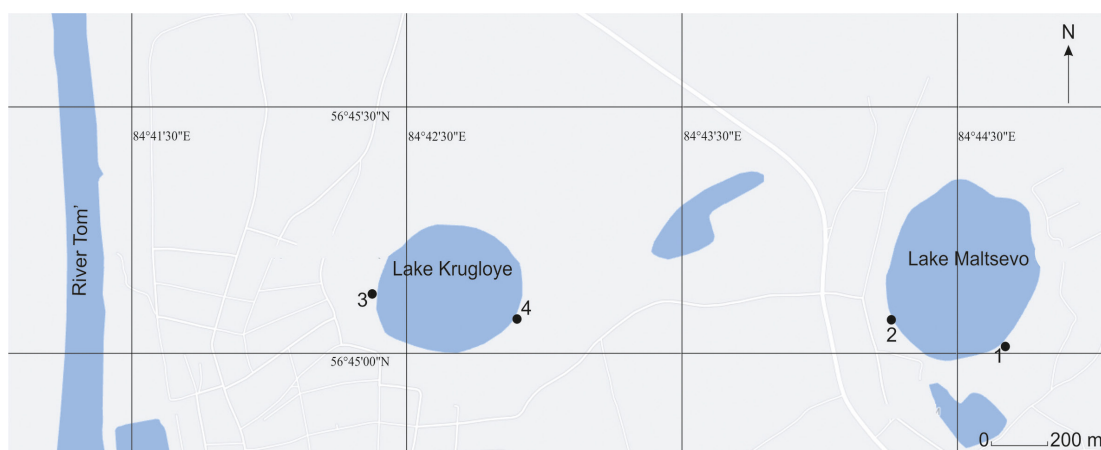


Fig. Sampling sites in Lakes Maltsevo and Krugloye

hydrocarbons from the water and soil was performed using a triple chloroform extraction followed by a cleanup of the extract by the method of chromatography in a column packed with alumina (Al_2O_3) of level II activity ratio.

The content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water sample was determined in accordance with the current governmental environmental control procedure PND F 14.1:2:4.70–96. The PAHs were extracted using *n*-hexane (Ecos, Russia; 99.9 %). The resulting extract was boiled down to a trace concentration of hexane and the sample volume was made up to 1 ml using acetonitrile. The PAHs from the bottom sediments were extracted according to the RD 52.24.537–2019 procedure. A weighted (10 g) sample was triple-extracted by a mixture of hexane and acetonitrile in the ratio of 10:1. The extracts were filtered through a paper filter into a test vial and vacuum concentrated to a volume of 0.5 ml. The resulting extract was cleaned up by the method of thin-layer alumina chromatography and the sample volume was made up to 1 ml using acetonitrile for the subsequent analysis. The content of PAHs in water and BS was determined by the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Shimadzu LC-20 (Shimadzu, Japan) with simultaneous diode array and fluorescence detection chromatograph, using a SupelcoSil LC-PAH reversed-phase column 150*4.6, C 18 phase, and 5 μm particle size. The eluent was a mixture of acetonitrile (Grade 1) and double-distilled water. The chromatography was run in a gradient mode: acetonitrile/water = (50:50) – (100:0) first 20 min, 100 % acetonitrile from the 20th to the 40th minutes of the analysis. The solvent flow rate was 1 ml/min, the sample volume – 20 μl , the column operating temperature – 40 °C. The time of analysis under selected conditions was 32 min. The spectra were recorded in the 190–500 nm range, followed by recording of the signal

at a wavelength of 254 nm for the quantitative determination of the components.

The concentration of photosynthetic pigments in bottom sediments was determined by the procedure proposed by (Sigareva, 2012) in a Cary 50 spectrophotometer (Varian, U.S.A.). The pigments were extracted from the BS using a 90 % aqueous acetone solution. The extracts were kept in a dark place for a few hours to prevent disintegration of the pigments and then centrifuged. Their absorbance was measured in the 350–800-nm range.

The content of heavy metals (HMs) was measured using an ARL PERFORM'X 4200 O spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Switzerland) for sequential analysis of solid and liquid samples, which is equipped with an FRCSC detector, at an X-ray tube voltage of 30 kV, 80 mA, using LiF200, Ge111, and AX09 crystals. The bottom sediments were ground in a Pulverisette 6 (Fritsch, Germany) planetary mill to a grain size of 200 mesh, sieved, and dried at 105 °C for one hour and then compacted to form tablets/pellets 29 mm in diameter in a Fluxana Vaneox 40t automatic press (FLUXANA GmbH & Co. KG, Germany) on an H_3BO_3 substrate. Their X-ray fluorescence (XRF) analysis was performed in vacuum. The results were calculated using the Thermo OXSAS 2.1.54 UniQuant program (Thermo Fisher Scientific, Switzerland). We used standard Lake Baikal BS samples (BIL-2, type registration number SS No. 7176–95) for constructing a calibration curve (Revenko, 1994).

In accordance with the procedures specified by PND F 16.1:2:2.2:2.3.74–2012, PND F 14.1:2:4.167–2000, PND F 14.1:2:3:4.282–18, and PND F 16.1:2:2.3:2.2.69–10, we determined the weight concentrations of the ionic composition of water and water extracts from the BS. For capillary electrophoresis, water samples were prepared according to the requirements of operation of the Kapel-205 device and filtered

on a membrane cellulose acetate filter with a porosity of 0.40 μm (Vladipor, Russia). The tests were carried out using a Kapel – 205 (Lumex, Russia) droplet electrophoresis system. The lower detection limit was 0.004 mg/L.

All analytical tests were carried out in triplicate for each sample, and results are presented as means $\pm$ SE. All values obtained for bottom sediments are expressed on a dry weight basis.

Results and discussion

The study of the water and BS samples from Lakes Krugloye and Maltsevo provided the basis for assessing the current state of these lakes and estimating the contribution of anthropogenic impact to the environmental situation. According to the Russian Federation Sanitary standards and requirements 1.2.3685–21 “Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans” (hereinafter SanPiN), the total content of oil products should not exceed 0.1 mg/L. The total content of HCs in the water samples from Sites 1, 3, and 4 ranged between 1.3 and 1.5 $\mu\text{g/L}$, while the maximum content observed at sampling point 2 in Lake Maltsevo was 20.8 $\mu\text{g/L}$. The HC content in BS varied from 58.14 to 82.2 ng/g.

PAHs are a group of chemicals of various origins (both natural and anthropogenic); most of them are toxic and (or) carcinogenic. According to the available literature data, 5–6 cyclic aromatic compounds are generally classified as industrially produced ones and the lighter polyarenes – as originating from humic substances and terrestrial higher plants (Opekunov et al., 2015; Khalikov, Lukyanova, 2020). As stated in SanPiN 1.2.3685–21, the content of naphthalene in water should not exceed 10 $\mu\text{g/L}$ and benz[a]pyrene – 0.01 $\mu\text{g/L}$. In soils, the maximum permissible concentration (MPC) for naphthalene is not standardized, and for benz[a]pyrene it is 20 ng/g.

In the current study, the following PAHs were quantified based on their chromatographic yields in the water and BS samples from Lakes Maltsevo and Krugloye: naphthalene, 2-methylnaphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benz[b]fluoranthene, benz[k]fluoranthene, benz[a]pyrene, and dibenz[a, h]anthracene (Table 1).

The PAH contents in the surface water samples ranged from 0.01 to 0.13 $\mu\text{g/L}$ for different compounds. The mixture of PAHs found in the water samples contained increased levels of such compounds as naphthalene, fluorene, phenanthrene, and benz[a]anthracene. In contrast to BS, the water samples contained predominantly the lighter 2–3 cyclic polyarenes, exhibiting better solubility.

To assess the degree of pollution, the results obtained in this study were compared with the data on PAH contents in other lakes, including Lake Baikal. The results obtained for Lakes Maltsevo and Krugloye were comparable with the PAH concentrations in surface waters and bottom sediments of Lake Baikal. In Lake Baikal, the total PAH content varies from 0.03 to 0.13 $\mu\text{g/L}$ in the water (Gorshkov et al., 2010) and from 24 to 245 ng/g in bottom sediments (Khalikov, Lukyanova, 2020). Lakes located in areas of increased anthropogenic impact are characterized by higher values of PAH content in water and bottom sediments. Studies show that PAH concentrations in bottom sediments can reach 1207–4754 ng/g (Taihu Lake in East China) (Qiao et al., 2006) and 101.3–322.8 ng/g (Bayangdian Lake in North China) (Hu et al., 2010).

In the bottom sediments of Lakes Maltsevo and Krugloye, the total PAH content was higher than in water samples, which was associated with the accumulation of PAHs. The contents of fluorene, phenanthrene, fluoranthene, chrysene,

Table 1. Contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (mean $\pm$ SE, n=3) in water and bottom sediments (BS) of Lakes Maltsevo and Krugloye of the Tomsk Region

PAHs*	Maltsevo						Krugloye					
	Water, $\mu\text{g/L}$			BS, ng/g			Water, $\mu\text{g/L}$			BS, ng/g		
	1	2		1	2		3	4		3	4	
Naph	0.02 $\pm$ 0.003	0.12 $\pm$ 0.019		1.06 $\pm$ 0.169	0.11 $\pm$ 0.018		0.01 $\pm$ 0.002	0.05 $\pm$ 0.008		1.59 $\pm$ 0.254	0.21 $\pm$ 0.034	
2- Naph	< 0.003	0.10 $\pm$ 0.016		1.62 $\pm$ 0.259	0.32 $\pm$ 0.051		0.01 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.005		1.18 $\pm$ 0.189	0.70 $\pm$ 0.112	
Fl	< 0.003	0.08 $\pm$ 0.014		6.65 $\pm$ 1.197	4.85 $\pm$ 0.873		0.07 $\pm$ 0.013	0.07 $\pm$ 0.013		9.83 $\pm$ 1.769	6.31 $\pm$ 1.136	
Phe	0.09 $\pm$ 0.018	0.08 $\pm$ 0.016		11.77 $\pm$ 2.350	8.56 $\pm$ 1.712		0.06 $\pm$ 0.012	0.08 $\pm$ 0.016		13.19 $\pm$ 2.640	11.13 $\pm$ 2.230	
Flu	0.04 $\pm$ 0.007	0.05 $\pm$ 0.001		13.54 $\pm$ 2.437	9.74 $\pm$ 1.753		0.04 $\pm$ 0.007	0.07 $\pm$ 0.013		14.44 $\pm$ 2.599	12.66 $\pm$ 2.279	
Py	0.01 $\pm$ 0.002	0.02 $\pm$ 0.004		3.32 $\pm$ 0.598	1.76 $\pm$ 0.317		0.01 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.005		3.27 $\pm$ 0.589	2.76 $\pm$ 0.497	
B[a]A	0.01 $\pm$ 0.002	0.04 $\pm$ 0.007		1.83 $\pm$ 0.329	0.45 $\pm$ 0.081		0.04 $\pm$ 0.007	0.13 $\pm$ 0.023		0.83 $\pm$ 0.149	0.68 $\pm$ 0.122	
Chry	0.01 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.007		8.83 $\pm$ 1.943	3.38 $\pm$ 0.744		0.02 $\pm$ 0.004	0.04 $\pm$ 0.009		6.21 $\pm$ 1.366	5.21 $\pm$ 1.146	
B[b]F	< 0.003	0.01 $\pm$ 0.002		4.79 $\pm$ 1.054	< 0.003		< 0.003	0.02 $\pm$ 0.004		0.98 $\pm$ 0.216	0.47 $\pm$ 0.103	
B[k]F	< 0.003	< 0.003		1.38 $\pm$ 0.248	< 0.003		< 0.003	0.01 $\pm$ 0.002		0.40 $\pm$ 0.072	< 0.003	
B[a]P	< 0.003	0.01 $\pm$ 0.002		2.870 $\pm$ 0.570	< 0.003		< 0.003	0.02 $\pm$ 0.004		< 0.003	< 0.003	
D[a, h]A	0.01 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.006		10.03 $\pm$ 2.006	1.24 $\pm$ 0.248		0.02 $\pm$ 0.004	0.06 $\pm$ 0.012		3.83 $\pm$ 0.766	1.06 $\pm$ 0.212	
Σ PAHs	0.20	0.59		67.70	30.40		0.28	0.62		55.76	41.18	

*Naph – naphthalene, 2- Naph – 2- methylnaphthalene, Fl – fluorene, Phe – phenanthrene, Flu – fluoranthene, Py – pyrene, B[a]A – benza[anthracene, Chry – chrysene, B[b]F – benz[b]fluoranthene, B[k]F – benz[k]fluoranthene, B[a]P – benz[a]pyrene, D[a, h]A – dibenz[a, h]anthracene

and dibenz[a, h]anthracene were the highest. However, at two sampling sites (1 and 3), BS samples contained higher levels of the identified compounds. The reason for that was that those two sites were located at the shoreline, which, in summer, is densely populated by vacationers burning log-fires. The indicators of fire-induced pollution were the high contents of such compounds as benz[a]pyrene, pyrene, and benz[a]anthracene. The present study demonstrates that the PAH contents in Lakes Maltsevo and Krugloye do not exceed the MPCs for controlled compounds and are similar to their levels in Lake Baikal.

The study of the cation-anion composition of natural waters and bottom sediments is necessary for assessing the ecological state of water bodies, including a possible determination of their anthropogenic pollution (Sagdeev et al., 2017). Using the method of capillary electrophoresis, we determined the ionic composition including major cations – Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , and NH_4^+ and anions – Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , and F^- .

The increased contents of nitrogen and phosphorus in water bodies indicate pollution by industrial and domestic wastewater (Neverova-Dziopak, Tsvetkova, 2020). In areas subject to high economic activity, the contents of NH_4^+ and PO_4^{3-} often exceed their MPC values. The water of small lakes located in oil-producing regions was found to contain increased concentrations of NH_4^+ , up to 1.432 mg/L, and PO_4^{3-} , up to 0.417 mg/L (Agbalyan, Shinkaruk, 2019). The concentrations of NH_4^+ and PO_4^{3-} in Lakes Krugloye and Maltsevo did not exceed their maximum permissible concentrations (Table 2), suggesting the absence of any polluting runoffs. The contents of all cations and anions detected in water samples did not exceed their MPCs (SanPin 1.2.3685–21). The results of testing indicated a satisfactory quality of natural waters, and all parameters were within the normal limits.

Bottom sediments are the most conservative components of natural water bodies; they contain information on pollution of the watershed and its distinctive characteristics. They can therefore serve as indicators for identifying the composition, rate, and scale of the anthropogenic pollution.

Table 3 presents the data on the contents of heavy metals in the samples. Most researchers studying HMs in natural water bodies (Sharipova, 2015; Strakhovenko et al., 2014) primarily focus on such elements as V, Ni, Cr, Mn, Cu, Zn, Cd, Sn, and Pb because these metals can accumulate in the environment and exhibit their toxic properties (Papina, 2001). The study by Papina (2001) demonstrated a relationship between the change in pH and the possibility of the transition of dissolved heavy metals to the adsorbed form. The pH value in the samples of surface waters of Lakes Maltsevo and Krugloye varied between 6.8 and 7.2.

The total content of all heavy metals detected in the samples did not exceed the MPCs stated in SanPin 1.2.3685–21 (Table 3).

To assess the degree of pollution, we compared lakes of Russia and the world with different contents of HMs. The clean lakes included the shallow lake Raduzhnoye (Ergaki Nature Park) with the following HM contents: Ni – 20.8 mg/kg, Zn – 104.4 mg/kg, and Mn – 160 mg/kg (Anishchenko et al., 2015). In lakes located in the immediate vicinity of industrial production, the HM content reached high values: Cd – 4.2 mg/kg (Lake Yakovo, Tomsk Region), Pb – 3345 mg/kg (Lake Bolshie Rakity, Altai Territory) (Strakhovenko, 2011). The study by Akono et al. (2022) reported the contents of HMs in lakes located in Cameroon, Turkey, Tanzania, and China. The samples collected from those lakes contained various concentrations of HMs, depending on the sedimentation conditions (pH, amount of suspended solids, anthropogenic

Table 2. Cation-anion composition (mean±SE, n=3) of surface water and bottom sediments of Lakes Maltsevo and Krugloye

Ions	Water				Bottom sediments				MPC*, mg/L
	Maltsevo		Krugloye		Maltsevo		Krugloye		
	1	2	3	4	1	2	3	4	
	Cations, mg/L				Cations, mg/kg				
NH ₄ ⁺	0.05±0.02	0.21±0.05	0.15±0.04	0.15±0.04	2.41± 0.39	0.97± 0.16	0.47±0.08	0.33±0.05	2.0
K ⁺	2.23±0.31	2.27±0.32	1.81±0.36	2.06±0.29	4.15±0.66	3.02± 0.48	3.00±0.48	3.51±0.56	
Na ⁺	0.99± 0.20	2.67±0.37	2.47±0.35	2.34±0.33	4.96± 0.79	5.27± 0.84	15.07±2.4	9.83±1.57	200.0
Mg ²⁺	0.96± 0.19	0.96±0.19	1.02±0.14	0.94±0.13	1.35± 0.22	2.18± 0.35	5.14±0.82	2.56±0.41	50
Ca ²⁺	2.66± 0.37	2.99±0.42	3.43±0.48	3.50±0.49	7.02± 1.12	9.52± 1.52	12.86±2.06	10.55±1.69	180
	Anions, mg/L				Anions, mg/kg				
Cl ⁻	0.74± 0.18	1.97±0.47	2.67±0.64	2.65±0.64	1.3± 0.31	0.86± 0.20	1.63±0.4	1.98±0.4	350.0
NO ₂ ⁻	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.30± 0.07	0.26± 0.07	0.37±0.07	0.45±0.10	3.0
SO ₄ ²⁻	1.6±0.32	3.63±0.74	2.67±0.62	2.94±0.69	2.49± 0.60	1.35± 0.30	2.35±0.60	1.4± 0.30	500.0
NO ₃ ⁻	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.1	<0.1	0.54±0.08	0.47±0.07	45.0
F ⁻	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	1.5
PO ₄ ³⁻	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	0.12	0.18	0.16	0.14	3.5

*- maximum permissible concentrations, guideline values refer to the content in water samples

Table 3. Contents (mean±SE, n=3) of heavy metals (HMs, mg/kg) in bottom sediments of Lakes Maltsevo and Krugloye

HMs	Maltsevo		Krugloye		MPC, mg/kg gross value
	1	2	3	4	
V	102.1±10.2	74.9±7.5	92.3±9.2	81.2±8.1	150
Ni	31.6±4.7	27.7±4.2	79.1±11.9	65.8±9.9	80
Cr	376.6±18.8	300.2±15.0	139.2±6.9	234.1±11.7	ND
Mn	1270.4±63.5	704.4±35.2	715.2±35.8	744.2±37.2	1500
Cu	31.5±1.6	13.4±0.7	11.7±0.6	24.3±1.2	132
Zn	82.6±12.4	96.5±14.5	169.9±25.4	122.2±18.3	220
Cd	0.4±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1	0.7±0.1	2
Pb	26.2±2.6	31.1±3.1	17.7±1.8	15.2±1.5	32
Sn	< 0.001	< 0.001	39.1	34.4	ND
Total ΣHMs	1921.4	1249.0	1264.7	1322.1	

MPC – maximum permissible concentrations, ND – not determined

impact, etc.): Pb – 5.83–91.3 mg/kg, Zn – 53.24–123.0 mg/kg, Cd – 0.08–3.53 mg/kg.

Results obtained in the current study can be compared with the data on the contents of these metals in Lake Baikal (Yanchuk, 2021) and various other ecosystems (Anishchenko et al., 2015). The results obtained indicate that the contents of Cu, Zn, Cd, and Pb are at the background level and suggest moderate pollution (Anishchenko et al., 2015), which does not significantly affect the biota. At sampling point 1, the total HM content was higher than at other sampling points. Currently, there is no adequate explanation for this result. An increased content of Cr was revealed, but no reason for that can be suggested at this stage of the study.

Natural water bodies are complex ecosystems; therefore, the assessment of their state should be based on determination of both chemical parameters (contents of ions, HMs, PAHs, etc.) and biological characteristics.

Monitoring of the surface water quality using hydrobiological parameters should include a study of phytoplankton photosynthesis and organic matter decomposition, determination of

the ratio of photosynthesis intensity to organic matter decomposition, and measurement of the content of chlorophyll (Sidelev, Babanazarova, 2008).

It is well known (Koreneva, Sigareva, 2022; Belyaeva et al., 2018) that the distribution of pigments is heterogeneous and depends not only on the quality of water, but also on the properties of bottom sediments. For marine coastal zones with a high sand content, the total content of pigments is insignificant, reaching 4.9 µg/g, while for silts the content of Cchl *a* + Ph is 9.1–19.5 µg/g (where Ph is pheophytin). For sandy bottom sediments of fresh-water environments, the total content of Cchl *a* + Ph varies between 0.1 and 5.5 µg/g (Belyaeva et al., 2018). In the present study, we measured the contents of natural pigments – chlorophylls *a*, *b*, *c* and carotenoids – in bottom sediments (Table 4). The total content of chlorophylls varied from 0.5 to 1.14 µg/g, and the content of carotenoid pigments did not exceed 0.9 µg/g.

Such low concentrations of pigments can be associated with the grain-size composition of BS, represented by sandstone with a fraction size of

Table 4. The contents of phytopigments ($\mu\text{g/g}$, mean $\pm$ SE, $n=3$) in the bottom sediments of Lakes Maltsevo and Krugloye in the Tomsk Region

Phytopigments	Maltsevo		Krugloye	
	1	2	3	4
Cchl <i>a</i>	0.871 $\pm$ 0.07	0.247 $\pm$ 0.02	0.277 $\pm$ 0.02	0.454 $\pm$ 0.04
Cchl <i>b</i>	0.148 $\pm$ 0.02	0.100 $\pm$ 0.01	0.091 $\pm$ 0.01	0.154 $\pm$ 0.01
Cchl <i>c</i>	0.125 $\pm$ 0.02	0.153 $\pm$ 0.02	0.100 $\pm$ 0.01	0.184 $\pm$ 0.02
Ccarot	0.915 $\pm$ 0.07	0.490 $\pm$ 0.04	0.445 $\pm$ 0.04	0.710 $\pm$ 0.06
PR*	1.050	1.980	1.610	1.570
% Cchl <i>a</i> of Σchl	76.197	49.443	59.147	57.295

*- pigment ratio: $\text{PR} = \text{Ccarot} / \text{Cchl } a$

0.5–0.25 mm, and the hydrodynamic parameters of the coastal zone. The content of chlorophylls in bottom sediments is not uniform. The lakes examined in the present study can be defined as mesotrophic (Mineeva, 2004).

The content of chlorophyll *a* can characterize the state of the autochthonous organic matter. This pigment is the first to undergo microbiological and physical-chemical degradation, which results in the accumulation of more stable carotenoids (Smolskaya et al., 2018; Fisher et al., 2019).

The level of the functional activity of a plant community is assessed using the pigment ratio (PR): a ratio of the concentration of total carotenoids to the concentration of chlorophyll *a* (Smolskaya et al., 2018). The optimal state of the algal system is generally characterized by the PR value between 2 and 5 (Fisher et al., 2019). In addition, seasonality affects the value of PR as well (Mineeva, 2004). Mesotrophic water bodies are characterized by the predominance of carotenoids over green pigments. For the lakes studied in this work, this condition is fulfilled, which indicates the normal functioning of algal communities.

Conclusion

The present study showed that the surface waters of the lakes contain insignificant amounts

of PAHs, mostly represented by bi- and tricyclic compounds. The surface layer of BS, consisting of fine-grained sandstone, contains a low total amount of PAHs, 30–68 ng/g, consisting of 5- and 6-cyclic structures; their supply is due to the human activity, and they are of pyrogenic origin. In accordance with the currently accepted gradation levels for the HC content, the lakes were classified as weakly polluted.

The data on the cation-anion composition and HM content in these water bodies conform to the standard and do not exceed the MPC values.

The natural pigments identified in the BS suggest the satisfactory state of the lakes and indicate normal functioning of the algal communities.

The present study demonstrated that the anthropogenic impact did not significantly affect the current ecological state of Lakes Maltsevo and Krugloye. The results obtained in this study make it possible to consider these ecosystems as reference ones, which can be used for comparison purposes in studies of other aquatic ecosystems of the Tomsk Region.

The integrated approach proposed in this study is effective for assessing the ecological state of lakes and can be employed in further monitoring research.

References

- Agbalyan E. V., Shinkaruk E. V. (2019) Chemical composition of water of small lakes of oil and gas diving regions of the north of western Siberia. *Advances in Current Natural Sciences* [Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya], 7: 45–51 (in Russian)
- Akono D. F., Assomo P. S., Ntsama Atangana J., Nkongho A. E., Belinga C. B., Ekomane E. (2022) Assessment of traces metals in sediment from Ebolowa Municipal Lake basin (central-africa): potential risk and provenance. *Heliyon*, 8(8): e10186
- Anishchenko O. V., Glushchenko L. A., Dubovskaya O. P., Zuev I. V., Ageev A. V., Ivanova E. A. (2015) Morphometry and metal concentrations in water and bottom sediments of mountain lakes in Ergaki Natural Park, Western Sayan Mountains. *Water Resources*, 42(5): 670–682
- Belkina N. A., Subetto D. A., Efremenko N. A., Potakhin M. S., Kulik N. V. (2015) The chemical composition of bottom sediments in northern lake Ladoga as an indicator of long-term variations in the lake ecosystem. *Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences* [Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk], 9: 53–61 (in Russian)
- Belyaeva P. G., Mineeva N. M., Sigareva L. E., Timofeeva N. A., Makarova O. S. (2018) Content of the plant pigments in water and bottom sediments of the Kama river reservoirs. *Transactions of the Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS* [Trudy Instituta biologii vnutrennikh vod im. I. D. Papanina RAN], 81: 97–104 (in Russian)
- Fisher N. K., Garetova L. A., Levshina S. I. (2019) Composition and distribution of organic matter in bottom sediments downstream of the Tumnin River. *Regional Problems* [Regionalnye problemy], 22(2): 48–54 (in Russian)
- Gorshkov A. G., Marinayte I. I., Zemskaya T. I., Khodzher T. V. (2010) Modern level of petroleum products in water of Lake Baikal and its tributaries. *Chemistry for Sustainable Development*, 18(6): 623–630
- Hu G., Luo X., Li F., Dai J., Guo J., Chen S., Hong C., Mai B., Xu M. (2010) Organochlorine compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment from Baiyangdian Lake, North China: Concentrations, sources profiles and potential risk. *Journal of Environmental Sciences*, 22(2): 176–183
- Hydrology* (2010) Mikheev V. A. (compiler). Ulyanovsk, Ulyanovsk State Technical University, 200 p. (in Russian)
- Khalikov I. S., Lukyanova N. N. (2020) Polycyclic aromatic hydrocarbons content in bottom sediments of Baikal Lake according to results of monitoring in 2017–2018. *International Research Journal* [Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal], 6(Part 2): 69–73 (in Russian)
- Koreneva T. G., Sigareva L. E. (2022) Pigments in the bottom sediments of Aniva Bay (Sea of Okhotsk). *Geosystems of Transition Zones* [Geosistemy perekhodnykh zon], 6(1): 60–73 (in Russian)
- Kramer D. A., Tikhonova I. O. (2012) Analyses of anthropogenic contamination of small rivers bottom sediments in Moscow. *Bashkir Chemical Journal* [Bashkirskii khimicheskii zhurnal], 19(4): 29–34 (in Russian)
- Mineeva N. M. (2004) *Plant pigments in the waters of the Volga river reservoirs*. Moscow, Nauka, 156 p. (in Russian)
- Neverova-Dziopak E., Tsvetkova L. I. (2020) *Evaluation of the trophic state of surface waters: monograph*. Saint Petersburg, Saint Petersburg State University of Architecture and Civil Engineering, 176 p. (in Russian)

Opekunov A. Yu., Mitrofanova E. S., Sanni S., Kommedal R., Opekunova M. G., Bagi A. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bottom sediments of rivers and canals of Saint Petersburg. *Vestnik of Saint Petersburg University. Series 7. Geology. Geography* [Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 7. Geologiya. Geografiya], 4: 98–109 (in Russian)

Papina T. S. (2001) *Transport and peculiarities of heavy metals distribution in the row: water – suspended substance – river ecosystems sludge. Analytical review. (Ecology Series, Issue 62).* Novosibirsk, State Public Scientific and Technological Library SB RAS, Institute for Water and Environmental Problems SB RAS, 58 p. (in Russian)

Petin A. N., Lebedeva M. G., Krymskaya O. V. (2006) *Analysis and assessment of the surface water quality: tutorial.* Belgorod, Belgorod State University, 252 p. (in Russian)

Qiao M., Wang C., Huang S., Wang D., Wang Z. (2006) Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environment International*, 32(1): 28–33

Revenko A. G. (1994) *X-ray fluorescence analysis of natural materials.* Novosibirsk, Siberian Publishing Company “Nauka”, 264 p. (in Russian)

Sagdeev M. A., Chigrineva N. A., Salnikova V. I. (2017) A study of the cation-anionic composition of water by the method of capillary electrophoresis. *Modern Scientific Researches and Innovations* [Sovremennye nauchnye issledovaniya i innovatsii], 3: 36–39 (in Russian)

Savkin V. M., Dvurechenskaya S. Y., Saprykina Y. V., Marusin K. V. (2005) Basic hydrologic-morphometric and hydrochemical characteristics of the Lake Chany. *Siberian Journal of Ecology* [Sibirskii ekologicheskii zhurnal], 12(2): 183–192 (in Russian)

Semenov M. Yu., Marinaite I. I., Zhuchenko N. A., Khuriganova O. I., Bashenkhaeva N. V., Molozhnikova Ye. V. (2017) Revealing the sources and pathways bringing the polycyclic aromatic hydrocarbons into surface waters using the chemical monitoring data. *Geoecology. Engineering Geology, Hydrogeology, Geocryology* [Geokologiya. Inzhenernaya geologiya, gidrogeologiya, geokriologiya], 1: 40–49 (in Russian)

Sharipova O. A. (2015) Distribution of heavy metals in bottom sediments of lake Balkhash depending on natural and anthropogenic factors. *Tomsk State University Journal* [Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta], 390: 225–230 (in Russian)

Sidelev S. I., Babanazarova O. V. (2008) The link analysis of the pigmentary and structural characteristics of the high-eutrophic lake phytoplankton. *Journal of Siberian Federal University. Biology* [Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologiya], 1(2): 162–177 (in Russian)

Sigareva L. E. (2012) *Chlorophyll in bottom sediments of the Volga water bodies.* Moscow, KMK Scientific Press, 217 p. (in Russian)

Smolskaya O. S., Zhukova A. A., Lyulya A. S. (2018) Analysis of pigment, physical and chemical characteristics of bottom sediments in lakes Naroch and Myastro. *Journal of the Belarusian State University. Biology* [Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya], 2: 65–77 (in Russian)

Strakhovenko V. D., Kabannik V. G., Malikova I. N. (2014) Geochemical features of the ecosystem of Lake Kolyvan (Altai territory) and related technogenic impact. *Lithology and Mineral Resources*, 49(3): 213–227

Strakhovenko V. D. (2011) *Geochemistry of bottom sediments of small continental lakes in Siberia. Abstract of dissertation for the degree of doctor of geological and mineralogical sciences.* Novosibirsk, 33 p. (in Russian)

Takhteev V. V., Khadeeva E. R., Eropova I. O., Lopatovskaya O. G. (2020) Water chemistry in small tributaries and the coastal zone of lake Baikal in the period of environmental crisis. *Water Resources*, 47(3): 448–458

Yanchuk M. S. (2021) Geoecological assessment of the state of coastal waters and bottom sediments of the lake Baikal and its tributaries (west coast). *The Bulletin of Irkutsk State University. Series «Earth Sciences»* [Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya “Nauki o zemle”], 37: 103–114 (in Russian)

Zimnik E. A., Semenov M. Y. (2011) An investigation into the relationship between contents of organic and mineral components in the waters of the tributaries to Lake Baikal. *Geography and Natural Resources*, 32(4): 337–343

EDN: QCFQSV

УДК 591.11:616–003.96(«323»).001.6

Approaches to Correction of Adaptive Responses of Experimental Animals during the Autumnal Equinox

**Olga S. Doroshenko^{*a, c},
Tatiana A. Zamoshchina^{a, b, c}, Alyona A. Gostyukhina^{a, c},
Alyona V. Prokopova^{a, c}, Michael V. Svetlik^{b, c},
Konstantin V. Zaitsev^a and Oksana B. Zhukova^a**

*^aFederal Scientific and Clinical Center
for Medical Rehabilitation and Balneology
of the Federal Medical and Biological Agency
Moscow, Russian Federation*

*^bSiberian State Medical University
of the Ministry of Health of the Russian Federation*

*^cNational Research Tomsk State University
Tomsk, Russian Federation*

Received 17.07.2023, received in revised form 20.06.2024, accepted 24.06.2024

Abstract. The present study reports the results of analyzing the adaptive responses of laboratory rats (n=120, Wistar males) with physical fatigue (after the swimming test) and light desynchronization during the autumnal equinox and the possibility of their pharmacological or physiotherapeutic correction. Rehabilitation procedures were carried out using water and antler baths for 10 days immediately after exposure to stress factors. The reference agent was ethylmethylhydroxypyridine succinate, which was injected at a dose of 10 mg/kg of animal weight 30 minutes before the swimming test. Rehabilitation physiotherapeutic measures in the form of antler baths proved to be more effective both at the hormonal and behavioral levels only in the case of desynchronization associated with the extension of the light phase of the day. In contrast to rehabilitation procedures, preventive measures using ethylmethylhydroxypyridine succinate were effective regardless of the type of deprivation and only at the behavioral level, resulting in stabilization of the behavioral state.

Keywords: stress, adaptation, antler baths, ethylmethylhydroxypyridine succinate, autumnal equinox.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: doroshenko.olga.95@mail.ru

ORCID: 0000-0003-4764-4842 (Doroshenko O.); 0000-0003-1868-9793 (Zamoshchina T.); 0000-0003-3655-6505 (Gostyukhina A.); 0000-0001-7292-1253 (Prokopova A.); 0000-0003-3030-2580 (Svetlik M.); 0000-0003-6504-5232 (Zaitsev K.); 0000-0001-5016-7288 (Zhukova O.)

Citation: Doroshenko O. S., Zamoshchina T. A., Gostyukhina A. A., Prokopova A. V., Svetlik M. V., Zaitsev K. V., Zhukova O. B. Approaches to correction of adaptive responses of experimental animals during the autumnal equinox responses. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(2), 225–234. EDN: QCFQSV



Возможности коррекции адаптивных реакций экспериментальных животных в период осеннего равноденствия

**О. С. Дорошенко^{а, в}, Т. А. Замошина^{а, б, в},
А. А. Гостюхина^{а, в}, А. В. Прокопова^{а, в},
М. В. Светлик^{б, в}, К. В. Зайцев^а, О. Б. Жукова^а**

*^аФедеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации
и курортологии Федерального медико-биологического агентства
Российская Федерация, Москва*

*^бСибирский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

*^вНациональный исследовательский
Томский государственный университет
Российская Федерация, Томск*

Аннотация. В настоящем исследовании представлены результаты анализа адаптивных реакций лабораторных крыс ($n = 120$, самцы «Wistar») в период осеннего равноденствия после физического переутомления (плавательный тест) и световых десинхронозов, а также возможности их фармакологической или физиотерапевтической коррекции. Реабилитирующие процедуры проводили с помощью водных и пантовых ванн в течение 10 дней сразу после воздействия стресс-факторов. В качестве референтного средства использовали этилметилгидроксипиридина сукцинат в дозе 10 мг/кг веса животного за 30 минут до плавательного теста. Реабилитирующие физиотерапевтические мероприятия в виде пантовых ванн оказались более эффективными как в отношении гормонального, так и поведенческого уровней только в случае десинхроноза, связанного с расширением светлой фазы суток. В отличие от реабилитирующих профилактические воздействия с помощью этилметилгидроксипиридина сукцината проявились независимо от типа деприваций и только на поведенческом уровне, что выражалось в стабилизации поведенческого статуса.

Ключевые слова: стресс, адаптация, пантовые ванны, этилметилгидроксипиридина сукцинат, осеннее равноденствие.

Цитирование: Дорошенко О. С. Возможности коррекции адаптивных реакций экспериментальных животных в период осеннего равноденствия / О. С. Дорошенко, Т. А. Замошина, А. А. Гостюхина, А. В. Прокопова, М. В. Светлик, К. В. Зайцев, О. Б. Жукова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(2). С. 225–234. EDN: QCFQSV

Введение

Гелиогеофизические особенности нашей планеты определяют цикличность многих физиологических процессов, в том числе и динамику работоспособности человека (Ammar et al., 2017; Барабаш, 2017; Замощина и др., 2020а). Жизнедеятельность современного человека сопряжена, во-первых, с увеличением продолжительности светлого промежутка суток, главным образом по причине действия искусственного освещения (профессиональная деятельность в ночное время, освещение от работающих экранов телевизоров и т.д.), а во-вторых, с необходимостью частой смены часовых поясов (перелёты на длительные расстояния в транс-меридианном направлении). В комплексе все эти воздействия провоцируют возникновение дисрегуляторных нарушений различных физиологических систем (Барабаш, 2012; Gianaros, Wager, 2015; Schiavone et al., 2013; Costa-Mattioli, Walter, 2020), что определяет интерес к поиску факторов, ограничивающих развитие стресс-реакции. Перспективным в этом плане является изучение средств природного происхождения с адаптогенным потенциалом (Solodkova, Zenkina, 2018; Özdemir et al., 2018; Khabibullin et al., 2019). Такие адаптогены, учитывая их полифункциональную эффективность и хорошо известную безопасность, могут не только помочь противодействовать стрессовым воздействиям на биологическую систему, но и повысить неспецифическую резистентность к различным угрозам/аверсивным факторам (Owolabi et al., 2019; Смирнова и др., 2019; Todorova et al., 2021). Результатом может стать ослабление связанных со стрессом расстройств и улучшение качества жизни.

Целью настоящего исследования стало изучение особенностей приспособительных реакций экспериментальных животных на последовательное действие физической нагрузки и световых десинхронозов в период

осеннего равноденствия, а также возможности их фармакологической или физиотерапевтической коррекции.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен в период осеннего равноденствия на 120 крысах-самцах «Wistar» массой 220–250 г., из которых были сформированы случайным образом 12 групп по 10 особей. Группы 1–2 находились в естественных условиях освещения. Группа 1 – интактная, без экспериментальных воздействий. Группе 2 предъявляли физическую нагрузку в виде плавательного теста до полного утомления. Группы 3–12 подвергали стресс-нагрузкам в виде десятидневного светового десинхроноза (световая или темновая депривации) с последующей физической нагрузкой. Группам 3, 8 после перемещения животных из депривационных условий в условия естественного освещения предъявляли физическую нагрузку в виде плавательного теста. Группам 5, 10 после всех экспериментальных воздействий проводили восстановительные постстрессорные программы с применением ванн с препаратом «Пантованна» (Суцевский, 1998), а животных групп 4 и 9 выдерживали в проточной воде. Группы 7 и 12 получали профилактически внутримышечные инъекции этилметилгидроксипиридина сукцината, группам 6 и 11 вводили физиологический раствор.

Для формирования состояния десинхроноза животные групп 3–12 в течение 10 суток круглосуточно находились при искусственном ярком освещении 150 LX (группы 3–7 – СС режим) либо полном затемнении 2–3 LX (группы 8–12 – ТТ режим) (Замощина, 2000). Состояние физического переутомления формировали посредством плавательного теста в течение 5 дней подряд в одно и то же время – с 10 до 12 ч утра (Гостюхина и др., 2017).

При проведении постстрессорных восстановительных программ животных (группы 5 и 10) по одному помещали в кювету с водным раствором препарата «Пантованна», температура которого составляла 37–38 °С, и накрывали решетчатой крышкой, выдерживали в кювете 10 мин, после чего вынимали и, не вытирая, оставляли на воздухе при температуре 22–24 °С. Контрольные группы животных 4 и 9 выдерживали в проточной воде с аналогичной температурой и временем экспозиции. Принимая во внимание результаты наших ранее проведенных аналогичных исследований весной, которые продемонстрировали противострессорное действие этилметилгидроксипиридина сукцината в плавательном тесте (Замощина и др., 2020b), во втором случае животным группы 7 и 12 осуществляли внутримышечное введение этого препарата в дозе 10 мг/кг веса за 30 минут до каждого предъявления плавательного теста. Группам 6 и 11 в аналогичных условиях вводили 0,9 % физиологический раствор в эквивалентном количестве.

После завершения всех экспериментальных воздействий животных тестировали в «открытом поле» по стандартной методике (Руководство по экспериментальному..., 2005; Руководство по проведению..., 2012). Затем все группы животных выводили из эксперимента одномоментным декапитированием под CO₂ наркозом согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным и приказу Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (РФ ГОСТ, 2010). У декапитированных животных собирали кровь для получения сыворотки с целью определения уровня кортикостерона. Определение исследуемого гормона выполняли с помощью иммунофер-

ментного метода с использованием поликлональных антител кортикостерона, согласно рекомендациям производителя тест-систем «IBL», Германия.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на основе пакета программ StatSoft Statistica v8.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для устранения эффекта множественных сравнений вводили поправку Бонферони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В осенний период года предъявление стресс-фактора в виде ежедневной физической нагрузки до состояния утомления сопровождалось статистически значимым увеличением уровня кортикостерона в контрольной группе животных относительно интактной группы (табл.), а в паттернах поведения усилились тормозные пассивно-оборонительные формы поведения (груминг, дефекации). Обращает на себя внимание тот факт, что предъявление физической нагрузки сопровождалось практически семикратным увеличением кортикостерона в сыворотке крови у животных контрольной группы относительно его содержания в интактной группе, что в совокупности с поведенческой дезадаптацией в тесте «открытое поле» указывает на мощное стрессирующее воздействие физической нагрузки на животных и согласуется с работами других авторов (Замощина и др., 2020b). Кроме того, результаты настоящего исследования подтвердили ранее нами полученные данные касательно сезонного содержания кортикостерона в сыворотке крови лабораторных животных (Гостюхина и др., 2016), а также результаты других исследователей (Newman, Soma, 2009; Vera et al., 2011; Deviche

Таблица. Влияние пантовых ванн и этилметилгидроксипиридина сукцината на уровень кортикостерона в сыворотке крови и поведенческую активность экспериментальных животных в условиях теста «открытое поле»

Table. Effects of antler baths and ethylmethylhydroxypyridine succinate on serum corticosterone levels and behavioral activity of experimental animals in the «open field» test

Осенний сезон (период равноденствия)						
Группы животных (N=10)	Кортикостерон нг/ммоль	Активность в открытом поле				
		Горизон- тальная активность	Вертикаль- ная активность	Груминг	Норка	Дефекация
(№ 1) Интактная	27,7 (21,8;57,5)	32 (18;37)	10 (6;12)	0 (0;0)	2 (0;4)	2 (1;2)
(№ 2) ЕО+ФН	199,8 (150,6;218,3) $p_1 < 0,01$	31 (22;44)	10 (8;11)	1 (0;1) $p_1 < 0,05$	1 (0;5)	4 (3;4) $p_1 < 0,05$
(№ 3) СС+ФН	55,4 (51,3;63,4) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$	33 (25;35)	8 (5;9)	1 (0;2) $p_1 < 0,05$	1 (0;1)	2 (1;4)
(№ 4) СС+ФН+ водные ванны	57,5 (52,6;66,6) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$	34 (26;38)	7 (4;9)	1 (0;2) $p_1 < 0,05$	1 (0;2)	2 (2;3)
(№ 5) СС+ФН+ пантовые ванны	22,8 (16,3;24,6) $p_2 < 0,01$ $p_{3,4} < 0,01$	18 (11;25) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_{3,4} < 0,05$	5 (4;6) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	1 (0;1) $p_1 < 0,05$	1 (0;2)	2 (2;3)
(№ 6) СС + ФН + ФР	33,9 (20,6;48,1) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	28 (16;46) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	2 (0;3) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	2 (0;3) $p_1 < 0,05$	0 (0;1) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	1 (1;2)
(№ 7) СС + ФН + этил- метилгидроксипириди- на сукцинат	40,25 (22,23;55,28) $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	35 (33;39) $p_1 < 0,05$	6 (4;8) $p_1 < 0,05$	1 (1;1)	1 (0;1)	2 (1;2)
(№ 8) ТТ+ФН	23,6 (20,5;24,2) $p_2 < 0,01$	30 (24;40)	8 (7;9)	0 (0;0)	2 (1;5)	2 (1;2) $p_2 < 0,05$
(№ 9) ТТ+ФН+ водные ванны	22,3 (19,5;26,6) $p_2 < 0,01$	29 (23;39)	8 (6;9)	0 (0;1)	3 (0;5)	2 (2;2) $p_2 < 0,05$
(№ 10) ТТ+ФН+ пантовые ванны	49,1 (21,4;57,9) $p_2 < 0,01$ $p_4 < 0,05$	27 (22;34)	7 (7;10)	0 (0;1)	0 (0;2) $p_4 < 0,05$	2 (1;2) $p_2 < 0,05$
(№ 11) ТТ + ФН + ФР	225 (211,2;227,2) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	22 (20;35) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	2 (2;3) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	0 (0;1)	1 (0;2)	0 (0;1) $p_2 < 0,05$
(№ 12) ТТ + ФН + этил- метилгидроксипириди- на сукцинат	248 (241,9;275,7) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	32 (32;49)	3 (3;8) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	3 (1;4) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_{3,4} < 0,05$	3 (2;3) $p_2 < 0,01$ $p_4 < 0,05$	2 (1;2) $p_{2,4} < 0,05$

Примечание: ЕО – естественное освещение, ФН – физическая нагрузка, СС – режим темновой депривации (животные на круглосуточном освещении), ТТ – режим световой депривации (животные круглосуточно в темноте), ФР – физиологический раствор.

Результаты представлены в виде Me (Q1; Q3), p_1 – уровень статистической значимости по отношению к интактной группе, p_2 – уровень статистической значимости по отношению к группе ЕО+ФН, p_3 – уровень статистической значимости по отношению к группам с световыми десинхронизмами (СС- или ТТ-режимы) и физическими нагрузками, p_4 – уровень статистической значимости по отношению к группам с световыми десинхронизмами (СС- или ТТ-режимы) и физическими нагрузками, водными ваннами и физиологическим раствором.

et al., 2016), свидетельствующие о низком содержании кортикостерона в сыворотке крови лабораторных животных в осенний период года в сравнении с другими сезонами.

Помещение животных в условия световых десинхронозов способствовало ослаблению стрессирующего воздействия физической нагрузки как со стороны гормонального отклика, так и со стороны поведенческих реакций в тесте «открытое поле». Световые десинхронозы независимо от типа депривации предупредили активацию стресс-реализующей системы на уровне надпочечников в ответ на действие стресса физической нагрузки, понизив уровень сывороточного кортикостерона относительно животных группы 2 без предварительного десинхроноза (табл.), приблизив значение этого показателя к аналогичному в интактной группе. Что касается структуры поведения, то световые десинхронозы значительно ослабили эмоциональное напряжение, что проявилось в снижении числа актов анксиогенной дефекации относительно контрольной группы (2) без изменения выраженности груминга при СС-десинхронозе и нормализации этого показателя при ТТ-десинхронозе. Следовательно, в период осеннего равноденствия световая и темновая депривации способствовали формированию феномена перекрестной адаптации (Меерсон, Пшенникова, 1988), причем ТТ-десинхроноз полностью стабилизировал как гормональный, так и поведенческий ответ крыс на физическую нагрузку до состояния утомления.

Эффект от применения водных и пантовых ванн в качестве активных постстрессорных программ в период осеннего равноденствия имел особенности в зависимости от характера деприваций (табл.). После темновой депривации (СС-режим) и физической нагрузки (группы 4 и 5) в группе животных,

получавших пантовые, но не водные ванны, наблюдалось восстановление регистрируемых психофизиологических показателей, отражающих функциональное состояние стресс-реализующей гормональной и центральной нервной системы. В обсуждаемом световом режиме пантованны, в отличие от водных процедур, нормализовали уровень кортикостерона в сыворотке крови и установили этот показатель на уровне интактной группы. Анализ структуры поведения лабораторных крыс в тесте «открытое поле» показал, что у животных после погружения в пантованны ослаблялась активно-поисковая форма поведения в виде горизонтальной компоненты, а у животных после погружения в водные ванны никаких изменений в поведении не наблюдалось. После ТТ-режима (световая депривация) и физических нагрузок пантовые ванны наравне с водными процедурами не оказали никакого реабилитирующего эффекта ни на гормональные, ни на поведенческие показатели (группы 9 и 10). Полученные результаты подтверждают имеющиеся литературные данные, согласно которым сужение темной фазы суток оказывает более существенное негативное воздействие на адаптивно-приспособительные механизмы организма, снижая устойчивость последнего в отношении действия стрессирующих агентов различного генеза и модальности (Bobok et al., 2016; Батоцыренова и др., 2020; Batotsyrenova et al., 2020).

В группах животных, получавших физиологический раствор или этилметилгидроксипиридина сукцинат (группы 6 и 7) после СС-режима отмечалось одинаковое снижение уровня глюкокортикоида в сыворотке крови относительно интактной и контрольных групп 2 и 3 (табл.). Поскольку сама процедура инъекций является для животных стрессирующим фактором, вероятно, в данном

случае она, вне зависимости от содержимого инъекции, выступила в роли гетеротипического стрессора (Kopp et al., 2013; Babb et al., 2014; Duarte et al., 2015), спровоцировав состояние перекрестной адаптации (Меерсон, Пшенникова, 1988) и, как следствие, смягчила повреждающее действие физической нагрузки на уровне гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. При этом со стороны поведения инъекции физиологического раствора способствовали формированию пассивно-оборонительной стратегии поведения у животных в тесте «открытое поле». У крыс этой группы отмечалось снижение всех двигательных компонентов поведения относительно интактной и контрольных групп 2 и 3, а также увеличение груминга относительно интактной группы. А вот введение этилметилгидроксипиридина сукцината нормализовало горизонтальную активность до уровня интактной группы без изменения эмоциональных показателей. Однако в условиях длительной темновой экспозиции введение как физиологического раствора, так и этилметилгидроксипиридина сукцината спровоцировало значительное повышение уровня кортикостерона относительно и интактной, и контрольных групп 2 и 8. При этом со стороны поведения инъекции солевого раствора индуцировали угнетение локомоторной активности, о чём свидетельствует достоверное снижение горизонтального и вертикального компонентов в этой группе животных относительно интактной и контрольных групп 1 и 2. В сравнении с физиологическим раствором у животных, получавших этилметилгидроксипиридина сукцинат, в стратегии поведения активировалась исследовательская активность, о чём свидетельствует достоверное увеличение норкового рефлекса относительно группы с физической нагрузкой (группа 2) и группы с физиологическим раствором

при сохранении уровня горизонтальной активности животных. Результаты настоящего исследования согласуются с нашими результатами относительно адаптогенного действия этилметилгидроксипиридина сукцината, полученными в весенний период года (Замощина и др., 2020b), что подтверждает его стресс-протективное действие на организм в условиях световых десинхронозов и высоких физических нагрузок.

Заключение

Таким образом, установленное в данном исследовании влияние восстановительных и превентивных процедур на эффективность реализации адаптивно-компенсаторных реакций организма в условиях последовательного действия стрессогенных факторов подтверждает ранее нами сделанное предположение о сезонной и циркадианной зависимости приспособительных механизмов организма (Замощина и др., 2020a; Замощина и др., 2022). В период осеннего равноденствия воздействие стрессогенного фактора в виде физической нагрузки провоцирует состояние функциональной перегрузки организма и снижает его устойчивость. Восстановительные процедуры с помощью пантованн способствуют уменьшению стрессогенного напряжения только после СС-режима. Профилактика стресса физической нагрузки до состояния утомления с помощью фармакологического препарата этилметилгидроксипиридина сукцината в осенний период года способствовала формированию адаптивных паттернов поведения независимо от типа депривации, повышая резистентность организма лабораторных крыс к последующему действию физической нагрузки на уровне поведения.

Учитывая всё вышесказанное, очевидно, что полученные результаты демонстрируют важность учёта хронобиологии физиологии

ческих процессов организма при разработке восстановительных мероприятий с целью повышения их эффективности.

Список литературы / References

Барабаш Л. В. (2012) Анализ результатов лабораторных исследований с учетом цирканнуальных ритмов. *Клиническая лабораторная диагностика*, 12: 14–17 [Barabash L. V. (2012) The analysis of results of laboratory analyses considering the circannual rhythms. *Clinical Laboratory Diagnostics* [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika], 12: 14–17 (in Russian)]

Барабаш Л. В. (2017) Биоритмологические аспекты гормональной регуляции. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, 103(4): 361–370 [Barabash L. V. (2017) Biorhythmological aspects of hormonal regulation. *Russian Journal of Physiology* [Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova], 103(4): 361–370 (in Russian)]

Батоцыренова Е. Г., Золотоверхая Е. А., Кашуро В. А., Шарабанов А. В. (2020) Изменение биохимических показателей в сыворотке крови крыс при хроническом световом десинхронозе. *Биомедицинская химия*, 66(6): 450–455 [Batotsyrenova E. G., Zolotoverkhaja E. A., Kashuro V. A., Sharabanov A. V. (2020) Changes of biochemical parameters in blood serum rats under chronic light desynchronosis. *Biomedical Chemistry* [Biomeditsinskaya khimiya], 66(6): 450–455 (in Russian)]

Гостюхина А. А., Зайцев К. В., Замощина Т. А., Жукова О. Б., Светлик М. В., Абдулкина Н. Г. (2016) Сезонные особенности содержания кортикостерона в сыворотке крови крыс после физического переутомления в условиях светового десинхроноза. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, 102(1): 50–55 [Gostyukhina A. A., Zaitsev K. V., Zamoshchina T. A., Zhukova O. B., Svetlik M. V., Abdulkina N. G. (2016) Seasonal features of corticosterone blood serum of rats after physical overwork under desynchronosis. *Russian Journal of Physiology* [Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova], 102(1): 50–55 (in Russian)]

Гостюхина А. А., Зайцев К. В., Замощина Т. А., Светлик М. В., Жукова О. Б., Абдулкина Н. Г., Зайцев А. А., Воробьев В. А. (2017) Способ моделирования физического переутомления у крыс в условиях десинхронозов. Патент РФ на изобретение № 2617206/ 21.04.2017. Бюл. № 12 [Gostyukhina A. A., Zaitsev K. V., Zamoshchina T. A., Svetlik M. V., Zhukova O. B., Abdulkina N. G., Zaitsev A. A., Vorobyev V. A. (2017) A method for modeling physical fatigue in rats under conditions of desynchronosis. RF patent for invention № 2617206/ 21.04.2017. Byul. № 12 (in Russian)]

Замощина Т. А. (2000) Лития оксибутират и ритмическая структура активно-поискового поведения и температуры тела крыс в условиях постоянного освещения. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 63(2): 12–15 [Zamoshchina T. A. (2000) Effect of lithium hydroxybutyrate on the circadian structure of the active-search behavior and body temperature in rats under constant illumination conditions. *Experimental and Clinical Pharmacology* [Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya], 63(2): 12–15 (in Russian)]

Замощина Т. А., Гостюхина А. А., Зайцев К. В., Жукова О. Б., Светлик М. В., Абдулкина Н. Г., Прокопова А. В. (2020а) Динамика работоспособности и уровень лактата в сыворотке крови лабораторных крыс в зависимости от сезона года. *Экология человека*, 10: 17–22 [Zamoshchina T. A., Gostyukhina A. A., Zaitsev K. V., Zhukova O. B., Svetlik M. V., Abdulkina N. G., Prokopova A. V. (2020a) Seasonal variations in working capacity and serum lactate concentration in laboratory rats. *Human Ecology* [Ekologiya cheloveka], 10: 17–22 (in Russian)]

Замощина Т. А., Гостюхина А. А., Ярцев В. В., Прокопова А. В., Зайцев К. В., Жукова О. Б., Дель О. А., Усов В. Ю., Светлик М. В., Нарыжная Н. В. (2020b) Влияние мексидола на уровень кортикостерона в сыворотке крови и клетки пучковой зоны коры надпочечников у крыс при световых десинхронозах и физических нагрузках. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*, 120(11): 64–69 [Zamoshchina T. A., Gostyukhina A. A., Yartsev V. V., Prokopova A. V., Zaitsev K. V., Zhukova O. B., Del O. A., Usov V. Yu., Svetlik M. V., Naryzhnaya N. V. (2020b) An effect of mexidol on the level of corticosterone in the blood serum and beam zone cells in rats with light desynchronizes and physical loads. *S. S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry* [Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova], 120(11): 64–69 (in Russian)]

Замощина Т. А., Гостюхина А. А., Прокопова А. В., Зайцев К. В., Ярцев В. В., Дорошенко О. С., Жукова О. Б. (2022) Экспериментальное исследование особенностей постстрессорного восстановления психофизиологических функций с помощью бальнеопроцедур в период солнцестояний. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 99(1): 56–63 [Zamoshchina T. A., Gostyukhina A. A., Prokopova A. V., Zaitsev K. V., Yartsev V. V., Doroshenko O. S., Zhukova O. B. (2022) Experimental study of the features of post-stress recovery of psychophysiological functions using balneological treatments during the solstice. *Problems of Balneology, Physiotherapy and Exercise Therapy* [Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoi fizicheskoi kultury], 99(1): 56–63 (in Russian)]

Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. (1988) *Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам*. Москва, Медицина, 256 с. [Meerson F. Z., Pshennikova M. G. (1988) *Adaptation to stressful situations and physical exertion*. Moscow, Meditsina, 256 p. (in Russian)]

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая (2012) Миронов А. Н. (отв. ред.) Москва, Гриф и К, 944 с. [Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Part 1 (2012) Mironov A. N. (Editor-in-Chief) Moscow, Grif i K, 944 p. (in Russian)]

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005) Хабриев Р. У. (отв. ред.) Москва, Медицина, 832 с. [Guidelines for experimental preclinical study of new pharmacological substances (2005) Khabriev R. U. (Editor-in-Chief) Moscow, Meditsina, 832 p. (in Russian)]

Сушецкий В. И. (1998) Способ приготовления раствора из пантов для физиотерапии. Патент РФ на изобретение № 2 111 003 c1/ 20.05 [Sushchevsky V. I. (1998) A method for preparing a solution of antlers for physiotherapy. RF Patent for invention No. 2 111 003 c1/ 20.05 (in Russian)]

Смирнова И. Н., Суслов Н. И., Хлусов И. А., Зайцев К. В., Гостюхина А. А., Верещагина С. В., Абдулкина Н. Г. (2019) Экспериментальное обоснование применения пантов марала на фоне экстремальных психоэмоциональных нагрузок. *Биомедицина*, 15(3): 33–40 [Smirnova I. N., Suslov N. I., Khlusov I. A., Zaytsev K. V., Gostyukhina A. A., Vereshchagina S. V., Abdulkina N. G. (2019) Experimental substantiation of the use of maral deer antlers for combating extreme psycho-emotional stress. *Journal Biomed* [Biomeditsina], 15(3): 33–40 (in Russian)]

РФ ГОСТ р-53434–2009 (2010) Принципы надлежащей лабораторной практики. Москва, Стандартинформ [RF GOST r-534–2009 (2010) Principles of good laboratory practice. Moscow, Standartinform (in Russian)]

Ammar A., Chtourou H., Souissi N. (2017) Effect of time-of-day on biochemical markers in response to physical exercise. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 31(1): 272–282

- Babb J. A., Masini C. V., Day H. E. W., Campeau S. (2014) Habituation of hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis hormones to repeated homotypic stress and subsequent heterotypic stressor exposure in male and female rats. *Stress*, 17(3): 224–234
- Batotsyrenova E. G., Bakulev S. E., Nevzorova T. G., Ivanov M. B., Kashuro V. A., Zolotoverkhaja E. A., Kostrova T. A., Sharabanov A. V. (2020) Changes in the biorhythms of biochemical parameters in animals with modeled acute desynchronosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 170(2): 191–195
- Bobok M. N., Kozin S. V., Pavlova L. A. (2016) The effect of the light desynchronosis on the forced swimming duration of laboratory mice. *American Scientific Journal*, 6: 7–9.26
- Costa-Mattioli M., Walter P. (2020) The integrated stress response: from mechanism to disease. *Science*, 368(6489): eaat5314
- Deviche P., Valle S., Gao S., Davies S., Bittner S., Carpentier E. (2016) The seasonal glucocorticoid response of male Rufous-winged Sparrows to acute stress correlates with changes in plasma uric acid, but neither glucose nor testosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 235: 78–88
- Duarte J. O., Planeta C. S., Crestani C. C. (2015) Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 40: 52–59
- Gianaros P. J., Wager T. D. (2015) Brain-body pathways linking psychological stress and physical health. *Current Directions in Psychological Science*, 24(4): 313–321
- Khabibullin R., Bakirova A., Khabibullin I., Rakhmatullin R., Ahmadullina E. (2019) Influence of pantocrin and maral root on processes of adaptation of the powerlifter organism. *Journal of Human Sport and Exercise*, 14(5proc): S 2076–S 2083
- Kopp B. L., Wick D., Herman J. P. (2013) Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiology & Behavior*, 122: 246–252
- Newman A. E. M., Soma K. K. (2009) Corticosterone and dehydroepiandrosterone in songbird plasma and brain: effects of season and acute stress. *European Journal of Neuroscience*, 29(9): 1905–1914
- Ozdemir Z., Bildziukevich U., Wimmerová M., Macůrková A., Lovecká P., Wimmer Z. (2018) Plant adaptogens: natural medicaments for 21st century? *ChemistrySelect*, 3(7): 2196–2214
- Owolabi T. A., Ezenwa K. C., Olayioye E. Y., Iyorhibe O. C., Amodu E., Aferuan O. F., Okubor P. C., Ayinde B. A., Okogun J. I. (2019) Adaptogenic (anti-stress) effect of aqueous *Musanga cecropioides* (Urticaceae). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(10): 2558–2565
- Schiavone S., Jaquet V., Trabace L., Krause K. H. (2013) Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(12): 1475–1490
- Solodkova O. A., Zenkina V. G. (2018) Influence of adaptogens on the morphofunctional state of adrenal glands in stress. *European Journal of Natural History*, 4: 72–75
- Todorova V., Ivanov K., Delattre C., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S. (2021) Plant adaptogens – history and future perspectives. *Nutrients*, 13(8): 2861
- Vera F., Antenucci C. D., Zenuto R. R. (2011) Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *General and Comparative Endocrinology*, 170(3): 550–557