

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

**ДЫХАНИЕ, ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ И ПРО-/АНТИОКСИДАНТНЫЙ
МЕТАБОЛИЗМ В ВЕРХУШКЕ ПОДЗЕМНОГО ПОБЕГА *Achillea millefolium*
В ПРОЦЕССЕ ФОТОМОРФОГЕНЕЗА**

© 2022 г. С. П. Маслова^а, *, М. А. Шелякин^а, Е. В. Силина^а, Р. В. Малышев^а

^аИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: maslova@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 07.02.2022 г.

После доработки 10.03.2022 г.

Принята к публикации 10.03.2022 г.

Получены данные об энергетическом статусе и активности про-/антиоксидантного метаболизма в процессе фотоморфогенеза верхушки корневища тысячелистника обыкновенного *Achillea millefolium* L. На фотофобном этапе развития этиолированные верхушки корневищ характеризовались повышенной интенсивностью дыхания и скоростью запасаения энергии: доля энергетически эффективного цитохромного дыхания составляла 60%, вклад альтернативного пути (АП) не превышал 25% общего дыхания. Этиолированные верхушки накапливали значительные количества прооксидантов и характеризовались относительно высокой активностью гваяколпероксидазы и супероксиддисмутазы, что может быть связано с вовлечением компонентов про-/антиоксидантного метаболизма в регуляцию процессов роста и дифференцировки клеток и тканей в конусе нарастания во время подземного роста. На фотофильном этапе в верхушке зеленеющего сармента выявлено значительное снижение скорости запасаения энергии, повышение способности энергетически низкоэффективного АП, доля которого составляла 50% общей дыхательной активности. При фотоморфогенетическом переходе в верхушках зеленеющих сарментов показано усиление про-/антиоксидантного метаболизма: концентрация продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) и H₂O₂, возросла на 25–30%, уровень активности антиоксидантных ферментов повышался на 24–86%. Фотоморфогенетический переход не приводил к возникновению новых изоформ антиоксидантных ферментов, однако выявлены изменения их активности в зависимости от фазы развития побега. В молодых листьях сарментов повышалась активность медь/цинк-содержащей изоформы супероксиддисмутазы (Cu/Zn-SOD-2), локализованной в хлоропластах. В листьях отмечали снижение содержания прооксидантов и усиление способности цитохромного пути дыхания, что отражает успешную адаптацию подземных побегов *A. millefolium* к росту на свету.

Ключевые слова: *Achillea millefolium*, корневище, сармент, фотоморфогенез, фотофильная фаза, фотофобная фаза, цитохромное дыхание, альтернативное дыхание, прооксиданты, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S0015330322060203

Корневища многолетних трав способны расти продолжительное время в горизонтальном положении под поверхностью почвы, не проявляя фотоили гравитропических реакций. Конус нарастания подземных побегов длиннокорневищных травянистых многолетников периодически формирует почки, которые затем переходят в надземный побег – сармент. Апикальная часть сармента в процессе подземного горизонтального роста дифференцируется, образуя зачатки ассимилирующих листьев [1, 2]. Мы называем этот процесс фото-

морфогенетическим переходом, когда верхушка делает ростовой изгиб и переходит от подземного (диатропного) роста к ортотропному (надземному) развитию. Фотоморфогенетический переход – это совокупность процессов роста и развития клеток и тканей при переходе верхушки подземного побега от фотофобного к фотофильному развитию. Во время фотофобного (подземного) роста осуществляется ветвление корневища и формирование подземных меристем. В период перехода к ортотропному росту (фотофильный этап) верхушка формирует надземные побеги, выполняя функцию ассимиляции.

Ранее нами были исследованы ультраструктурные изменения пластид и содержание фотосинтетических пигментов в процессе фотомор-

Сокращения: ЦП – цитохромное дыхание; АП – альтернативное дыхание; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ТБК-РП – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; SOD – супероксиддисмутаза; GPX – гваяколпероксидаза; САТ – каталаза.

фогенеза верхушки подземного побега у растений *Achillea millefolium* [3]. В этиолированных верхушках обнаружены слаборазвитая мембранная система пластид с одиночными тилакоидами и присутствие зеленых и желтых пигментов. В зеленеющих верхушках подземного побега выявлено формирование гранальной системы хлоропластов и накопление фотосинтетических пигментов, в том числе лютеина и виолоксантина, участвующих в защите слаборазвитой мембранной системы хлоропластов от фотоокисления.

В настоящее время довольно полно изучены механизмы формирования фотосинтетического аппарата, регуляция митохондриального дыхания и функционирование систем антиоксидантной защиты в процессе деэтиоляции у проростков растений [4–7]. Исследований по изучению энергетического статуса и состояния про-/антиоксидантного метаболизма при переходе от фотофобного к фотофильному этапу развития верхушечной почки корневища многолетних трав мы не обнаружили. В отличие от тканей проростков, фотофобный этап развития корневища связан с формированием подземных диаспор, размножением и расселением многолетних растений в процессе подземного роста. На этом этапе подземные побеги характеризуются активным формированием новых меристематических зон, интенсивным дыханием, повышенной активностью фитогормонов ИУК, цитокининов и АБК [8].

Роль энергетического баланса растения, вклад альтернативного пути дыхания (АП) при адаптации растения к различным факторам внешней и внутренней природы обсуждались в классических работах О.А. Семихатовой [9] и исследованиях современных авторов [7, 10, 11]. Однако сведений о соотношении дыхательных путей, функционировании АП в почках корневищ многолетних трав мы не обнаружили.

Мы предположили, что физиолого-биохимические изменения в тканях верхушки корневища при переходе от фотофобного к фотофильному этапу развития модулируют морфогенетические (рост и дифференцировка клеток и тканей) и энергопластические (скорость дыхания, тепловыделение, запасание энергии и соотношение дыхательных путей) процессы в конусе нарастания подземного побега. Компоненты про-/антиоксидантного метаболизма могут действовать как сигнальные молекулы, запуская адаптивные реакции на разных этапах мифогенеза подземного побега корневищного многолетника.

Цель работы — изучение дыхания, запасания энергии и характеристика про-/антиоксидантного метаболизма в верхушке подземных побегов *Achillea millefolium* L. в процессе фотоморфогенеза верхушечной почки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия выращивания растений. В качестве модельного растения использовали тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) — многолетний летнезеленый травянистый тонко-длиннокорневищный симподиально нарастающий поликарпик с удлинённым прямостоячим побегом [12]. Растение формирует два типа подземных побегов — корневища и сарменты. Сарменты отличаются от корневищ наличием в апикальной части листовых примордиев [1]. В фазу цветения растение образует до 30 подземных побегов, из которых 25% составляют сарменты [8].

Растения выращивали из корневищ в вегетационном опыте, в условиях открытого грунта при площади питания 0.4×0.7 м². Почва участка типичная подзолистая, сформированная на покровных суглинках, средней степени окультуренности. В июле, в полдень, при безоблачном небе освещенность могла превышать 500 Вт/м² ФАР, при низкой плотной облачности — уменьшалась более чем в 10 раз. В зоне расположения основной массы корневищ *A. millefolium* (на глубине 5–7 см) освещенность составляла 1–2 Вт/м². Температура почвы на глубине залегания корневищ в июле и августе была в среднем 20 и 15°C, соответственно. Освещенность и температуру воздуха измеряли с помощью регистрирующего устройства LI-1400 (“LI-COR”, США) с набором метеорологических датчиков.

Опыты закладывали летом в 2017–2019 гг. Для изучения физиологических и биохимических показателей растительные образцы отбирали на второй год после посадки корневищами в период генеративного развития (июль–август).

Верхушки подземных побегов (0.3–1 см) исследовали на разных этапах органогенеза апикальной почки: на фотофобном — этиолированные верхушки корневищ, на фотофильном — зеленеющие верхушки сарментов и молодые листья сарментов.

Калореспиromетрические показатели. Скорость метаболического тепловыделения побегов измеряли методом прямого калориметрирования при 20°C. В каждую ячейку помещали по 2–3 верхушки корневищ с 3–5 растений (сырая масса 150–200 мг). Интенсивность дыхания определяли по тепловому эффекту реакции выделяемого объектом CO₂ с 0.4 М раствором NaOH [13]. Измерения тепловыделения и дыхания проводили на микрокалориметре Биотест-2 (Институт биологического приборостроения РАН, г. Пущино, Россия).

Скорость тепловыделения (q) и дыхания (R_{CO_2}) рассчитывали по формулам (1) и (2), соответственно:

$$q = 0.022[(q_2 + q_4)/2] - [(Q_1 + Q_5)/2], \quad (1)$$

$$R_{CO_2} = [(0.022q_3) - q]/108.5, \quad (2)$$

где 0.022 – калибровочный коэффициент прибора, мкВт; 108.5 – тепловой эффект реакции 1 моля CO_2 с 0.4 М раствором NaOH, мкВт/нмоль; Q_1 – значение теплового потока от рабочего контейнера без объекта до начала измерения; Q_5 – значение теплового потока от рабочего контейнера без объекта в конце измерения; q_2 – тепловой поток от контейнера с объектом; q_3 – суммарный тепловой поток от объекта и реакции выделяемого объектом CO_2 с 0.4 М раствором NaOH; q_4 – тепловой поток от контейнера с объектом после удаления емкости со щелочью.

Полученные значения q и R_{CO_2} относили к сухой массе исследуемого объекта и выражали в мкВт/мг и нмоль/(мг с), соответственно. На основании термодинамической модели рассчитывали скорость запасаения энергии на рост ($\Delta H_B R_{SG}$), согласно [13]:

$$\Delta H_B R_{SG} = 455R_{CO_2} - q, \quad (3)$$

где $\Delta H_B R_{SG}$ – скорость роста в эквивалентах запасенной энергии (мкВт/мг сухой массы); R_{CO_2} – дыхание (нмоль/мг сухой массы с); q – тепловыделение (мкВт/мг сухой массы); 455 – константа, изменения энтальпии окисляемых органических соединений в расчете на моль потребленного в дыхании кислорода (мкВт/нмоль).

Скорость дыхания и дыхательных путей. Скорость дыхания верхушек корневищ определяли по поглощению O_2 при 20°C полярографически на Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Великобритания). Для измерения острым лезвием срезали верхушки подземных побегов длиной 3–5 мм. Высечки верхушек свежесобранных подземных побегов массой 15–20 мг помещали в реакционный сосуд, содержащий буферный раствор НЕРЕС (“Компания Хеликон”, Россия) (50 mM, pH 7.2). В процессе измерения образцы находились при постоянном перемешивании. Интенсивность поглощения O_2 отдельными дыхательными путями определяли с добавлением специфических ингибиторов. Оптимальные концентрации ингибиторов дыхательных путей были подобраны в предварительных экспериментах с применением метода прямого титрования с повышением концентрации ингибиторов до насыщения поглощения O_2 тканями высечек верхушек корневищ [10]. В качестве ингибитора альтернативной оксидазы (АОХ) использовали 8 mM раствор салицилгидроксамовой кислоты (СГК) (“Lancaster”, Англия). Активность цитохромоксидазы подавляли 2 mM раствором KCN (“Sigma”, США). Скорость поглощения кислорода выражали как сумму отдельных ком-

понент для расчета способностей отдельных путей дыхания:

$$V_t = V_{alt} + V_{cyt} + V_{res}, \quad (4)$$

где V_t – общее дыхание; V_{alt} – способность альтернативного пути дыхания, подавляемая ингибитором альтернативной оксидазы СГК, V_{cyt} – способность цианидчувствительного (цитохромного) пути дыхания (ЦП); V_{res} – остаточное дыхание, регистрируемое в присутствии ингибиторов альтернативного и цитохромного дыхательных путей.

Интенсивность общего дыхания определяли по скорости поглощения O_2 тканями без добавления ингибиторов. Способность альтернативного дыхательного пути определяли как дыхание, чувствительное к СГК после вычитания остаточного дыхания. Способность цитохромного дыхания определяли как дыхание, чувствительное к KCN в присутствии СГК после вычитания остаточного дыхания. Остаточное дыхание измеряли по скорости поглощения O_2 , после добавления СГК и KCN. Ингибиторы дыхательных путей к пробе добавляли последовательно после измерения интенсивности общего поглощения O_2 . Определения проводили в 9–12-кратной биологической повторности.

Измерение показателей про-/антиоксидантного статуса верхушек корневищ. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению в тканях корневищ продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [14]. Концентрацию ТБК-РП рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ после вычитания неспецифического поглощения при 600 нм и выражали в нмоль ТБК-РП/г сухой массы.

Содержание пероксида водорода (H_2O_2) определяли с использованием ксиленолового оранжевого (“Fisher Chemical”, Великобритания) [15] по графику градуировочной зависимости. Проверку на специфичность проводили по ингибированию образования H_2O_2 при добавлении каталазы (активность 500 ед/мг белка, “Sigma”, США).

Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по ее способности подавлять фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (“DDL”, США) [16]. Активность пероксидаз III класса (далее гваяколпероксидаза – GPX) определяли по методу, основанному на реакции окисления гваякола (“Sigma”, США) до окрашенного соединения тетрагваякола и рассчитывали, используя коэффициент экстинкции тетрагваякола $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [17]. Активность каталазы (CAT) измеряли по количеству разложившегося H_2O_2 (“Sigma”, США) за единицу времени [18] и рассчитывали, используя коэффициент экстинкции H_2O_2 $\epsilon = 0.036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Содер-

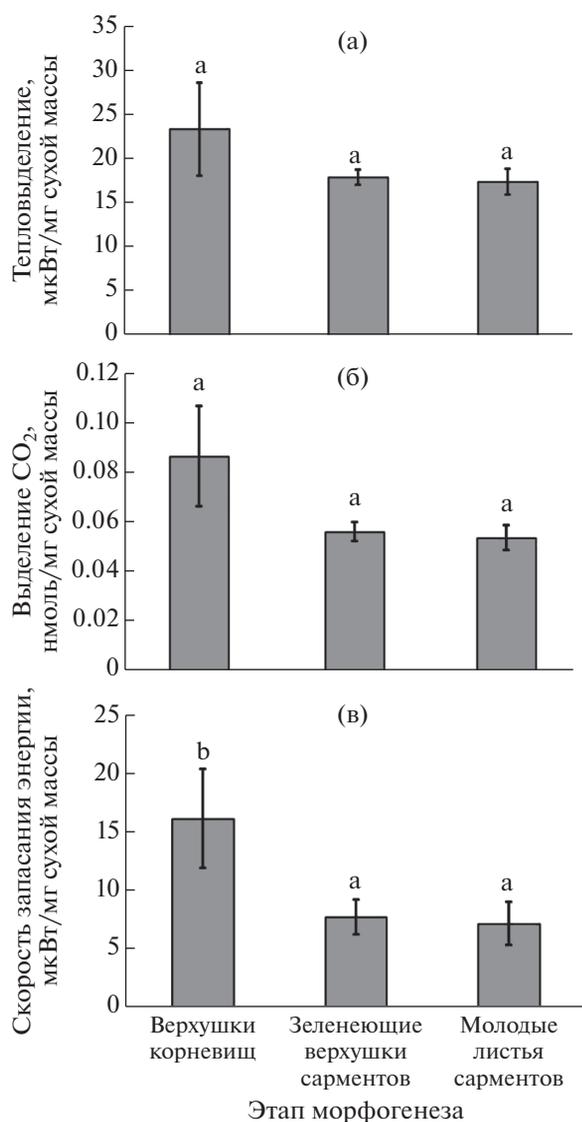


Рис. 1. Интенсивность метаболического тепловыделения (а), дыхания (б) и скорость запасаения энергии (в) в верхушках подземных побегов *Achillea millefolium* на разных этапах морфогенеза. Разные буквенные символы над столбцами обозначают статистическую значимость различий между показателями на разных стадиях развития верхушек корневищ (ANOVA, критерий Дункана, $n = 10$, $P \leq 0.05$).

жание растворимого белка анализировали по методу Бредфорда [19], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (“Sigma”, США). Процедуры выделения белка проводили при температуре 4°C.

Электрофоретическое разделение антиоксидантных ферментов. Для определения изоферментного состава SOD, GPX и CAT применяли метод нативного электрофореза в полиакриламидном геле (12.5% для SOD, 10% для GPX и CAT). Нативный форез проводили при темпера-

туре 4°C и при стабильном токе 180 В [20] без добавления SDS (додecilсульфат натрия). В карман геля вносили от 10 до 20 мкг белка.

Визуализацию изоформ SOD проводили по методу [16]. Для идентификации изоформ SOD использовали ингибиторный анализ [20]. Для каждого ингибиторного анализа получали новый гель с разделенными белками. Для ингибирования Cu/Zn-SOD и Fe-SOD в окрашивающий буфер добавляли 5 мМ H₂O₂. Селективное ингибирование Cu/Zn-SOD происходило при инкубации гелей в буфере, содержащем 3 мМ KCN.

Визуализацию изоформ GPX проводили по методу [21]. Для этого гели инкубировали в Na-ацетатном буфере (pH 5.5), содержащем 20 мМ гваякола и 0.05% (об./об.) H₂O₂. Активность изоформ CAT определяли с использованием метода [22]. Гели помещали в 4 мМ раствор H₂O₂ на 10 мин, дважды промывали дистиллированной водой и инкубировали 5 мин в 1% (мас./об.) растворе FeCl₃ (“Fisher Chemical”, Великобритания) и 1% (мас./об.) K₃[Fe(CN)₆] (“Лабтех”, Россия).

Все биохимические анализы проводили в 2–3-кратной аналитической повторности на 3–4 независимых образцах.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Statistica 10 (“StatSoft Inc.”, США). Значимость различий между средними величинами измеряемых показателей оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (критерий Дункана). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилкса. Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения со стандартной ошибкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Калориметрические показатели и энергетический статус верхушек корневищ

Калориметрические определения показали, что энергетический статус верхушек подземных побегов *Achillea millefolium* зависел от фазы морфогенеза верхушечной почки. На фотофобном этапе развития этиолированные верхушки корневищ характеризовались повышенной скоростью тепловыделения и дыхания. Величина q этиолированных верхушек составляла около 25 мкВт/мг сухой массы и имела тенденцию к снижению в период зеленения верхушек и формирования молодых листьев сарментов (рис. 1а). Скорость выделения CO₂ на фотофобном этапе развития почки также была повышенной в сравнении с фотофильным

Таблица 1. Интенсивность общего дыхания (V_t), способность цитохромного (V_{cyt}), альтернативного (V_{alt}) дыхательных путей и остаточного дыхания (V_{res}) в верхушках подземных побегов *Achillea millefolium* на разных этапах морфогенеза, нмоль O_2 /(г сухой массы мин)

| Этап морфогенеза | V_t | V_{cyt} | V_{alt} | V_{res} |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Верхушки корневищ | 7217 ± 232 ^b | 4381 ± 219 ^c | 1797 ± 143 ^a | 1039 ± 74 ^a |
| Верхушки зеленеющих сарментов | 6344 ± 142 ^{ab} | 2112 ± 88 ^a | 3191 ± 91 ^b | 1040 ± 91 ^a |
| Молодые листья сарментов | 5558 ± 442 ^a | 2957 ± 306 ^b | 1719 ± 163 ^a | 883 ± 67 ^a |

Примечание. Разные буквенные символы обозначают статистическую значимость различий изменения показателей в зависимости от этапа развития верхушек подземных побегов (ANOVA, критерий Дункана, $P \leq 0.05$).

периодом, когда формируются ассимилирующие листья (рис. 1б).

Расчеты показали, что этиолированные верхушки корневищ запасали значительное количество энергии — около 20 мкВт/мг сухой массы (рис. 1в). С переходом от фотофобного к фотофильному этапу морфогенеза в зеленеющей верхушке сармента (зачатки листьев) отмечено снижение в три раза скорости запасаания энергии по сравнению с этиолированными верхушками корневищ.

Дыхание и способность дыхательных путей в корневищах и сарментах

В тканях верхушек этиолированных корневищ скорость поглощения O_2 была максимальной и составляла около 7000 нмоль O_2 /(г сухой массы мин) (табл. 1). В зеленеющих верхушках сарментов отмечали тенденцию к снижению скорости общего дыхания, а интенсивность дыхания формирующихся листьев сарментов была в среднем на 20% ниже по сравнению с этиолированными верхушками.

В дыхании этиолированных верхушек способность энергетически эффективного цитохромного пути (V_{cyt}) была почти в три раза выше по сравнению со способностью дыхания по альтернативному пути (V_{alt}). Вклад ЦП в общее поглощение O_2 корневищами на фотофобном этапе развития составлял более 60%, доля АП не превышала 25% общего дыхания (рис. 2).

При переходе к фотофильному этапу развития на фоне сохранения высокой интенсивности дыхания верхушек сарментов выявлены значимые изменения способности и соотношения дыхательных путей (табл. 1, рис. 2). В зеленеющих верхушках сарментов отмечали почти двукратное усиление способности энергетически мало эффективного V_{alt} и снижение способности основного V_{cyt} по сравнению с этиолированными корневищами. В результате, способность V_{alt} в тканях зеленеющих верхушек была в 1.5 раза выше дыхания по основному дыхательному пути. При этом вовлечение АП в общее дыхание зеленеющих

верхушек увеличилось до 50%, тогда как вклад ЦП снизился в среднем до 30%. В молодых листьях сарментов способность V_{cyt} повышалась в среднем на 40% по сравнению с зеленеющими верхушками. Способность V_{alt} снижалась, и соотношение дыхательных путей восстанавливалось до значений, отмеченных в этиолированных верхушках корневищ.

Независимо от фазы развития верхушки подземного побега на долю остаточного дыхания (V_{res}) приходилось в среднем 14–16% общего поглощения O_2 .

Про-/антиоксидантный статус корневищ и сарментов

На фотофобном этапе развития этиолированные ткани верхушек корневищ содержали наименьшее количество H_2O_2 , ТБК-РП и характеризовались относительно низкой активностью антиоксидантных

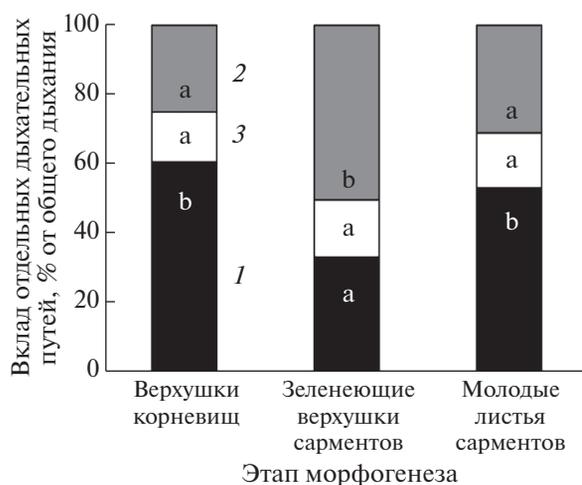


Рис. 2. Относительный вклад цитохромного (1), альтернативного (2) и остаточного (3) дыхания в общее поглощение O_2 верхушек подземных побегов *Achillea millefolium* на разных этапах морфогенеза. Разные буквенные символы на столбцах обозначают статистическую значимость различий между показателями на разных стадиях развития верхушек корневищ (ANOVA, критерий Дункана, $n = 9-12$, $P \leq 0.05$).

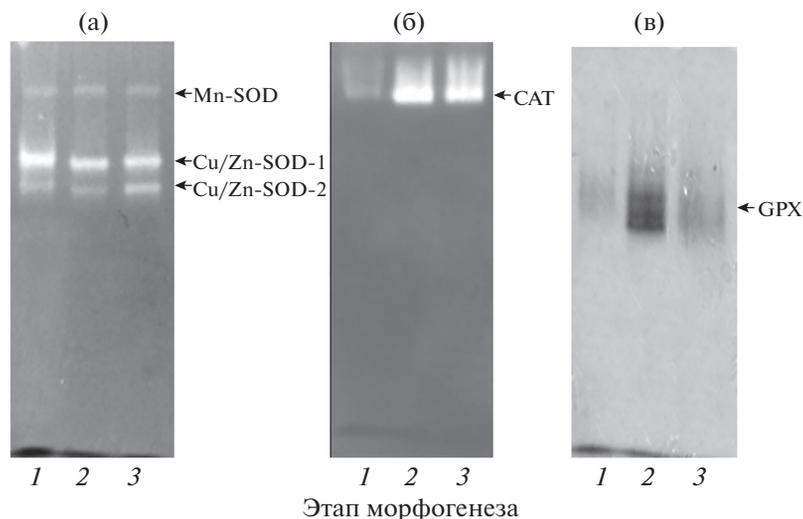


Рис. 3. Электрофореграммы изоформ супероксиддисмутазы (а), гваяколпероксидазы (б) и каталазы (в) в верхушках подземных побегов *Achillea millefolium* на разных этапах морфогенеза: 1 – верхушки корневищ, 2 – верхушки зеленеющих сарментов, 3 – молодые листья сарментов.

ферментов (табл. 2). В ходе морфогенетических преобразований в конусе нарастания корневища, при переходе от фотофобного к фотофильному этапу развития, отмечено усиление процессов перекисного окисления липидов и накопления пероксида водорода (табл. 2). Концентрация ТБК-РП и H_2O_2 возрастала в 1.3 и 2.5 раза соответственно. Повышению содержания прооксидантов в верхушках зеленеющих сарментов соответствовало усиление активности антиоксидантных ферментов. Уровень активности SOD, CAT и GPX увеличился в среднем на 38, 87 и 24% соответственно. В процессе формирования молодых листьев сарментов содержание прооксидантов и активность SOD и GPX снижались до значений, отмеченных для этиолированных верхушек корневищ, а активность CAT продолжала повышаться.

На основе изоферментного анализа антиоксидантных ферментов нами идентифицированы три изоформы SOD, одна изоформа GPX и одна

изоформа CAT в этиолированных верхушках корневищ и в процессе их перехода на фотофильный этап развития (рис. 3). Ингибиторный анализ изоформ SOD выявил наличие одной Mn-SOD и двух Cu/Zn-SOD (рис. 3а). Следует отметить, что наиболее активной изоформой SOD в верхушках подземных побегов была цитозольная Cu/Zn-SOD-1 (рис. 4). Активность Cu/Zn-SOD-2 была наибольшей в молодых листьях сарментов. В целом, изменение относительной активности разных изоформ антиоксидантных ферментов на разных этапах развития корневищ соответствовало их общей активности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рост и ветвление корневищ, формирование новых меристематических зон происходит во второй половине вегетации после прекращения роста надземных побегов. Корневища *Achillea millefolium* на этой стадии развития характеризовались срав-

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов, содержание ТБК-РП и пероксида водорода в верхушках подземных побегов *Achillea millefolium* на разных этапах морфогенеза

| Этап морфогенеза | ТБК-РП, нмоль/г сухой массы | H_2O_2 , мкМ/г сухой массы | SOD Ед/мг белка | GPX, мкМ гваякола/мг белка мин | CAT, мкМ H_2O_2 /мг белка мин |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Верхушки корневищ | 205.2 ± 8.5 ^a | 34.3 ± 3.8 ^a | 26.6 ± 1.3 ^a | 160.0 ± 1.5 ^a | 5.3 ± 0.1 ^a |
| Верхушки зеленеющих сарментов | 268.9 ± 18.8 ^b | 84.0 ± 2.6 ^c | 36.1 ± 0.3 ^b | 299.4 ± 6.2 ^b | 6.6 ± 0.2 ^b |
| Молодые листья сарментов | 217.8 ± 8.1 ^a | 54.2 ± 4.8 ^b | 28.3 ± 0.2 ^a | 207.1 ± 32.9 ^a | 8.4 ± 0.1 ^c |

Примечание. Активность супероксиддисмутазы (SOD), гваяколпероксидазы (GPX), каталазы (CAT), содержание МДА (ТБК-РП) и H_2O_2 представлены как средние значения ± стандартная ошибка. Разные буквенные символы обозначают статистическую значимость различий изменения показателей в зависимости от этапа развития верхушек подземных побегов (ANOVA, критерий Дункана, $P \leq 0.05$).

нительно высокой интенсивностью дыхания, значительным содержанием неструктурных углеводов и повышенной активностью фитогормонов ИУК, цитокининов и АБК [8]. В этот период 25% корневищ осуществляют переход от фотофобного к фотофильному этапу развития верхушечной почки, формируя надземные ассимилирующие побеги.

Выделение тепла клетками является интегральным показателем активности метаболизма. Калориметрические определения показали, что теплопродукция этиолированных верхушек корневищ *A. millefolium* была сравнительно высокой и составляла около 25 мкВт/мг сухой массы (рис. 1). Сведения о теплопродукции почек корневищ в литературе единичны. Ранее нами было показано, что теплопродукция верхушек корневищ *A. millefolium* возрастала с 5 до 25 мкВт/мг сухой массы с увеличением температуры от 5 до 25°C [8]. Величина этого показателя для верхушек корневищ *Mentha arvensis* и *Pyrola rotundifolia* при 20°C составляла 13 и 2.5 мкВт/мг сухой массы, соответственно [23].

В процессе зеленения верхушки подземного побега отмечали тенденцию к снижению скорости тепловыделения и выделения CO₂, измеренного калориметрически (рис. 1). Расчеты показали, что скорость роста, отражающая количество запасенной энергии в биомассе, была максимальной в этиолированных верхушках корневища, значительно снижалась при фотоморфогенетическом переходе и была низкой в молодых листьях сарментов.

Сведений об интенсивности дыхания и соотношении дыхательных путей в почках корневищ многолетних трав мы не обнаружили. Нами показано, что на фотофобном этапе развития этиолированные верхушки корневищ *A. millefolium* характеризовались сравнительно высокой скоростью поглощения O₂ (табл. 1). Дыхательная активность этиолированных верхушек подземных корневищ была в 1.5–2 раза выше по сравнению с проростками пшеницы [10] или почками черники при выходе из состояния покоя [24]. Высокая скорость поглощения O₂ и трехкратное превышение способности V_{cyt}, сопряженного с образованием энергии, над способностью энергетически малоэффективного V_{alt} указывают на запрос энергии для роста, деления и дифференциации клеток и тканей в верхушечных меристемах этиолированных корневищ в этот период развития. Показано, что рост корневищ осуществлялся за счет увеличения числа и длины метамеров, что обеспечивается значительной активностью гормонов роста в тканях верхушечных и латеральных меристем в это время [8].

В процессе фотоморфогенеза апикальной почки подземного побега *A. millefolium*, при переходе

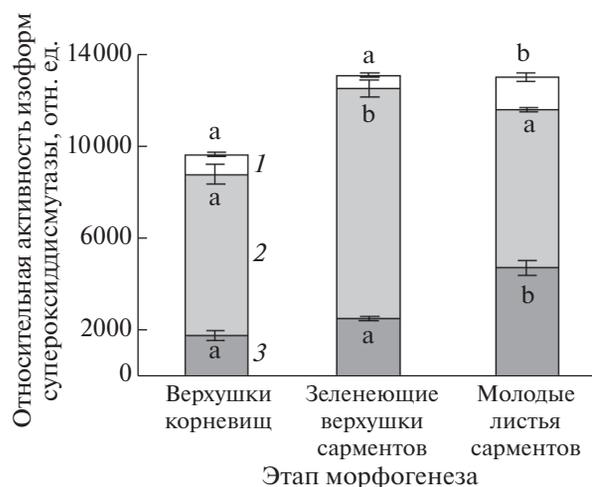


Рис. 4. Относительная активность разных изоформ супероксиддисмутазы (SOD) в подземных побегах *Achillea millefolium* в процессе фотоморфогенеза (1 – Mn-SOD, 2 – Cu/Zn-SOD-1, 3 – Cu/Zn-SOD-2). Разные буквенные символы на столбцах обозначают статистическую значимость различий между показателями на разных стадиях развития верхушек корневищ (ANOVA, критерий Дункана, $n = 4$, $P \leq 0.05$).

от фотофобного к фотофильному этапу развития, выявлено снижение метаболической активности тканей. Верхушки сарментов на фотофильном этапе характеризовались снижением скорости дыхания и запасали в три раза меньше энергии по сравнению с этиолированными верхушками корневищ (рис. 1). В верхушках зеленеющих сарментов усиливалось вовлечение АП, доля которого в общем дыхании составляла 50% (рис. 2). В этот период в конусе нарастания формируется фотофильный гистологический комплекс – листовые примордии, и осуществляется подготовка к переходу от гетеротрофного к автотрофному способу питания. В тканях зеленеющей верхушки сарментов формируются хлоропласты с развитой гранальной системой, происходит накопление фотосинтетических пигментов [3], что говорит об активном формировании компонентов фотосинтетического аппарата при фотоморфогенетическом переходе.

Активация АП в зеленеющих верхушках сарментов может свидетельствовать об участии альтернативной оксидазы (АОХ) в защите фотосинтетического аппарата (ФСА), когда собственные защитные системы хлоропласта находятся в стадии формирования. Известно, что при переходе растений от роста в темноте к росту на свету в хлоропластах образуется избыток восстановительных эквивалентов, который может транспортироваться и окисляться в ЭТЦ митохондрий [11, 25, 26]. Усиление интенсивности дыхания по АП отмечали при переходе от роста в темноте к формированию на свету у семядольных листьев сои [27] и первого листа пшеницы [10]. В первые часы

деэтиоляции проростков риса и пшеницы показано усиление экспрессии генов, кодирующих белок АОХ [28, 29]. Активация дыхания по АП у зеленеющих верхушек сарментов свидетельствует в пользу современной гипотезы о прямой светозависимой регуляции компонентов митохондриальной дыхательной сети растений через систему фоторецепторов [11, 30, 31].

В ходе фотоморфогенетических преобразований в конусе нарастания корневища *A. millefolium* выявлено усиление процессов перекисного окисления липидов, увеличение содержания H_2O_2 и повышение активности антиоксидантных ферментов (табл. 2). На этапе зеленения верхушки подземного побега – сармента – формируется фотосинтетический аппарат и устанавливается новый уровень про-/антиоксидантного баланса. При этом активация антиоксидантной системы препятствует развитию окислительного стресса при фотоморфогенетическом переходе, что способствует поддержанию гомеостаза. H_2O_2 считают сигнальной молекулой, которая участвует в адаптации роста растений на свету [32] и играет важную роль в запуске экспрессии генов антиоксидантных ферментов для фотозащиты [33].

Следует отметить, что совместное усиление активности антиоксидантных ферментов и способности АП в зеленеющих верхушках сарментов свидетельствует в пользу полифункциональности АОХ в растительной клетке и позволяет рассматривать АП в качестве компонента антиоксидантной системы растений [34]. Однонаправленный характер экспрессии генов, кодирующих ферменты антиоксидантной системы и белок АОХ, ранее был выявлен в эксперименте с деэтиоляцией проростков пшеницы [7]. Полученные нами результаты указывают на универсальность некоторых физиологических механизмов адаптации растений в период перехода от гетеротрофного к фотоавтотрофному типу питания как в условиях эксперимента, так и в природе.

В молодых листьях сарментов отмечали снижение содержания ТБК-РП и H_2O_2 (табл. 2), что может быть обусловлено активацией антиоксидантных ферментов и собственных систем защиты сформировавшегося ФСА. Усиление на этом фоне способности ЦП и снижение АП отражает успешную адаптацию верхушки подземных побегов *A. millefolium* к росту на свету (табл. 1, рис. 2).

Переход от фотофобного этапа развития к фотофильному не приводил к появлению новых изоформ антиоксидантных ферментов. По-видимому, основные ферменты антиоксидантной системы защиты присутствовали и участвовали в регуляции содержания АФК уже на гетеротрофном этапе развития верхушек корневищ. Мы не обнаружили Fe-SOD в зеленеющих верхушках и молодых листьях сарментов, хотя известно, что

данная изоформа локализована в хлоропластах растительных клеток [35]. Наиболее активной изоформой SOD в верхушках подземных побегов на разных этапах развития была Cu/Zn-SOD-1 (рис. 3). В молодых листьях сарментов отмечено повышение активности Cu/Zn-SOD-2. Это согласуется с представлениями о локализации данных изоферментов в цитозоле и хлоропластах растительной клетки [35]. Активность митохондриальной изоформы Mn-SOD не изменялась в ходе зеленения на фоне увеличения содержания АФК. Вероятно, активации АП дыхания в процессе фотоморфогенеза верхушки корневища было достаточно для контроля уровня образования АФК в митохондриях. При изоферментном анализе GPX и САТ идентифицировали по одной изоформе исследуемых ферментов. В целом, общая активность антиоксидантных ферментов совпадала с активностью их изоформ.

Выявлено, что этиолированные верхушки корневищ *A. millefolium* накапливали значительное количество H_2O_2 и характеризовались относительно высокой активностью GPX и SOD (табл. 2). Например, в этиолированных проростках пшеницы исследуемые показатели были существенно ниже [7]. Это может быть связано с высокой функциональной активностью верхушек корневищ на фотофобном этапе развития и вовлечением компонентов про-/антиоксидантного метаболизма в регуляцию процессов роста и дифференцировки клеток и тканей в конусе нарастания во время подземного роста и формирования вегетативных меристем. Компоненты про-/антиоксидантного метаболизма могут служить сигнальными молекулами, модулируя процессы роста и развития растений [36–39], и участвовать в регуляции органогенеза, поддерживая баланс между клеточной пролиферацией и дифференцировкой в апикальных меристемах [40].

Итак, нами получены оригинальные данные о дыхании, запасании энергии и компонентах про-/антиоксидантного метаболизма в верхушках корневищ *A. millefolium* при фотоморфогенетическом переходе. Выявлена высокая скорость запасания энергии и поглощения O_2 , трехкратное превышение способности ЦП, сопряженного с образованием энергии, над способностью энергетически малоэффективного АП в тканях этиолированных верхушек корневищ. Это обусловлено запросом энергии для роста, деления и дифференциации клеток и тканей в верхушечных меристемах этиолированных корневищ в этот период развития. Обнаружены значительные количества прооксидантов и сравнительно высокая активность гваяколпероксидазы и супероксиддисмутазы, что может быть связано с вовлечением компонентов про-/антиоксидантного метаболизма в регуляцию процессов роста и дифференцировки клеток

и тканей в конусе нарастания во время фотофобного развития. При зеленении верхушки подземного побега, когда собственные защитные системы фотосинтетического аппарата находятся в стадии формирования, обнаружена активация энергетически малоэффективного АП: его доля составляла 50% общей дыхательной активности. На этапе зеленения происходит значительное снижение скорости запасаания энергии, устанавливается новый уровень про-/антиоксидантного баланса. Показано усиление процессов ПОЛ, увеличение содержания H_2O_2 и повышение активности антиоксидантных ферментов. В листьях сарментов отмечали снижение содержания прооксидантов и усиление активности энергетически эффективного цитохромного пути дыхания, что отражает успешную адаптацию подземных побегов *A. millefolium* к росту на свету.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКР “Фотосинтез, дыхание и биоэнергетика растений и фототрофных организмов (физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и экологические аспекты)” (регистрационный номер 122040600021-4).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markarov A.M., Golovko T.K. Growth orientation of underground shoots in perennial herbaceous plants. 3. Morphophysiology of underground shoots and sarment development // Russ. J. Plant Physiol. 1995. V. 2. P. 630.
2. Maslova S.P., Golovko T.K. Tropisms in underground shoots — stolons and rhizomes // Biol. Bull. Rev. 2018. V. 78. P. 47. <https://doi.org/10.1134/S207908641803009X>
3. Маслова С.П., Дымова О.В., Плюснина С.Н. Изменение ультраструктуры пластид и пигментного комплекса в процессе морфогенеза подземных побегов *Achillea millefolium* (Asteraceae) // Ботан. журн. 2019. Т. 104. С. 1727.
4. Reinbothe C., Bakkouri M.E., Buhr F., Muraki N., Nomata J., Kurisu G., Fujita Y., Reinbothe S. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 614. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.002>
5. Solymosi K., Schoefs B. Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms // Photosynth Res. 2010. V. 105. P. 143. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9568-2>
6. Garmash E.V., Dymova O.V., Malyshev R.V., Plyusnina S.N., Golovko T.K. Developmental changes in energy dissipation in etiolated wheat seedlings during the greening process // Photosynthetica. 2013. V. 51. P. 497.
7. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Silina E.V., Voinikov V.K., Golovko T.K. Expression profiles of genes for mitochondrial respiratory energy-dissipating systems and antioxidant enzymes in wheat leaves during de-etiolation // J. Plant Physiol. 2017. V. 215. P. 110. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.023>
8. Maslova S.P., Tabalenkova G.N., Malyshev R.V., Golovko T.K. Seasonal changes in growth and metabolic activity of underground shoots of yarrow // Russ. J. Plant Physiol. 2013. V. 60. P. 821. <https://doi.org/10.1134/S1021443713060071>
9. Семухатова О.А., Юдина О.С. 60 лет изучения темнового дыхания растений разных биомов в Лаборатории экологической физиологии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН // Бот. журн. 2012. Т. 97. С. 538.
10. Garmash E.V., Malyshev R.V., Shelyakin M.A., Golovko T.K. Activities of respiratory pathways and the pool of non-structural carbohydrates in greening leaves of spring wheat seedlings // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 160. <https://doi.org/10.1134/S1021443714020046>
11. Garmash E.V. Role of mitochondrial alternative oxidase in the regulation of cellular homeostasis during development of photosynthetic function in greening leaves // Plant Biol. 2021. V. 23. P. 221. <https://doi.org/10.1111/plb.13217>
12. Безделев А.Б., Безделева Т.А. Жизненные формы семенных растений российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука, 2006. 296 с.
13. Hansen L.D., Hopkin M.S., Rank D.R., Anekonda T.S., Breidenbach R.W., Criddle R.S. The relation between plant growth and respiration: A thermodynamic model // Planta. 1994. V. 194. P. 77. <https://doi.org/10.1007/BF00201037>
14. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
15. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., Lorenzo G.D. Extracellular H_2O_2 induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 1379. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
16. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
17. Maehly A.C., Chance B. The assay of catalases and peroxidases // Meth. Biochem. Anal. 1954. V. 1. P. 357. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
18. Aebi H. Catalase in vitro // Meth. Enzymol. 1984. V. 105. P. 121. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
19. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

20. *Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E., Baczek-kwinta R., Lüttge U., Ratajczak R.* Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C₃-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *Plant Cell Environ.* 1998. V. 21. P. 169.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00266.x>
21. *Radotić K., Dučić T., Mutavdžić D.* Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium // *Environ. Exp. Bot.* 2000. V. 44. P. 105.
[https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(00\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00059-9)
22. *Pezzoni M., Pizarro R.A., Costa C.S.* Detection of catalase activity by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in cell extracts from *Pseudomonas aeruginosa* // *Bio Protoc.* 2018. V. 8. P. 2869.
<https://dx.doi.org/10.21769%2FBioProtoc.2869>
23. *Маслова С.П., Табаленкова Г.Н.* Гормональный статус подземных побегов и распределение ассимилятов у длиннокорневищных видов // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* 2010. № 5(1). P. 119.
24. *Malyshev R.V., Shelyakin M.A., Golovko T.K.* Bud dormancy breaking affects respiration and energy balance of bilberry shoots in the initial stage of growth // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 409.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716030092>
25. *Noguchi K., Yoshida K.* Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves // *Mitochondrion.* 2008. V. 8. P. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.09.003>
26. *Garmash E.V.* Mitochondrial respiration of the photosynthesizing cell // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 13.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060072>
27. *Ribas-Carbo M., Robinson S.A., González-Meler M.A., Lennon A.M., Giles L., Siedow J.N., Berry J.A.* Effects of light on respiration and oxygen isotope fractionation in soybean cotyledons // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. P. 983.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00607.x>
28. *Feng H.Q., Li H.Y., Zhou G.M., Liang H.G., Duan J.G., Zhi D.J., Li X., Ma J.* Influence of irradiation on cyanide-resistant respiration and AOX1 multi-gene family expression during greening of etiolated rice seedlings // *Photosynthetica.* 2007. V. 45. P. 2720.
29. *Garmash E.V., Grabelnykh O.I., Velegzhaninov I.O., Borovik O.A., Dalke I.V., Voinikov V.K., Golovko T.K.* Light regulation of mitochondrial alternative oxidase pathway during greening of etiolated wheat seedlings // *J. Plant Physiol.* 2015. V. 174. P. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.09.016>
30. *Ribas-Carbo M., Giles L., Flexas J., Briggs W., Berry J.A.* Phytochrome-driven changes in respiratory electron transport partitioning in soybean (*Glycine max.* L.) cotyledons // *Plant Biol.* 2008. V. 10. P. 281.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00046.x>
31. *Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N.* Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration: Phytochrome regulation of plant respiration // *Plant Cell Environ.* 2014. V. 37. P. 290.
<https://doi.org/10.1111/pce.12155>
32. *Mullineaux P., Karpinski S.* Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 43.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(01\)00226-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(01)00226-6)
33. *Neill S., Desikan R., Hancock J.* Hydrogen peroxide signalling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 388.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00282-0)
34. *Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L.* The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. V. 96. P. 8271.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>
35. *Kliebenstein D.J., Monde R.-A., Last R.L.* Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 637.
<https://doi.org/10.1104/pp.118.2.637>
36. *Пескин А.В.* О регуляторной роли активных форм кислорода // *Биохимия.* 1998. Т. 63. P. 1305.
37. *Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J.* Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation // *Cell Physiol. Biochem.* 2001. V. 11. P. 173.
<https://doi.org/10.1159/000047804>
38. *Miller G., Shulaev V., Mittler R.* Reactive oxygen signaling and abiotic stress // *Physiol. Plant.* 2008. V. 133. P. 481.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x>
39. *Tripathy B.C., Oelmüller R.* Reactive oxygen species generation and signaling in plants // *Plant Signal. Behav.* 2012. V. 7. P. 1621.
<https://doi.org/10.4161/psb.22455>
40. *Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N.* Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root // *Cell.* 2010. V. 143. P. 606.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020>