

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ СЕМЯН НА АКТИВНОСТЬ КАРБОАНГИДРАЗЫ, СКОРОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА, УСТЬИЧНУЮ ПРОВОДИМОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИЗБЫТКЕ ЦИНКА

© 2023 г. А. А. Игнатенко^{1,*}, И. А. Нилова¹, Е. С. Холопцева¹,
член-корреспондент РАН А. Ф. Титов¹, Н. М. Казнина¹

Поступило 08.08.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принято к публикации 02.09.2023 г.

Изучали влияние обработки салициловой кислотой (СК) семян на активность карбоангидразы (КА), скорость фотосинтеза, устьичную проводимость и содержание пигментов в листьях пшеницы при оптимальном (2 мкМ) содержании цинка в корнеобитаемой среде или его избытке (1500 мкМ). Впервые показано, что при оптимальном содержании цинка обработка СК семян приводит к повышению по сравнению с необработанными растениями активности КА и увеличению устьичной проводимости, не сказываясь при этом на скорости фотосинтеза. При избытке цинка в корнеобитаемой среде обработка СК семян усиливала снижение активности КА, однако скорость фотосинтеза при этом была выше, чем у необработанных растений, очевидно, за счет повышения содержания хлорофиллов и каротиноидов, и увеличения устьичной проводимости. Сделан вывод, что СК, наряду с другими факторами негормональной природы и гормонами, принимает участие в защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы на повышенное содержание цинка в окружающей среде.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., салициловая кислота, избыток цинка, карбоангидраза, фотосинтетические пигменты, устьичная проводимость

DOI: 10.31857/S2686738923700415, **EDN:** GQMEUD

Салициловая кислота (СК) является полифункциональным регулятором фенольной природы, который участвует во многих физиологических процессах у растений, включая дыхание, фотосинтез, транспирацию и водный обмен [1, 2]. Она также участвует в регуляции морфогенеза, движения устьиц, транспорта веществ, термогенеза, формировании устойчивости растений к патогенам и в их адаптации к некоторым абиотическим стрессорам, таким, в частности, как тяжелые металлы [1–3].

Известно, что одной из основных причин отрицательного воздействия тяжелых металлов на растения является нарушение структуры и функций фотосинтетического аппарата (ФСА), приводящее к торможению их роста и развития, и в конечном итоге к снижению продуктивности [3, 4].

Поэтому изучению защитного действия СК, направленного на поддержание активности ФСА в условиях избытка тяжелых металлов, уделяется в последние годы повышенное внимание. При этом обнаружено, что в присутствии таких металлов, как кадмий, ртуть или цинк обработка СК растений способствует поддержанию нативной ультраструктуры хлоропластов [5] и фотохимической активности фотосистем [6], а также необходимого уровня фотосинтетических пигментов [7, 8], что обеспечивает высокую скорость фотосинтеза [5]. Кроме того, обнаружено, что у обработанных СК растений, испытывающих кадмиевый стресс, экзогенная СК вызывает увеличение активности РУБИСКО и ФЕП-карбоксилазы [5].

В последнее время изучается роль СК в регуляции активности цинксодержащего фермента карбоангидразы (КА, КФ 4.2.1.1), который ускоряет взаимопревращение форм неорганического углерода и обеспечивает РУБИСКО молекулами CO₂ [9–11]. В листьях высших растений КА локализована в строме хлоропластов и цитоплазме и является одним из наиболее массовых белков, уступая по количеству только РУБИСКО [9]. Представители разных семейств КА (α-, β-, γ-типы) участву-

¹Институт биологии — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Федерального исследовательского
центра “Карельский научный центр Российской
академии наук”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: angelina911@ya.ru

ют в дыхании и фотосинтезе, движении устьиц и биосинтезе липидов [9, 11]. Обсуждается также вовлечение КА в сигналинг СК, поскольку она относится к СК-связывающим белкам — SABPs (Salicylic Acid Binding Protein) [10–12]. Взаимодействие СК с КА (SABP3) приводит к изменению активности последней, однако, характер этих изменений может быть различным, в том числе в зависимости от условий роста растений [10, 13]. Например, обнаружено, что обработка СК мяты (*Mentha piperita* L.) вызывает увеличение активности КА в присутствии кадмия, что способствует поддержанию фотосинтетической активности и снижению негативного эффекта металла на растения [14]. В отношении возможного влияния СК на активность КА при избытке цинка в окружающей среде данные в известной нам литературе отсутствуют. Отмечаются только снижение активности КА в условиях дефицита цинка [11] и повышение ее активности при добавлении этого металла в среду роста [15].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы было изучение влияния обработки СК семян на активность КА, скорость фотосинтеза, устьичную проводимость и содержание пигментов в листьях растений пшеницы, находящихся в условиях избытка цинка в корнеобитаемой среде.

Исследования проводили на растениях яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Злата. Семена были предоставлены ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”». Часть семян проращивали в течение трех суток на дистиллированной воде (вариант “без обработки”), другую часть — в течение первых суток выдерживали на растворе СК, затем отмывали и продолжали проращивать на дистиллированной воде (вариант “обработка СК семян”). Концентрация СК (100 мкМ) и длительность обработки (1 сут) были выбраны на основании предварительных опытов. Проклюнувшиеся семена обоих вариантов высаживали в пластиковые контейнеры (объемом 1.4 л) с питательным раствором Хогланда-Арнона с оптимальным (2 мкМ) или избыточным (1500 мкМ) содержанием цинка. Растения выращивали в камере искусственного климата при температуре 22°C, относительной влажности воздуха 60–70%, ФАР 180 мкмоль/(м²·с) и 14-часовом фотопериоде в течение 11 сут. После чего в их листьях измеряли активность КА, интенсивность фотосинтеза, содержание фотосинтетических пигментов и устьичную проводимость.

Активность КА определяли по изменению оптической плотности реакционной смеси (100 мМ К-фосфатный буфер, pH 7.8 и 1.5 мМ pNPA) после добавления ферментного экстракта при 348 нм [16]. Измерение интенсивности фотосинтеза и устьичной проводимости проводили с использованием системы для исследования CO₂-га-

зообмена и водяных паров HCM-1000 (“Walz”, Германия). Скорость ассимиляции CO₂ измеряли при интенсивности ФАР 200 мкмоль/(м²·с). Содержание пигментов определяли спектрофотометрически, экстрагируя их 80% ацетоном. Все измерения проводили на втором листе. Биологическая повторность составляла 3–5 растений в зависимости от показателя, аналитическая повторность — 3-кратная. Весь опыт повторяли дважды. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимо различающиеся величины каждого изученного показателя (при $p < 0.05$) обозначены разными латинскими буквами.

В ходе исследований установлено, что при оптимальном содержании цинка (Zn 2) у растений пшеницы после обработки СК семян активность КА была несколько выше, чем у растений, семена которых не подвергались обработке (рис. 1а). Подобный эффект ранее был обнаружен при опрыскивании СК растений горчицы (*Brassica juncea* L. Czern & Coss) [17] и томата (*Lycopersicon esculentum* L.) [18] в оптимальных условиях роста.

При избытке цинка (Zn 1500) в корнеобитаемой среде активность КА снижалась как у необработанных СК растений, так и у обработанных, но у последних в большей степени (рис. 1а). Об отрицательном воздействии тяжелых металлов, включая цинк, на синтез ферментов, их структуру и функционирование в растительных клетках уже неоднократно указывалось ранее [3, 4, 19]. К примеру, присутствие в среде ионов свободного цинка вызывало существенное снижение эстеразной и фосфатазной активности у растений рапса (*Brassica napus* L.) [19]. Однако, как влияет СК на активность ферментов у растений в условиях избыточного содержания цинка, пока практически неизвестно. Результаты нашего исследования показали, что обработка СК усиливает ингибирующее действие избытка цинка на активность КА (рис. 1а). Как известно из литературы, СК в концентрациях, превышающих физиологические, может снижать активность КА, как это показано на растениях табака (*Nicotiana benthamiana* Domin) [12]. Можно предположить, что в условиях избытка цинка происходило повышение эндогенного уровня СК в клетках растений, что, например, наблюдалось ранее при действии других тяжелых металлов [1]. Кроме того, сама обработка могла усилить накопление СК вследствие гидролиза ее связанных форм или синтеза новых молекул.

В ходе экспериментов было также выявлено, что при оптимальном содержании цинка (Zn 2) обработка СК семян не сказывается на интенсивности фотосинтеза у пшеницы. Скорость этого процесса оказалась практически равной у расте-

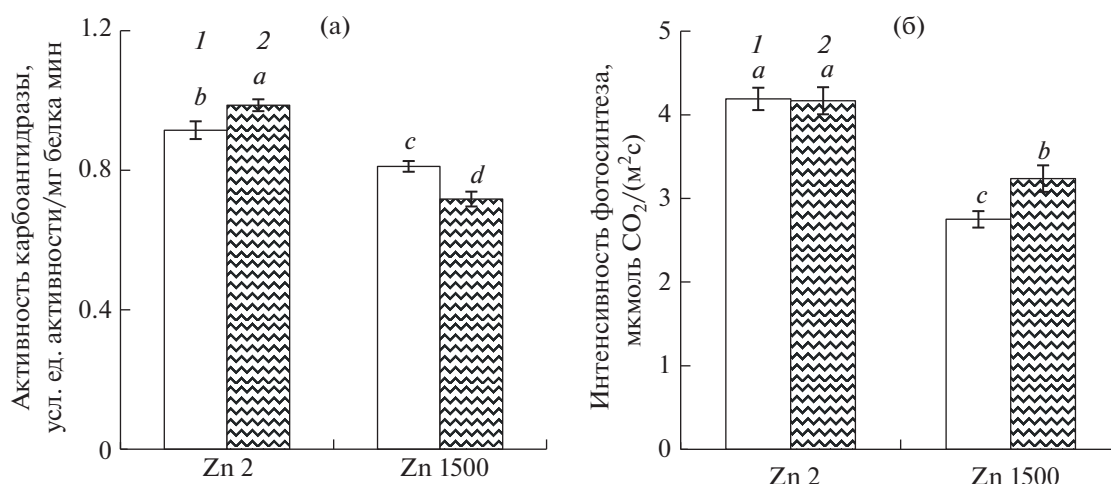


Рис. 1. Активность карбоангидразы (а) и интенсивность фотосинтеза (б) в листьях пшеницы при оптимальном (2 мкМ) или избыточном (1500 мкМ) содержании цинка. Здесь и далее: 1 – растения выращены из семян, необработанных СК; 2 – растения выращены из семян, обработанных СК (100 мкМ).

ний в обоих вариантах опыта (рис. 1б). Избыток цинка (Zn 1500) вызывал заметное торможение (по сравнению с Zn 2) скорости этого процесса, причем у необработанных СК растений в большей степени, чем у обработанных (рис. 1б).

Поскольку скорость фотосинтеза во многом зависит от фотосинтетических пигментов, нами было определено содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях пшеницы. Обнаружено, что если при оптимальном содержании цинка (Zn 2) обработка СК семян не приводила к увеличению содержания изученных пигментов, то в условиях избытка металла (Zn 1500) их уровень превышал таковой у необработанных растений (табл. 1). Подобный эффект мог быть обусловлен участием СК в регуляции активности генов синтеза хлорофилла. В пользу этого предположения свидетельствуют, в частности, данные о повышении у обработанных СК растений мелиссы (*Melissa officinalis* L.) содержания транскриптов гена *CHLG*, кодирующего один из ферментов метаболизма хлорофилла – хлорофиллсинтазу, при действии ртути [7]. Нами также зафиксировано, что в условиях избытка цинка обработка СК семян спо-

собствовала увеличению по сравнению с необработанными растениями содержания в листьях каротиноидов (табл. 1), которые, как известно, не только участвуют в поглощении световой энергии, но и в защите клеток от негативного действия АФК [8].

Помимо пигментов, скорость фотосинтеза в значительной мере зависит от степени открытия устьиц и устьичной проводимости. В наших исследованиях при оптимальном содержании цинка (Zn 2) обработка СК приводила к повышению устьичной проводимости, а при избытке цинка (Zn 1500) в корнеобитаемой среде она обеспечивала меньшее по сравнению с необработанными растениями снижение устьичной проводимости (табл. 1), т.е. положительно сказывалась на активности ФСА в этих условиях. Заметим, что имеются данные о том, что в регуляции работы устьичного аппарата может участвовать КА. В частности, у двойного мутанта кукурузы (*Zea mays* L.) *ca1ca2* со сниженной активностью КА наблюдалась более высокая устьичная проводимость по сравнению с растениями дикого типа [20]. Поэтому нельзя исключить, что уменьшение активности КА, регистрируемое в наших опытах у растений в варианте с

Таблица 1. Содержание фотосинтетических пигментов и устьичная проводимость в листьях пшеницы при оптимальном (2 мкМ) или избыточном (1500 мкМ) содержании цинка

Показатель	Zn 2		Zn 1500	
	без обработки	обработка СК семян	без обработки	обработка СК семян
Содержание хлорофиллов (a+b), мг/г сухой массы	14.77 ± 0.32 ^a	14.26 ± 0.19 ^a	7.76 ± 0.17 ^c	8.40 ± 0.28 ^b
Содержание каротиноидов, мг/г сухой массы	2.75 ± 0.05 ^a	2.79 ± 0.04 ^a	1.65 ± 0.03 ^c	1.74 ± 0.04 ^b
Устьичная проводимость, ммоль/(м ² ·с)	45.42 ± 1.59 ^b	57.29 ± 2.48 ^a	33.20 ± 1.82 ^d	38.63 ± 0.70 ^c

обработкой СК семян, явилось одной из причин увеличения у них устьичной проводимости.

Таким образом, нами впервые обнаружено, что обработка СК семян приводит в дальнейшем в оптимальных условиях роста растений пшеницы к усилению (по сравнению с необработанными растениями) в листьях активности КА и увеличению устьичной проводимости, не сказываясь при этом на скорости фотосинтеза. При избытке в корнеобитаемой среде цинка у растений, выращенных из обработанных СК семян, наблюдается снижение активности КА, но скорость фотосинтеза при этом поддерживается на более высоком уровне, чем у необработанных растений, очевидно, за счет более высокого содержания хлорофиллов и каротиноидов, и устьичной проводимости. Кроме того, из полученных данных и анализа литературы можно, на наш взгляд, сделать также ряд обобщений. Во-первых, результаты проведенного исследования служат дополнительным аргументом в пользу представления о том, что устойчивость к тяжелым металлам, и избытку цинка в частности, складывается из большого числа защитно-приспособительных реакций [3, 4, 7], в которых наряду с другими факторами негормональной природы и гормонами принимает участие СК. Во-вторых, защитный эффект СК на растения носит достаточно пролонгированный характер, поэтому предпосевная обработка СК семян способна вызывать увеличение устойчивости растений пшеницы к избытку цинка, находящихся на более поздних стадиях развития. В-третьих, в селекционно-генетических исследованиях, направленных на выявление генотипов, отличающихся повышенной металлоустойчивостью, можно использовать в качестве одного из дополнительных диагностических признаков способность растений реагировать на избыток тяжелых металлов в окружающей среде усиленным образованием СК и/или характеризующихся повышенным содержанием СК в листьях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность с.н.с., руководителю аналитической лаборатории Института леса КарНЦ РАН, к.б.н., К.М. Никеровой за помощь в освоении методов и и.о. зав. лабораторией селекции и первичного семеноводства озимой пшеницы ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», к.с.-х.н. Р.З. Мамедову за предоставленный для исследований семенной материал.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания FMEN-2022-0004 на научном оборудовании Центра коллективного пользования

Федерального исследовательского центра «Карельского научного центра Российской академии наук».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Салициловая кислота и устойчивость растений к абиотическим стрессорам // Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва. Серія Біологія. 2009. № 2. С. 19–39.
2. Kaur G., Tak Y., Asthir B. Salicylic acid: a key signal molecule ameliorating plant stresses // Cereal Res. Commun. 2022. V. 50. P. 617–626.
3. Sharma A., Singh G.P.S., Araniti F., et al. The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals // Molecules. 2020. V. 25. P. 540.
4. Singh S., Parihar P., Singh R., et al. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. P. 1143.
5. Moussa H., El-Gamal S.M. Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat // Biol. Plant. 2010. V. 54. P. 315–320.
6. Yotsova E.K., Dobrikova A.G., Stefanov M.A., et al. Improvement of the rice photosynthetic apparatus defence under cadmium stress modulated by salicylic acid supply to roots // Theor. Exp. Plant Physiol. 2018. V. 30. P. 57–70.
7. Safari F., Akramian M., Salehi-Arjmand H., et al. Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 183. P. 109542.
8. Quaglia M., Troni E., D'Amato R., et al. Effect of zinc imbalance and salicylic acid co-supply on Arabidopsis response to fungal pathogens with different lifestyles // Plant Biology. 2021. V. 4. P. 30–40.
9. Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Федорчук Т.П., и др. Карбоангидразы фотосинтезирующих клеток высших растений. Обзор // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 798–813.
10. Medina-Puche L., Castelló M.J., Canet J.V., et al. β -carbonic anhydrases play a role in salicylic acid perception in Arabidopsis // PLoS ONE. 2017. V. 12. P. e0181820.
11. Polishchuk O.V. Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases // Planta. 2021. V. 253. P. 58.
12. Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., et al. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response // PNAS. 2002. V. 99. P. 11640–11645.
13. Hayat Q., Hayat S., Alyemeni M.N., et al. Plant physiology salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. // Plant Soil Environ. 2012. V. 58. P. 417–423.

14. Ahmad B., Jaleel H., Sadiq Y., et al. Response of exogenous salicylic acid on cadmium induced photosynthetic damage, antioxidant metabolism and essential oil production in peppermint // Plant Growth Regul. 2018. V. 86. P. 273–286.
15. Bingöl N.A., Akin B., Kocaçalışkan İ., et al. Effect of zinc on phytoremediation potential and carbonic anhydrase and polyphenoloxidase activities of *Lythrum salicaria* L. // Turk. J. Bot. 2021. V. 45. P. 553–562.
16. Bandyopadhyay T., Mehr P., Hairat S., et al. Morphophysiological and transcriptome profiling reveal novel zinc deficiency-responsive genes in rice // Funct. Integr. Genomics. 2017. V. 17. P. 565–581.
17. Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea* // Photosynthetica. 2003. V. 41. P. 281–284.
18. Hayat S., Hasan S.A., Fariduddin Q., et al. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress // J. Plant Interact. 2008. V. 3. P. 297–304.
19. Zlobin I.E., Kartashov A.V., Kuznetsov V.I. Some plant enzymes are highly sensitive to inhibition by zinc ions // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 591–596.
20. Kolbe A.R., Brutnell T.P., Cousins A.B., et al. Carbonic anhydrase mutants in *Zea mays* have altered stomatal responses to environmental signals // Plant Physiol. 2018. V. 177. P. 980–989.

INFLUENCE OF SEED TREATMENT WITH SALICYLIC ACID ON THE CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY, PHOTOSYNTHESIS RATE, STOMATAL CONDUCTANCE AND PIGMENTS CONTENT IN WHEAT LEAVES AT ZINC EXCESS

A. A. Ignatenko^{a,#}, I. A. Nilova^a, E. S. Kholoptseva^a,
Corresponding Member of the RAS A. F. Titov^a, and N. M. Kaznina^a

^aInstitute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

[#]e-mail: angelina911@ya.ru

We studied the effect of seed treatment with salicylic acid (SA) on the carbonic anhydrase (CA) activity, photosynthesis rate, stomatal conductance and pigments content in wheat leaves at optimal zinc content (2 µM) or zinc excess (1500 µM). It was shown for the first time that at an optimal zinc content seed treatment with SA leads to an increase in CA activity and stomatal conductance compared to untreated plants without affecting the photosynthesis rate. At a zinc excess seed treatment with SA increased the decrease in CA activity, but the photosynthesis rate was higher than in untreated plants, apparently due to an increase in the chlorophylls and carotenoids content and stomatal conductivity. It is concluded that SA along with other non-hormonal factors and hormones, is involved in the protective and adaptive reactions of wheat plants to a zinc excess in the environment.

Keywords: *Triticum aestivum* L., salicylic acid, zinc excess, carbonic anhydrase, photosynthetic pigments, stomatal conductance