СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2018, том 53, № 5, с. 1025-1036

УДК 635.52:631.81.095.337:581.1:58.035 doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1025rus

ВОЗРАСТНЫЕ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РАСТЕНИЙ *Lactuca sativa* L. ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕЛЕНА И СВЕТА РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ*

И.Ф. ГОЛОВАЦКАЯ, Е.В. БОЙКО, А.Н. ВИДЕРШПАН, Н.И. ЛАПТЕВ

Селен (эссенциальный элемент в метаболизме человека) служит микроэлементом для растений. Он регулирует их рост и защищает от негативного действия многих факторов. Особенно остро стоит вопрос о применении селена в связи с существованием биогеохимических провинций с его дефицитом. Повышение эффективности выращивания зеленных культур в закрытом грунте во многом связано также с оптимизацией светового режима. При этом недостаточно сведений об эффективности селена под светом неодинакового спектрального состава. В связи с этим цель нашей работы заключалась в исследовании роли неорганических форм селена в регуляции роста и содержания первичных и вторичных метаболитов в растениях *Lactuca sativa* L. сорта Гурман при разном освещении (по доле ФАР и УФ-А в световом потоке). Выполнена оценка возрастных различий листьев салата. Семена перед посевом обрабатывали 4 % раствором селенита или селената натрия (опыт) либо водой (контроль). Спектральный состав света изменяли, используя полиэтиленовые пленки Пл1 и Пл2 (у Пл2 пропускная способность в области УФ-А и ФАР соответственно на 40-50 % и 30-35 % выше, чем у Пл1). Нами установлено, что увеличение доли ФАР и УФ-А под Пл2 способствовало росту содержания хлорофиллов a и b и углеводов в листьях 60-суточных растений, что ускоряло развитие побега за счет увеличения числа междоузлий (на 15 %) и массы стебля по сравнению с растениями под Пл1 ($p < 0,05$). Обработка селеном под Пл1 повышала накопление углеводов и белка, приводила к увеличению площади листьев и уменьшала содержание аскорбиновой кислоты (АсК), тогда как под Пл2 повышалось содержание АсК и флавоноидов (Фл) ($p < 0,05$). Специфика действия ионов селената состояла в возрастании количества каротиноидов, Фл и антоцианов и снижении — углеводов в молодых листьях под Пл2, а также в увеличении числа ярусов побега (эффекты света и селена суммировались). Селенит под Пл1 способствовал накоплению каротиноидов в молодых листьях, а под Пл2 — увеличению количества АсК и суммы Фл в стареющих листьях. Таким образом, нами показаны адаптивные приспособления растений *L. sativa* к качеству света, а также возрастная зависимость морфологических и биохимических показателей их листьев от формы селена и спектра светового потока. Выявлено, что предпосевная обработка семян селеном способствует повышению пищевой ценности культуры.

Ключевые слова: *Lactuca sativa* L., селенит натрия, селенат натрия, фотоморфогенез, каротиноиды, редуцирующие сахара, белки, аскорбиновая кислота, флавоноиды, антоцианы, первичные и вторичные метаболиты.

Селен (Se) — эссенциальный элемент для животных и человека, а также регулятор биохимических процессов у растений. В почвах некоторых стран, например Китая, Египта и Таиланда, его концентрация снижена (1). В России наиболее селенодефицитные почвы распространены в Читинской области, Бурятии и Хабаровском крае (2), где зафиксировано минимальное содержание селена в зерне пшеницы. Дефицит селена в рационе человека приводит к эндемической остеопатии, миксематозному эндемическому кретинизму, развитию кардиологических и онкологических заболеваний, патологий в системе репродукции, в функционировании щитовидной и поджелудочной желез, что связано с нарушением синтеза и функционирования 25 селен-зависимых белков (3, 4). Для биофортификации сельскохозяйственных растений используют внекорневую обработку соединениями Se или их внесение в почву (5). Se регулирует рост растений, изменяет углеводный состав и повышает устойчивость к абиотическим стрессам, индуцированным холодом, засухой, УФ-Б лучами, дефицитом воды, засолением и тяжелыми металлами (1, 6-8). Положительные эффекты Se зависят от его дозы и генотипа растений и сопровождаются активацией антиоксидантной защиты в клетках (5, 8, 9). Существование

* Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП (проект № П283).

нескольких неорганических форм Se, в том числе селенитов (SeO_3^{2-}) и селенатов (SeO_4^{2-}), ставит вопрос об их функциях и доступности для растений, влиянии на продуктивность и устойчивость культур к действию света.

Свет играет важную роль в регулировании жизнедеятельности растений. Он активирует сигнальные пути, которые контролируются селективными сенсорными пигментами и вовлечены в реализацию ростовых и метаболических процессов. Селективный свет изменяет рост растения и количество поглощенного им Se (10). Менее изучена суммарная эффективность влияния смешанного потока солнечной радиации на продуктивность культур в закрытом грунте (11). Известно, что удаление УФ-(А+Б) (λ = 280-400 нм) из потока солнечной радиации усиливает рост наземных и подземных органов растений, повышает содержание фотосинтетических пигментов, активность ферментов фотосинтеза и эффективность фотосинтетической системы PSII (12). В то же время высказывается мнение о том, что роль фотосинтетически активной радиации (ФАР, λ = 400-700 нм) состоит в изменении чувствительности и фотоморфогенетических ответов растений на действие УФ-Б радиации (λ = 280-320 нм). Повышение соотношений ФАР/УФ-Б и УФ-А/УФ-Б важно для снижения поврежденности у наземных и водных растений вследствие действия УФ-Б (13). Однако исследований по взаимодействию УФ-А (λ = 320-400 нм) и ФАР немного.

Нами впервые показаны существенные различия в проявлении ответных реакций на комбинированное действие селена и света между листьями салата разных возрастов, характеризующимися неодинаковой интенсивностью ростовых процессов.

Цель работы заключалась в изучении действия разных форм селена (SeO_3^{2-} и SeO_4^{2-}) на рост растений и содержание первичных и вторичных метаболитов у разновозрастных листьев салата (*Lactuca sativa* L.) при разнокачественном освещении (по доле ФАР и УФ-А в световом потоке).

Методика. В качестве объекта исследований был выбран антоциансодержащий сорт салата (*Lactuca sativa* L.) Гурман. Растения выращивали в почвенной культуре закрытого грунта (Томская обл., 2011 и 2014 годы) в период с мая по июнь при разной доле ФАР и УФ-А в световом потоке. Теплицы покрывали двойной (Пл1) или одинарной (Пл2) полиэтиленовой пленкой. Спектр излучения и его относительную интенсивность измеряли с помощью спектрометра AvaSpec-102/256/1024/2048 версия 6.2 («Avantes BV», Нидерланды).

Перед посевом семена обрабатывали 4 % растворами селенита или селената натрия («Sigma», США) (опыт) либо водой (контроль). В конце вегетативного этапа развития у 60-суточных растений определяли морфологические параметры (сухую массу и размеры структурных элементов побега) и биохимические показатели — содержание редуцирующих сахаров (14), белков (15), фотосинтетических пигментов (16), аскорбиновой кислоты (17), антоцианов и суммы флавоноидов (18). Для измерения содержания веществ использовали спектрофотометр UV-1650 («Shimadzu Corp.», Япония) и кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Содержание редуцирующих сахаров (РС) в растениях оценивали спектрофотометрически (14). Навеску листьев трижды экстрагировали дистиллированной водой при температуре 70-80 °С. Из объединенного экстракта брали аликвоту супернатанта и нагревали в присутствии щелочного раствора феррицианида калия (15 мин при 100 °С). К охлажденной смеси приливали раствор сернокислого железа в смеси с желатином. Оптическую плотность (OD) окрашенного в синий цвет раствора измеряли при λ = 690 нм. Раствором сравнения служила проба, прошедшая все эта-

пы анализа, но не содержащая вытяжки РС. Для выражения относительной плотности раствора в массовых единицах строили калибровочную кривую по глюкозе (исходная концентрация раствора — 1000 мкг/мл).

Количественное определение белка проводили по Бредфорду (15). Метод основан на прямом связывании красителя кумасси G-250 с аминокислотными остатками аргинина, триптофана, тирозина, гистидина и фенилаланина в белке. Экстракты листьев смешивали с реактивом Бредфорда при комнатной температуре, выдерживали не менее 2-3 мин и измеряли OD при λ = 595 нм. Раствором сравнения служила смесь тех же реактивов без экстракта. Содержание белка определяли по калибровочному графику в пределах концентраций от 0,01 до 0,10 мг стандартного образца белка (бычий сывороточный альбумин).

В листьях 20-го яруса анализировали содержания хлорофиллов a и b (Chla и Chlb) и суммы каротиноидов (Кар). Пигменты трижды экстрагировали 96 % этиловым спиртом. Экстракт центрифугировали при 10000 g 10 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре при длинах волн 470; 648,6; 664,2 и 720 нм (значения последнего измерения вычитали из предыдущих для учета возможного рассеивания). Для расчета концентраций пигментов (C_a, C_b, $C_{карот.}$) в 96 % этиловом спирте (мг/л) использовали формулы H.K. Lichtenthaler (16):

$$C_a = 13{,}36 \cdot OD_{664,2} - 5{,}19 \cdot OD_{648,6};\ C_b = 27{,}43 \cdot OD_{648,6} - 8{,}12 \cdot OD_{664,2};$$

$$C_{кар.} = (1000 \cdot OD_{470} - 2{,}13 \cdot C_a - 97{,}64 \cdot C_b)/209.$$

На основании данных спектрофотометрического анализа определяли содержание пигментов в расчете на единицу площади листа (мг/дм^2), учитывая объем экстракта и площадь высечек, взятых для исследования.

Содержание аскорбиновой кислоты (АсК) определяли спектрофотометрически (17). Свежие листья экстрагировали 50 мМ раствором щавелевой кислоты (ЩК). Экстракт в равных объемах смешивали с фосфовольфрамовым реагентом (ФВР, pH = 1,0), выдерживали 30 мин при температуре 20-25 °С, центрифугировали (7000 g, 10 мин). Измеряли оптическую плотность супернатанта (OD_x) при λ = 700 нм относительно раствора сравнения ФВР:ЩК = 1:1 (v/v). Содержание АсК (C_x, мкМ) рассчитывали по формуле: $C_x = (OD_x/OD_s)\ C_s$, где C_s — концентрация стандартного раствора (56,8 мкМ L-аскорбиновая кислота), OD_s — оптическая плотность стандартного раствора.

Количество антоцианов (Ант) в растительном сырье оценивали согласно описанию (18). Навеску трижды экстрагировали 1 % HCl при температуре 40-45 °С, объединенный экстракт центрифугировали при 10000 g 10 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре при λ = 510 нм (раствор сравнения — 1 % HCl). Сумму антоцианов (%) в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в абсолютно сухом сырье ($X_{ант.}$) вычисляли по формуле: $X_{ант.} = OD \cdot 250 \cdot 100 \cdot 453^{-1} \cdot m^{-1} \cdot (100 - W)^{-1}$, где OD — оптическая плотность испытуемого раствора; 453 — удельное поглощение цианидин-3,5-дигликозида в 1 % HCl; m — масса сырья г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Флавоноиды (Фл) определяли спектрофотометрически (18). Пробу растительного сырья экстрагировали 70 % этиловым спиртом на кипящей водяной бане трижды по 60 мин, экстракты объединяли. Аликвоту экстракта выдерживали в присутствии хлористого алюминия и уксусной кислоты и через 40 мин определяли оптическую плотность при λ = 415 нм. Раствор сравнения не содержал хлористого алюминия и готовился для каждой пробы отдельно. По той же схеме измеряли оптическую плотность стандартного раствора рутина. Вычисляли суммарное содержание

(%) флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье ($X_{флав.}$): $X_{флав.} = OD_x \cdot K_x \cdot m_x^{-1} \cdot m_p \cdot OD_p^{-1} \cdot K_p^{-1} \cdot 100 \cdot (100 - W)^{-1} \cdot 100$, где OD_x — оптическая плотность исследуемого раствора; OD_p — оптическая плотность раствора рутина; m_x — масса сырья, г; m_p — масса рутина, г; K_x — коэффициент разбавления исследуемого раствора (1250); K_p — коэффициент разбавления раствора рутина (2500); W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Оценку физиологического состояния листьев разных ярусов проводили по изменению ростовых процессов. Для этого за 5 сут до измерения основных показателей ежедневно измеряли длину и ширину листьев на выборочных растениях с тем же числом ярусов, что у экспериментальных растений с построением кривых роста. Площадь листьев измеряли на фотографиях с помощью программы Moticam 3.0, прилагаемой к видеокамере («Motic», Нидерланды).

При статистической обработке результатов использовали параметрические критерии Стьюдента или Фишера, расчеты осуществляли с помощь стандартных пакетов компьютерной программы Microsoft Excel 2007. На рисунках представлены средние арифметические (*M*) для ростовых ($n = 50$) и биохимических ($n = 5$) параметров с двухсторонними доверительными интервалами ($M \pm 1{,}96$ SEM). В одном и том же органе или ярусе листьев ростовые параметры анализировали независимо, содержание пигментов — в смешанной группе. Различия между значениями, отмеченными разными буквами, статистически значимы при $p < 0{,}05$. Изменения изучаемых морфофизиологических показателей растений имели схожую динамику, поэтому в статье приведены данные за один 2014 год.

Результаты. Для растений характерен длительный рост в течение всей жизни. Прирост побега обеспечивается формированием новых метамеров, между которыми сохраняются донорно-акцепторные отношения. На побеге можно выделить активно растущие (молодые) листья, завершившие рост и активно функционирующие (взрослые) и стареющие листья с элементами хлороза. Регуляция размера и формы побега — один из механизмов адаптации растения к окружающим условиям. Ответ целого растения на внешний фактор представляется более сложным, чем ответ отдельного органа. Поэтому нами проведены исследования на примере многоярусного побега, а не одиночного метамера (яруса) растения.

Изменения ФАР и УФ-А в световом потоке в период опыта иллюстрирует рисунок 1, А. По оптическим свойствам Пл2 характеризовалась большей светопропускной способностью, чем Пл1: в диапазоне λ = 360-390 нм (УФ-А) различия составили 40-50 %, λ = 400-500 нм (синий свет) — 29-35 %, λ = 500-600 (зеленый свет) и λ = 600-700 нм (красный свет) — по 30 %. На начальных этапах онтогенеза (к 27-м сут) у растений происходила трансформация донорно-акцепторных отношений между последовательно закладываемыми структурными элементами побега — листьями разных ярусов, которая выражалась в изменении их сухой массы (см. рис. 1, Б). Под Пл1 у контрольных растений, культивируемых без селена, отмечали более раннее завершение роста листа 1-го яруса, что опосредовало более длительный рост последующих листьев 2-го и 3-го ярусов (в 4,2 и 3,8 раза, $p < 0{,}05$), в то время как под Пл2 торможение роста этих ярусов приводило к накоплению сухой массы в 4-м и 5-м ярусах (в 4,6 и 3,8 раза относительно 1-го яруса). Подобного рода перераспределение ростовых процессов в растении под Пл2 обусловило большее увеличение размеров побега, которое сопровождалось закладкой новых метамеров при сохранении суммарной площади поверхности ли-

стьев у контрольных растений по сравнению с таковыми под Пл1 (рис. 1, В). В итоге у 60-суточных растений под Пл1 формировался 21 ярус, тогда как под Пл2 — 24 яруса.

Предпосевная обработка семян SeO_3^{2-} тормозила накопление сухой массы листьями 1-2-го ярусов (по 20 % относительно контроля), что способствовало росту листьев следующих ярусов, в то время как SeO_4^{2-} обусловливал более длительный рост 1-го листа (в 3,4 раза) и тормозил рост последующих (см. рис. 1, Б, Пл1). Увеличение доли ФАР и УФ-А в световом потоке изменило реакцию побега на Se: SeO_3^{2-} тормозил рост листьев 1-го и 4-5-го ярусов (соответственно на 36, 40 и 17 %, $p < 0,05$), тогда как SeO_4^{2-} ускорял рост листьев 1-2-го ярусов соответственно на 39 и 88 % по сравнению с контролем под Пл2 ($p < 0,05$).

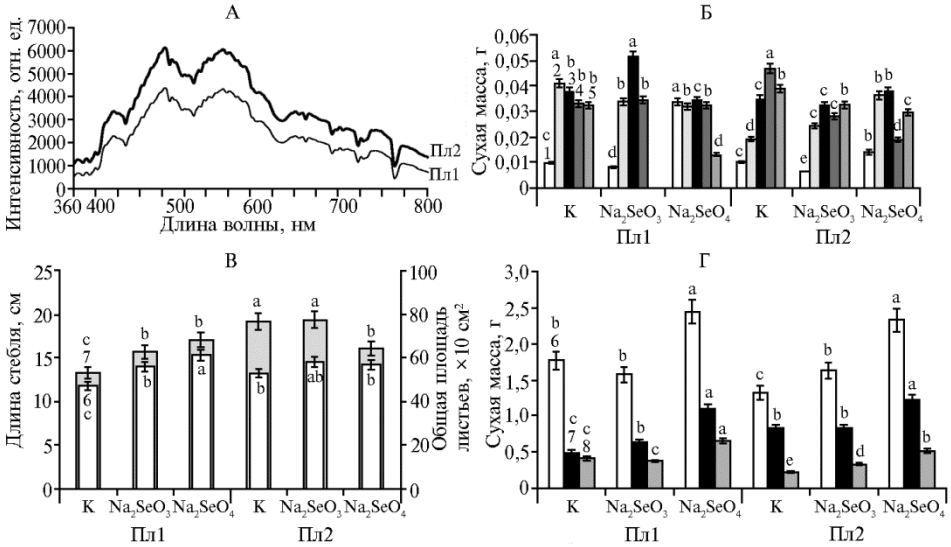

Рис. 1. Спектральный состав света в теплицах под пленками Пл1 и Пл2 (А) **и ростовые параметры листьев 1-5-го ярусов** (Б) **и органов** (В, Г) **у 27-суточных** (Б) **и 60-суточных** (В, Г) **растений салата (*Lactuca sativa* L.) сорта Гурман в зависимости от интенсивности света и формы селена, использованной при предпосевной обработке семян:** 1-5 — листья соответственно 1-5-го ярусов, 6 — листья всех ярусов, 7 — стебель, 8 — корень (Томская обл., среднее за 2014 год). Вертикальные бары указывают на ±1,96 SEM ($n = 50$). Для одного и того же яруса листьев (Б) или органа (В, Г) ростовые параметры анализировали независимо. Для каждого параметра различия значений, помеченных неодинаковыми буквами, статистически значимы при $p < 0,05$.

С завершением вегетативной стадии развития SeO_4^{2-} увеличивал сухую массу листьев, стебля и корней у опытных 60-суточных растений салата относительно контрольных (см. рис. 1, Г). Ионы SeO_4^{2-} имели преимущество в регуляции развития побега перед SeO_3^{2-}. У растений под влиянием SeO_4^{2-} листья формировали больше ярусов, чем в случае SeO_3^{2-}, — соответственно 24 и 21 для Пл1, 28 и 24 для Пл2. Обработка SeO_4^{2-} оказывала стимулирующий эффект (+15 %), подобный свету под Пл1, и аддитивный эффект (+33 %) при увеличении доли ФАР и УФ-А под Пл2. Другими авторами показана наибольшая эффективность SeO_4^{2-} (2-4 мкМ) по сравнению с SeO_3^{2-} (6-10 мкМ) в регуляции площади листа у *Cucumis sativus* L. (19). Показана и возрастная зависимость ростовых процессов от концентрации SeO_4^{2-}: добавление низких концентраций не влияло на сырую или сухую массу более молодых растений *L. sativa*, но значительно стимулировало рост у стареющих (20).

Различия в ростовых процессах у растений в ответ на действие све-

та разного качества могли быть связаны с изменением обмена веществ. Сахара как продукты первичного обмена необходимы для роста и дифференцировки. Содержание сахаров изменялось в листьях растений в зависимости от их функционального состояния (возраста) и интенсивности фотосинтеза. У контрольных растений *L. sativa* под Пл1 мы выявили более высокое содержание редуцирующих сахаров (РС) в завершивших рост листьях, где происходил активный синтез этих соединений. Низкое накопление РС отмечали в активно растущих (17-21-й ярусы) и стареющих (4-7-й ярусы) листьях (рис. 2, А), поскольку первые выступали только акцепторами сахаров, а вторые завершали жизнедеятельность. Повышение доли ФАР и УФ-А в световом потоке (Пл2) приводило к увеличению продукции РС на 30 %, 45 % и в 2,3 раза соответственно в стареющих, взрослых (8-16-й ярусы) и молодых листьях у контрольных растений по сравнению с таковыми под Пл1, что могло свидетельствовать об их другом физиологическом состоянии, связанном с активацией фотосинтеза или усилением транспорта сахаров. Возможно также изменение гормонального баланса, поскольку показана светозависимая интеграция путей сигналинга для сахара и гормонов через белки PIF (phytochrome interacting factor) и DELLA (транскрипционные репрессоры сигналинга гиббереллинов) (21).

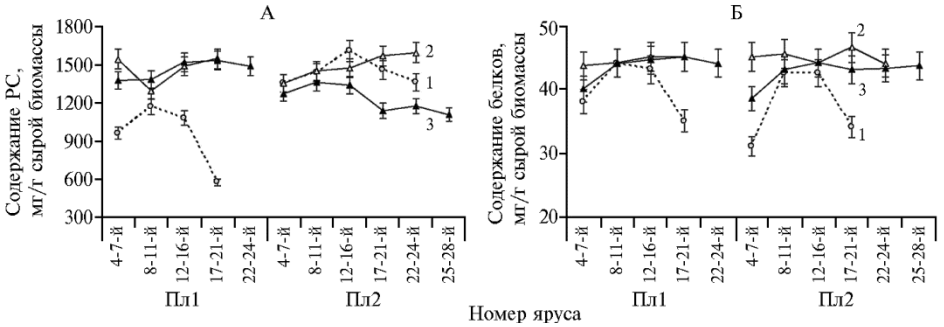

Рис. 2. Содержание редуцирующих сахаров (РС, А) **и водорастворимых белков** (Б) **в листьях разных ярусов у 60-суточных растений салата (*Lactuca sativa* L.) сорта Гурман в зависимости от интенсивности света в теплицах под пленками Пл1 и Пл2 и формы селена, использованной при предпосевной обработке семян:** 1 — контроль, 2 — селенит натрия, 3 — селенат натрия (Томская обл., среднее за 2014 год). Вертикальные бары указывают на ±1,96 SEM (n = 5).

По данным нашего исследования, под Пл1 при действии ионов SeO_3^{2-} и SeO_4^{2-} количество РС повышалось в молодых листьях салата и сохранялось высоким в стареющих листьях. Повышение РС в старых листьях салата (4-7-й ярусы) могло свидетельствовать о снятии эффектов их старения и активации фотосинтетических реакций. Подобное действие Se могло быть связано с восстановлением или поддержанием структуры клеточных мембран и целостности клеток за счет снижения количества O_2^- и H_2O_2 после добавления этого элемента (1). Подтверждением роли SeO_4^{2-} в увеличении скорости фотосинтеза служат результаты исследования M. Djanaguiraman с соавт. (22) на растениях сорго. Увеличение содержания растворимых сахаров и крахмала описано также в листьях картофеля при обработке Se (4). Под Пл2 эффективность SeO_3^{2-} возрастала только в молодых листьях салата, а у SeO_4^{2-} она снижалась во взрослых и молодых листьях. Наблюдаемые реакции растений салата свидетельствовали о влиянии света на накопление Se и действие элемента на продолжительность синтетических процессов в листьях разных ярусов. Известно, что в растениях скорость перемещения и содержание SeO_3^{2-} ниже по сравнению с SeO_4^{2-}, а воздействие красным и синим светом дополнительно к белому

увеличивает количество эндогенного Se (20, 10).

Нами показано, что в растениях *L. sativa* под Пл1 содержание водорастворимых белков (см. рис. 2, Б) было наибольшим в завершивших рост листьях (8-16-й ярусы). С повышением доли ФАР и УФ-А в световом потоке (Пл2) количество белков снижалось в стареющих листьях у контрольных растений, что, однако, сопровождалось усилением углеводного обмена (см. рис. 2, А). Se увеличивал содержание белков в молодых (17-28-й ярусы) и стареющих (4-7-й ярусы) листьях независимо от спектрального состава светового потока. SeO_3^{2-} поддерживал содержание белков в стареющих листьях лучше, чем SeO_4^{2-}, поскольку известно, что селенит эффективнее селената в качестве индуктора активности антиоксидантного фермента селенозависимой глутатионпероксидазы (GSH-Px) (23).

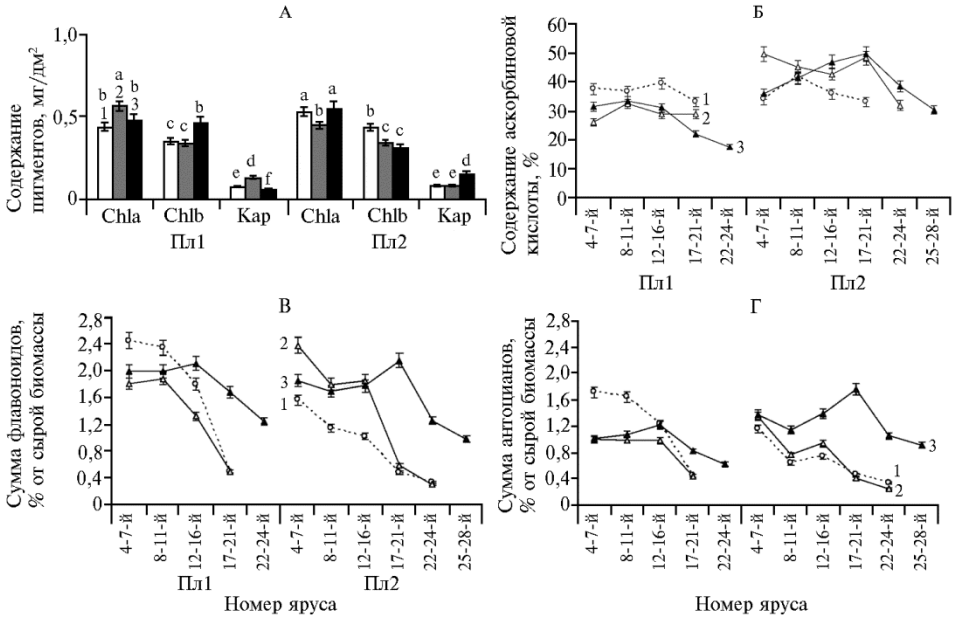

Рис. 3. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях 20-го яруса (А)**, распределение аскорбиновой кислоты** (Б)**, флавоноидов** (В) **и антоцианов** (Г) **в листьях разных ярусов у 60-суточных растений салата (*Lactuca sativa* L.) сорта Гурман в зависимости от интенсивности света в теплицах под пленками Пл1 и Пл2 и формы селена, использованной при предпосевной обработке семян:** 1 — контроль, 2 — селенит натрия, 3 — селенат натрия; Chla и Chlb — хлорофиллы a и b, Кар — каротиноиды (Томская обл., среднее за 2014 год). Вертикальные бары указывают на ±1,96 SEM (n = 5). Содержание пигментов анализировали в смешанной группе. Для пигментов различия значений, помеченных неодинаковыми буквами, статистически значимы при $p < 0,05$.

Накопление фотосинтетических пигментов в листе 20-го яруса (рис. 3, А) изменялось в зависимости от интенсивности и спектрального состава света. С ростом доли ФАР и УФ-А в световом потоке (Пл2) у контрольных растений повышалось количество Chla и Chlb по сравнению с контролем под Пл1. Суммарное содержание всех фотосинтетических пигментов у разных вариантов под Пл1 и Пл2 был выше контроля для Пл1. Однако суммарное количество хлорофиллов при действии SeO_3^{2-} в случае Пл2 оставалось в пределах контроля Пл1 и было ниже контроля Пл2. Индивидуальный пигментный состав листа зависел также от формы селена. Под Пл1 SeO_3^{2-} на 60 % ($p < 0,05$) увеличивал содержание каротиноидов, выполняющих функцию антиоксидантов и защищающих Chla от фотоокисления (24). Это способствовало накоплению Chla под Пл1, в то время как SeO_4^{2-} снижал содержание каротиноидов, повышая количество окислен-

ной формы Chlb. Проявление антиоксидантного действия SeO_4^{2-}, аналогичного SeO_3^{2-} под Пл1, происходило при повышении доли ФАР и УФ-А радиации в световом потоке (Пл2). Возможно, последние условия увеличивали поглощение селена или его восстановление.

Аскорбиновая кислота — важный антиоксидант в тканях растений (25). Наибольшее ее содержание мы отмечали в завершающих рост листьях 12-16-го ярусов (Пл1) и в завершивших рост листьях 8-11-го ярусов (Пл2). Обе формы селена тормозили синтез АсК под Пл1, тогда как с ростом доли ФАР и УФ-А в световом потоке (Пл2) SeO_3^{2-} увеличивал содержание АсК в стареющих и взрослых листьях, а SeO_4^{2-} — во взрослых и молодых листьях (см. рис. 3, Б). Полученные нами результаты согласуются с данными об увеличении АсК в листьях и хлоропластах во время акклиматизации к высокой интенсивности света (26). Дефицит АсК у мутантов *vtc Arabidopsis* снижает зеаксантин-зависимое нефотохимическое тушение, поддерживаемое виолаксантиндеэпоксидазой, и определяет повышенную чувствительность к фотоокислению. Обработка экзогенной АсК снижает фитотоксический эффект высоких концентраций Se, проявляемый в отношении мембран, хлорофилла и функции PSII у растений *Oryza sativa* L., через повышение активности антиоксидантного и металлотолерантного механизмов (27). По первому механизму эффект проявляется благодаря действию ферментов супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT), аскорбатпероксидазы (APX) и глутатионредуктазы (GR), а также неферментативных антиоксидантов — АсК, глутатиона и пролина. Второй механизм реализуется металлотионеинами, тиолами и глутатион-S-трансферазой (GST). Увеличение содержания этих молекул уменьшает токсическое действие Se посредством его конъюгирования и/или удаления активных форм кислорода, образующихся из-за селенового стресса. Se в низких концентрациях (1 мг/кг) увеличивает активность SOD, CAT, APX и GR (27).

Среди вторичных метаболитов существенное значение имеют флавоноиды. В листьях растений *L. sativa* нами установлена возрастная зависимость аккумуляции Фл (см. рис. 3, В). Во взрослых и стареющих листьях аккумулция Фл была выше соответственно в 4 и 6 раз, чем в молодых листьях (17-21-й ярусы). Это свидетельствовало об усилении синтеза вторичных метаболитов с завершением активного роста листа. Полученные нами данные согласуются с сообщениями о фотоингибировании биосинтеза Фл на ранней стадии развития волокна *Gossypium hirsutum* в культуре in vitro, но стимулировании — на более поздних стадиях (28).

Предпосевная обработка семян SeO_4^{2-} увеличивала в 4 раза суммарное количество Фл в листьях по сравнению с листьями контрольными и обработанными SeO_3^{2-} растениями в вариантах с Пл1. С увеличением доли ФАР и УФ-А (Пл2) отмечалось стимулирующее действие обеих форм Se на накопление Фл растением. Другими авторами также описана функция Se как фотопротектора, защищающего от негативного действия УФ-Б радиации (27), что у *Triticum aestivum* L. проявлялось прежде всего в увеличении количества антиоксидантов и уменьшении мембранного перекисного окисления липидов (ПОЛ) в наземных частях растений. На ПОЛ в корнях Se оказывал двойственное влияние: при низких концентрациях он ингибировал, а при высоких — усиливал пероксидацию (19, 29).

Антоцианы как представители Фл накапливались в завершивших рост листьях 4-11-го ярусов у контрольных растений под Пл1 (см. рис. 3, Г). Увеличение доли видимой области спектра одновременно с УФ-А (Пл2) снижало количество Ант в контроле. Под Пл1 обработка SeO_4^{2-} увеличивала его содержание в молодых листьях 17-24-го ярусов и уменьшала — во

взрослых листьях по сравнению с контролем. В то же время под Пл2 применение SeO_4^{2-} повышало содержание Ант в листьях большинства ярусов (см. рис. 3, Г). При этом одновременно отмечалось снижение аккумуляции РС (см. рис. 2, А). Последний факт можно объяснить субстратной ролью сахаров в синтезе Ант. Однако неполная согласованность изменений содержания РС (см. рис. 2, А), Фл (см. рис. 3, А) и Ант (см. рис. 3, Б) в других условиях, вероятно, была обусловлена сигнальной функцией сахаров, регулирующих экспрессию генов, которые контролируют биосинтез Фл и Ант. Другими авторами показано, что сахара активируют ген *PAP1* (*Production of Anthocyanin Pigmentation 1*) через сахарозоспецифический сигнальный путь (30). При этом не РС, а именно сахароза увеличивала синтез мРНК PAP1 и экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза Ант, — *DFR*, *LDOX* и *UF3GT* (*Dihydroflavonol-4-Reductase, Leucoanthocyanidin Dioxygenase, UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase*), определяя накопление Ант.

На основании полученных результатов нами было высказано предположение, что различия в метаболизме растений *L. sativa* в зависимости от варианта освещения обусловлены специфическим функционированием регуляторных фоторецепторов. Рост доли ФАР на фоне увеличения УФ-А в световом потоке (Пл2) повышал содержание фотосинтетических пигментов и углеводов в листьях контрольных растений, что ускоряло развитие побега. Это согласуется с данными об устранении негативных эффектов, которые УФ-А оказывает на фотосинтез, активность PSII и содержание фотосинтетических пигментов, при предварительном освещении красным светом, что связано с фитохромным контролем этих реакций (31). Специфическая светозависимая реакция растений на Se может быть связана с неодинаковой аккумуляцией разных форм его ионов, поскольку досветка красным и синим светом дополнительно к белому повышает количество эндогенного Se в растениях (10). Известно, что ростостимулирующий эффект SeO_3^{2-} осуществляется при более узком диапазоне концентраций, чем в случае SeO_4^{2-}(соответственно 6 и 6-20 мкМ) (19). Другим объяснением разного направления и скорости ростовых процессов может служить то, что Se в качестве про- или антиоксиданта изменял накопление Фл разной природы. Флавоноиды с о-гидроксилами в ядре выступали синергистами ауксина, стимулируя рост растений вследствие ингибирования ИУК-оксидазы, тогда как Фл с п-гидроксилами играли роль кофакторов ИУК-оксидазы, проявляя свойства антагонистов ИУК и, следовательно, выступали ингибиторами роста (32). Se мог влиять на содержание других фитогормонов (33), а фитогормоны, в свою очередь, могли изменять селенозависимый рост растений (34).

Дифференцированные реакции листьев салата из разных ярусов зависели от возраста (прежде всего, от окислительного статуса, который определяется содержанием метаболических или стрессовых АФК). Другими авторами (20) показана способность SeO_4^{2-} противодействовать обусловленному старением окислительному стрессу у *L. sativa*. У молодых и стареющих растений антиоксидантный эффект Se связан с повышенной активностью глутатионпероксидазы (GSH-Px). В стареющих растениях увеличение количества Se усиливает антиоксидантную способность, предотвращая снижение концентрации α-токоферола и усиливая активность SOD.

Таким образом, было установлено, что предпосевная обработка семян *Lactuca sativa* Se в двух ионных формах регулировала интенсивность ростовых и метаболических процессов у растений, изменяя содержание первичных и вторичных метаболитов. Предпосевная обработка семян Se оказывала стимулирующее действие на образование новых метамеров по-

бега растений *L. sativa* и прорастание семян (SeO_4^{2-}). В то же время регуляция спектра светового потока изменила эффективность действия Se. Увеличение доли ФАР и УФ-А стимулировало ростовые процессы (растяжение и утолщение побега, образование новых метамеров) за счет активации углеводного метаболизма. Нами показана возрастная зависимость морфофизиологических параметров листьев у растений *L. sativa* от формы селена и спектра светового потока. Под Пл1 при более низкой интенсивности УФ-А и ФАР в световом потоке после обработки Se содержание редуцирующих сахаров и белков возрастало у активно растущих листьев и сохранялось — у старых. SeO_4^{2-} повышал сумму флавоноидов независимо от спектра света, тогда как SeO_3^{2-} — при увеличении доли ФАР и УФ-А в световом потоке. Рост доли ФАР и УФ-А, вероятно, приводил к ускорению метаболизма Se. Возможно, проявлялся и протективный эффект высокого ФАР при повышении УФ-А, что выражалось в усилении углеводного обмена и увеличении содержания аскорбиновой кислоты. Полученные нами данные расширяют представления об адаптивных реакциях целых растений при воздействии светового потока разного качества, что приближает нас к пониманию Se-зависимых механизмов, определяющих устойчивость к повышению доли УФ-А и ФАР в световом потоке. Наши данные также можно использовать при диагностике физиологического состояния листьев разных ярусов без селена и в его присутствии. Предпосевная обработка семян Se в сочетании с изменением спектра светового потока повышает пищевую ценность салата за счет накопления первичных и вторичных метаболитов.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский государственный университет, Биологический институт,
634050 Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36,
e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru ✉, caterinasoloveva@gmail.com, van1303@mail.ru, experteco@mail.ru

Поступила в редакцию 10 апреля 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2018, V. 53, № 5, pp. 1025-1036

AGE-DEPENDENT MORPHOPHYSIOLOGICAL CHANGES AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF *Lactuca sativa* L. PLANTS INFLUENCED BY Se AND SOLAR RADIATION OF VARYING INTENSITY

I.F. Golovatskaya, E.V. Boyko, A.N. Vidershpan, N.I. Laptev

National Research Tomsk State University, Biological Institute, 36, pr. Lenina, Tomsk, 634050 Russia, e-mail golovatskaya.irina@mail.ru (✉ corresponding author), caterinasoloveva@gmail.com, van1303@mail.ru, experteco@mail.ru
ORCID:
Golovatskaya I.F. orcid.org/0000-0002-1919-1893
Boyko E.V. orcid.org/0000-0003-3815-872X
Vidershpan A.N. orcid.org/0000-0002-3204-6519
Laptev N.I. orcid.org/0000-0002-4115-3025
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by Federal Special Program (project № П283)
Received April 10, 2017
doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng

Abstract

Selenium, a micronutrient significantly involved in plant metabolism control, is also essential for human. Se regulates plant growth and protects plants from many adverse factors. The relevance of the issue is particularly high in biogeochemical provinces with selenium deficiency. Improvement of cultivation of greenhouse crops is also largely associated with optimization of the light regime. In this paper, we first reported on how selenite and selenate ions, in combination with intensity of UV-A + PAR, impact on growth and age-associated accumulation of primary and secondary metabolites in *Lactuca sativa* L. plants. These results will contribute to a better understanding of signaling elements involved in metabolic regulation. Prior to sowing, the seeds

were treated with 4 % sodium selenite or sodium selenate in test and with water in control. Light intensity and spectral characteristics were changed by covering a greenhouse with polyethylene films F1 and F2 (for F2, the UV-A transmission was 40-50 % higher and PAR was 30-35 % higher as compared to F1). More insolation under F2 led to elevated content of leaf chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb), and sugars in 60-day-old plants, thus promoting shoot development due to formation of more internodes (by 15 %) and higher stem weight compared to F1 ($p < 0.05$). Se + F1 intensified accumulation of carbohydrates and proteins, increased leaf area and caused the decline in ascorbic acid content, while F2 stimulated accumulation of ascorbic acid and flavonoids. Higher accumulation of leaf pigments (carotenoids, flavonoids and anthocyanins), lower carbohydrates in juvenile leaves under F2, and a greater number of leaf layers on a stem, due to synergic effect of light and Se, were peculiar of selenate action. Selenite + F1 led to higher content of carotenoids in juvenile leaves, whereas under selenite + F2 the level of ascorbic acid and flavonoids was higher in aging leaves. The highest content of reducing sugars (RS) and soluble proteins was in the mature leaves (layers 8 to 16) of control plants (F1). When solar radiation going up, a rise of RS level by 30 %, 45 % and 2.3 times occurred in aging leaves (layers 4-7), in adult leaves, and in young leaves (layers 17-21), respectively, while the protein content decreased in aging leaves ($p < 0.05$). Both SeO_3^{2-} and SeO_4^{2-} resulted in a higher level of RS and proteins in young leaves and kept this high in aging ones. The young and aging leaves of the control F1 plants differed in the content of flavonoids (Fla) 6-fold. Both selenium ions reduced the Fla level in mature and aging leaves by 20-30 % ($p < 0.05$), and SeO_4^{2-} led to a 4-fold increase in Fla of young leaves (F1). Increasing solar radiation (F2) resulted in the decline of Fla content. SeO_3^{2-} provided a higher Fla level in aging and mature leaves, whereas SeO_4^{2-} enhanced Fla accumulation in young leaves. At a higher light intensity, SeO_4^{2-} + F2 increased the carotenoids content by 76 %, while SeO_3^{2-} + F1 ensured only a 60 % increase ($p < 0.05$). In increasing insolation, both selenium ions elevated the shoot dry weight and the content of low molecular antioxidants (ascorbic acid and Fla) in plants. Thus, our findings showed the dependence of plant growth and metabolism on specific forms of selenium under varying intensity of solar radiation. These biomarkers should be accounted while growing plants using selenium in different lighting conditions.

Keywords: *Lactuca sativa* L., sodium selenite, sodium selenate, solar radiation, carotenoids, reducing sugars, proteins, ascorbic acid, flavonoids, anthocyanins, primary and secondary metabolites.

REFERENCES

1. Feng R., Wei C., Tu S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.*, 2013, 87: 58-68 (doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.09.002).
2. Golubkina N.A. Selenium accumulation by cereals in Russia. *Russian Agricultural Sciences*, 2007, 33(5): 288-291 (doi: 10.3103/S1068367407050035).
3. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ. Health Prev. Med.*, 2008, 13(2): 102-108 (doi: 10.1007/s12199-007-0019-4).
4. Galochkin V.A., Galochkina V.P. Organic and mineral forms of selenium, their metabolism, biological availability and role. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2011, 4: 3-15.
5. Schiavon M., Acqua S., Mietto A., Pilon-Smits E.A.H., Sambo P., Masi A., Malagoli M. Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(44): 10542-10554 (doi: 10.1021/jf4031822).
6. Turakainen M., Hartikainen H., Seppänen M.M. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(17): 5378-5382 (doi: 10.1021/jf040077x).
7. Hashem H.A., Hassanein R.A., Bekheta M.A., El-Kady F.A. Protective role of selenium in canola (*Brassica napus* L.) plant subjected to salt stress. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)*, 2013, 9(2): 199-211.
8. Sieprawska A., Kornas A., Filek M. Involvement of selenium in protective mechanisms of plants under environmental stress conditions. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 2015, 57(1): 9-20 (doi: 10.1515/abcsb-2015-0014).
9. Baraboi V.A., Shestakova E.N. *Ukr. biokhim. zhurn.*, 2004, 76(1): 23-32 (in Russ.).
10. Golovatskaya I.F., Kulagina Yu.M., Krakhaleva A.V., Karnachuk R.A. *Agrokhimiya*, 2013, 5: 558-565 (in Russ.).
11. Chikov V.I., Salyakhova G.A., Safiullina G.F., Zamalieva F.F. Photosynthesis, assimilates transport and productivity in potato plants of the Nevskii variety grown under different insolation. *Agricultural Biology*, 2012, 1: 72-77 (doi: 10.15389/agrobiology.2012.1.72eng).
12. Kataria S., Baroniya S. S., Baghel L., Kanungo M. Effect of exclusion of solar UV radiation on plants. *Plant Science Today*, 2014, 1(4): 224-232 (doi: 10.14719/pst.2014.1.4.61).

13. Krizek D.T. Invited review influence of PAR and UV-A in determining plant sensitivity and photomorphogenic responses to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol.*, 2004, 79(4): 307-315 (doi: 10.1111/j.1751-1097.2004.tb00013.x).
14. Veshnyakov V.A., Khabarov Yu.G., Kamakina N.D. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2008, 4: 47-50 (in Russ.).
15. 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, 72(1-2): 248-254 (doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3).
16. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method. Enzymol.*, 1987, 148: 350-382 (doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1).
17. Rutkowski M., Grzegorczyk K. Modifications of spectrophotometric methods for antioxidative vitamins determination convenient in analytic practice. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria*, 2007, 6(3): 17-28
18. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR: Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. MZ SSSR. 11-e izd.* [USSR State Pharmacopoeia: Iss. 2. General methods of analysis. Medicinal plant materials. USSR Ministry of Health. 11th ed.]. Moscow, 1989 (in Russ.).
19. Hawrylak-Nowak B., Matraszek R., Pogorzelec M. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015: 37-41 (doi: 10.1007/s11738-015-1788-9).
20. Xue T., Hartikainen H., Piironen V. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil*, 2001, 237(1): 55-61 (doi: 10.1023/A:1013369804867).
21. Ljung K., Nemhauser J.L., Perata P. New mechanistic links between sugar and hormone signalling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2015, 25: 130-137 (doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.022).
22. Djanaguiraman M., Devi D.D., Shanker A.K., Sheeba J.A., Bangarusamy U. Selenium — an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil*, 2005, 272(1-2): 77-86 (doi: 10.1007/s11104-004-4039-1).
23. Cartes P., Gianfreda L., Mora M.L. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil*, 2005, 276(1-2): 359-367 (doi: 10.1007/s11104-005-5691-9).
24. Stange C., Flores C. Carotenoids and photosynthesis — regulation of carotenoid biosyntesis by photoreceptors. Chapter 4. In: *Advances in photosynthesis — fundamental aspects.* M. Najafpour (ed.). IntechOpen, London, 2012: 77-96 (doi: 10.5772/29161).
25. Wang J., Zhang Z., Huang R. Regulation of ascorbic acid synthesis in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(6): e24536 (doi: 10.4161/psb.24536).
26. Smirnoff N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2000, 355(1402): 1455-1464 (doi: 10.1098/rstb.2000.0706).
27. Sharma S., Kaur N., Kaur S., Nayyar H. Ascorbic acid reduces the phytotoxic effects of selenium on rice (*Oryza sativa* L.) by up-regulation of antioxidative and metal-tolerance mechanisms. *J. Plant Physiol. Pathol.*, 2014, 2: 3 (doi: 10.4172/2329-955X.1000128).
28. *Qian S., Hong L., Cai Y., Gao J., Lin Y.* Effects of light on *in vitro* fiber development and flavonoid biosynthesis in green cotton (*Gossypium hirsutum*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2016, 85(2): 3499 (doi: 10.5586/asbp.3499).
29. Yao X.Q., Chu J.Z., Ba C.J. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010, 136(1): 96-105 (doi: 10.1007/s12011-009-8520-9).
30. Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis. Plant Physiol.*, 2006, 140: 637-646 (doi: 10.1104/pp.105.072579).
31. Kreslavski V.D., Lyubimov V.Yu., Shirshikova G.N., Shmarev A.N., Kosobryukhov A.A., Schmitt F.-J., Friedrich T., Allakhverdiev S.I. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, 122: 1-6 (doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.02.016).
32. Makarenko O.A., Levitskii A.P. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*, 2013, 45(2): 100-112 (in Russ.).
33. Puzina T.I., Prudnikov P.S., Yakushkina N.I. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*, 2005, 6: 7-9 (in Russ.).
34. Golovatskaya I.F., Pavlova D.G., Kulagina Ju.M., Karnachuk R.A., Khripach V.A. The physiological action of brassinosteroids depends on concentration of selenium in the medium. *Proc. 20th International Conference on Plant Growth Substances IPGSA (28 June — 2 July 2010, Tarragona, Spain).* Tarragona, 2010: 88-89.