

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ОБРАБОТАННЫХ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ: МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ К ЗАСУХЕ

Т. Г. КУРЬЯНЧИК¹⁾, Н. В. КОЗЕЛ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Установлено существенное влияние почвенной засухи на морфометрические показатели листьев растений ячменя сортов Бровар и Аванс, концентрацию в них фотосинтетических пигментов, а также накопление активных форм кислорода. Показано, что при засухе обработка листьев растений ячменя сорта Бровар 5-аминолевулиновой кислотой вызывает снижение содержания белков антенных комплексов фотосистем, что приводит к уменьшению размера светособирающей антенны и является эффективным механизмом защиты фотосинтетического аппарата от окислительного стресса. Тонкая подстройка компонентов фотосинтетического аппарата листьев растений ячменя сорта Бровар к действию засухи может быть ключевым фактором, определяющим устойчивость этого сорта к данному виду абиотического стресса. У сорта Аванс указанные адаптационные механизмы либо отсутствуют, либо проявляются в меньшей степени, что приводит к более интенсивному развитию окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи.

Ключевые слова: почвенная засуха; 5-аминолевулиновая кислота; окислительный стресс; активные формы кислорода; фотосинтетический аппарат; ячмень.

PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF BARLEY PLANTS TREATED WITH 5-AMINOLEVULINIC ACID: MECHANISMS OF ADAPTATION TO DROUGHT

T. G. KURYANCHYK^a, N. V. KOZEL^a

^aInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: T. G. Kuryanchyk (t.kuryanchyk@gmail.com)

A significant effect of soil drought on the morphometric parameters of the leaves of barley plants of the Brovar and Avans varieties, the accumulation of reactive oxygen species, as well as the content of photosynthetic pigments in them has been established. It has been shown that during drought, the treatment of leaves of barley plants of the Brovar variety

Образец цитирования:

Курьянчик ТГ, Козел НВ. Фотосинтетический аппарат растений ячменя, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой: механизмы адаптации к засухе. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;3:26–38.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-26-38>

For citation:

Kuryanchyk TG, Kozel NV. Photosynthetic apparatus of barley plants treated with 5-aminolevulinic acid: mechanisms of adaptation to drought. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;3:26–38. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-3-26-38>

Авторы:

Татьяна Геннадьевна Курьянчик – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Authors:

Tatsiana G. Kuryanchyk, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.

t.kuryanchyk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7727-3451>

Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; leading researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.

kozel.mikalai@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

with 5-aminolevulinic acid causes a decrease in the content of proteins of photosystem antenna complexes, which leads to a decrease in the size of the light-harvesting antenna and is an effective mechanism for protecting the photosynthetic apparatus from oxidative stress. Fine adjustment of the photosynthetic apparatus components of leaves of barley plants of the Brovar variety to drought may be a key factor in determining the resistance of this variety to this type of abiotic stress. In the Avans variety, these adaptation mechanisms are either absent or manifest to a lesser extent, which leads to a more intensive development of oxidative stress in plants of this variety under the action of soil drought.

Keywords: soil drought; 5-aminolevulinic acid; oxidative stress; reactive oxygen species; photosynthetic apparatus; barley.

Введение

Ячмень – одна из основных зерновых культур, которая занимает ведущее место в сельскохозяйственном производстве Беларуси. Различные абиотические факторы окружающей среды, такие как засуха, засоление, высокая или низкая температура и др., влияют на все стадии роста и развития растений ячменя и могут приводить к изменению критически важных физиологических и биохимических процессов в растительном организме. Фотосинтез также подвергается сильному воздействию стрессовых факторов, в результате чего может изменяться ультраструктура органелл и концентрация фотосинтетических пигментов, метаболитов и ферментов, участвующих в этом процессе [1]. Вызванный засухой стресс и последующее ухудшение водного статуса клеток замедляют рост и развитие растений, нарушают минеральное питание и газообмен листьев, снижают содержание фотосинтетических пигментов, а также отрицательно влияют на скорость фотосинтеза, ограничивая диффузию CO_2 через устьица, и потенциально вызывают образование высокореактивных и цитотоксичных молекул – активных форм кислорода (АФК), которые способны повредить фотосинтетический аппарат (ФСА) растительной клетки, что в конечном итоге приводит к значительным потерям урожая [2–4]. Так, снижение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов (Хл) и каротиноидов (Кар)) может происходить из-за вызванных стрессом нарушений в биосинтезе пигментов или их разрушения. Однако степень повреждения растительной клетки в результате действия абиотических стрессовых факторов зависит от вида и сорта растения, продолжительности воздействия и переносимости стресса [1].

В случае засухи ключевую роль играют адаптационные механизмы, в частности механизмы адаптации ФСА, позволяющие растению преодолеть стрессовое воздействие [5]. Важным аспектом повышения эффективности сельскохозяйственного производства при стремительном изменении климата, в том числе в условиях частых засух, выступает создание эффективных экологически чистых регуляторов роста растений и антистрессоров, что дает возможность снизить негативные последствия от действия биотических и абиотических стрессовых факторов. В связи с этим крайне актуальными являются исследования, направленные на разработку новых подходов к повышению устойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур в неблагоприятных условиях культивирования [3–8].

Экзогенное применение различных небольших молекул или регуляторов роста растений – хорошо известный метод повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [9]. В последние годы большой интерес и популярность в сельском хозяйстве, и в частности в растениеводстве, приобретает использование 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – важнейшего метаболита растительной клетки, предшественника тетрапирролов, который в низких концентрациях положительно влияет на рост и развитие растений в стрессовых условиях [10]. Так, в работах [11; 12] сотрудников лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси впервые были выявлены росторегулирующие, а затем и антистрессовые свойства АЛК – первичного предшественника Хл и гема. Установлено, что при засолении экзогенная АЛК стимулирует накопление в клетках листьев растений ячменя пролина, выполняющего защитную функцию, а также приводит к активации ключевого антиоксидантного фермента – аскорбатпероксидазы [12]. Кроме того, показаны стимуляция экзогенной АЛК экспрессии гена *Nar1* нитратредуктазы, повышение ее содержания и активности в листьях растений ячменя, выращиваемых в условиях солевого стресса, что способствовало формированию у них солеустойчивости [13; 14]. Выявлен механизм контроля распределения ассимилированного азота между системами синтеза АЛК, пролина и белка при субстратной активации нитратредуктазы, а также солевым стрессом и подавлении активности фермента, основанный на участии дельта-1-пирролин-5-карбоксилатсинтеазы в этом процессе. Установлено, что адаптация растений ячменя к солевому стрессу, подавляющему экспрессию гена *Nar1*, осуществляется за счет усиления синтеза АЛК, Хл, Кар и гема, а также стимуляции дельта-1-пирролин-5-карбоксилатсинтеазы и образования пролина. Стоит отметить, что ответные реакции растений на засуху и засоление часто сходны, так как и в случае засухи, и в случае засоления почв растительный организм получает недостаточное для нормального роста и развития количество воды.

Таким образом, представлялось актуальным изучить воздействие АЛК на физиологическое состояние растений ячменя при дефиците влаги в почве. Целью данной работы являлись исследование состояния ФСА растений ячменя при засухе и изучение влияния на ФСА в таких условиях АЛК как универсального стрессопротектора.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования в данной работе использовали проростки растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) засухоустойчивого сорта Бровар [15] и сорта Аванс, выращенные в строго контролируемых лабораторных условиях в режиме 14 ч света (интенсивность 6000 лк) и 10 ч темноты под люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/765 при температуре (23 ± 1) °C и относительной влажности воздуха (35 ± 2) % как при нормальном водоснабжении (ежедневный полив водопроводной водой), так и при засухе (отсутствие полива с момента посадки).

Выращивание растений и определение морфометрических показателей. Исследование влияния засухи на зеленые проростки ячменя проводили в культуре, выращенной в почве. Для этого семена растений ячменя предварительно проращивали на асептически обработанных пластиковых сетках при температуре (23 ± 1) °C в течение 1 сут. Затем отобранные по размеру корней проростки высаживали в сосуды, заполненные 300 г почвогрунта «Восторг» (Карио, Беларусь) с массовой долей воды 50 %. Обработку листьев растений ячменя АЛК производили мелкодисперсным опрыскиванием на 4-е сутки после высадки в грунт пророщенных семян. Концентрация АЛК составляла 10 мг/л. Варианты экспериментов были следующими:

1) контроль – ежедневный полив водопроводной водой (из расчета 25 мл воды на 300 г влажного грунта) без обработки АЛК;

2) АЛК + H₂O – ежедневный полив водопроводной водой с обработкой АЛК;

3) засуха – отсутствие полива и обработки АЛК;

4) АЛК + засуха – обработка АЛК без полива.

Длину зеленых проростков измеряли от зерновки через 7 сут после высадки в почву.

Определение сухой массы листьев растений ячменя, или массовой доли воды. Определение сухой массы листьев, или массовой доли воды, проводили согласно методу, описанному в работе Е. В. Вязова¹. Навески листьев растений ячменя массой 1 г помещали в стеклянные бюксы, масса которых предварительно была измерена на аналитических весах CE224-C (Сартогосм, Россия). Затем бюксы с навесками листьев ставили в вакуумный сушильный шкаф VacuCell 111 Standard (MMM Medcenter Einrichtungen, Германия) и высушивали образцы при температуре 100 °C и давлении 0,05 атм в течение 2 ч. Через 1; 1,5 и 2 ч после начала сушки бюксы с навесками листьев взвешивали, чтобы зафиксировать сухую массу, которая не менялась в последних двух измерениях. Это свидетельствовало о полной потере образцами воды. Массовую долю воды рассчитывали по разнице между начальной и конечной массой бюкса с образцами.

Определение общего содержания АФК. Определение общего содержания АФК *in vitro* проводили с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (ДХФ-ДА), который после деацетилирования окисляется АФК (H₂O₂, •ОН, ROO• и др.) до флуоресцентного соединения ДХФ [16].

Для получения экстракта навески листьев растений ячменя массой 0,2 г помещали в фарфоровую ступку, приливали 1,6 мл 0,2 н. HClO₄ и растирали до получения гомогената, который затем центрифугировали в течение 10 мин при температуре 4 °C и ускорении 17 000g с использованием центрифуги с охлаждением Sigma 1-15K (Sigma Laborzentrifugen, Германия). Нейтрализацию кислотного значения pH (до 7,5–7,6) осуществляли с помощью 4 моль/л КОН. Затем все пробы инкубировали в термостате в течение 20 мин при температуре 37 °C.

Определение АФК проводили, регистрируя флуоресценцию ДХФ ($\lambda_{\text{воз}} = 496$ нм, $\lambda_{\text{набл}} = 524$ нм). Среда измерения содержала 0,15 моль/л буфер Tris-HCl (pH 7,5), нейтрализованный супернатант и 0,5 ммоль/л раствор ДХФ-ДА. Контролем служила проба, состоящая из 0,15 моль/л буфера Tris-HCl (pH 7,5) и 0,5 ммоль/л раствора ДХФ-ДА [17]. Флуориметрический анализ проводили с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (Solar, Беларусь). По количеству образовавшегося в ходе реакции ДХФ судили о накоплении АФК. Концентрацию ДХФ рассчитывали в относительных единицах, контрольный вариант принимали за единицу.

Определение содержания H₂O₂ в листьях растений ячменя. Определение содержания пероксида водорода в экстрактах листьев растений ячменя проводили с помощью флуоресцентного метода, в основе которого лежит реакция окисления скополетина в присутствии H₂O₂, катализируемая пероксидазой хрена [18].

¹Вязов Е. В. Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата и защитной системы растений огурца к светодиодному излучению различного спектрального состава : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02. Минск, 2017. 21 с.

Навески листьев растений ячменя массой 0,2 г помещали в фарфоровую ступку и, приливая 1,6 мл 0,2 н. HClO_4 , растирали до гомогената, который затем центрифугировали в течение 10 мин при ускорении 17 000g с использованием центрифуги Sigma 1-15K. Для нейтрализации кислотного значения pH супернатанта добавляли 4 моль/л КОН и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000g.

Определение H_2O_2 осуществляли, регистрируя убыль флуоресценции скополетина ($\lambda_{\text{воз}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{набл}} = 464$ нм), на спектрофлуориметре CM 2203. Среда измерения содержания H_2O_2 состояла из 0,1 моль/л буфера Tris-HCl (pH 7,0), раствора пероксидазы хрена (200 ед. на 1 мл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Реакцию запускали добавлением нейтрализованного супернатанта. Первым контролем служила проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера Tris-HCl и супернатанта, вторым контролем – проба, состоящая из 0,1 моль/л буфера Tris-HCl, раствора пероксидазы хрена (5 ед. на 10 мкл) и 0,1 ммоль/л раствора скополетина. Концентрацию пероксида водорода рассчитывали в относительных единицах, контрольный вариант принимали за единицу [19].

Определение содержания Хл, феофитина (Фео) и Кар. Состав и содержание Хл *a*, Хл *b*, Фео *a*, Фео *b* и Кар в листьях растений ячменя определяли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) (Macherey-Nagel, Германия) по методике, разработанной в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно исследованиям [20; 21].

Экстракцию пигментов из растений осуществляли с помощью 100 % ацетона. Разделение пигментов на колонке проводили с использованием раствора *A* (90,0 % ацетонитрила, 9,9 % H_2O , 0,1 % триэтиламина) и раствора *B* (100 % этилацетат) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu) в диапазоне 200–800 нм. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при 440 нм (для Хл *a*, Хл *b* и Кар) и 410 нм (для Фео *a* и Фео *b*). Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы и коэффициенты, полученные для каждого пигмента с помощью стандартов. Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} F_{\text{пигм}} V}{V_{\text{аликв}} m},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм (для Фео – 410 нм); $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета; V – объем супернатанта, мкл; $V_{\text{аликв}}$ – аликвота, мкл; m – масса навески, г.

В работе были использованы следующие реагенты: ацетон марки «х. ч.» ($\geq 99,8$ %) (Экос-1, Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9$ %) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7$ %) (Honeywell, Германия), триэтиламин ($\geq 99,5$ %) (AppliChem, Германия), стандарты фотосинтетических пигментов (Sigma-Aldrich, Германия).

Определение содержания белковых компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) с помощью вестерн-блоттинга. Выделение из растений белков и их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле, а также вестерн-блоттинг выполняли, как описано в работе [22]. Навеску листьев растений ячменя массой 0,1 г растирали в жидком азоте до порошка, переносили в пробирку типа «эппендорф», приливали среду выделения, содержащую 56 ммоль/л дитиотреитола, 56 ммоль/л Na_2CO_3 , 12 % сахарозы, 2 ммоль/л этилендиаминтетраацетата, 2 % додецилсульфата натрия, и тщательно перемешивали, используя миксер Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, США). После этого пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре 80 °C на термощейкере TS-100 (Biosan, Латвия), затем снова перемешивали и центрифугировали 5 мин при ускорении 17 000g на центрифуге Biofuge PICO (Thermo Fisher Scientific, США). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Бредфорда [23] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции в целях выравнивания в них содержания белка.

Разделение белков осуществляли с помощью денатурирующего гель-электрофореза на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей. После разделения белков осуществляли их электроперенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) с порами размером 0,45 мкм. Гель помещали на мембрану и укладывали на поверхность системы турбоблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) между слоями хроматографической бумаги, предварительно смочив их в анодном буфере.

Иммунохимическое окрашивание белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, проводили с помощью поликлональных антител (Agrisera, Швеция) на белок D1 реакционного центра ФС II, а также на белки светособирающих комплексов ФС I (Lhca2) и ФС II (Lhcb2, Lhcb4). Количество белков

рассчитывали денситометрически в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу *TotalLab 2.01 (Nonlinear Dynamics Ltd.)*.

Статистическая обработка полученных результатов. Для статистической обработки экспериментальных данных и регистрации полученных результатов использовали программы *Excel 2019 (Microsoft)* и *SigmaPlot 12.5 (Systat Software)*, а также статистические методы, принятые в области биологических исследований [24, с. 28–50]. Основными статистическими характеристиками служили средняя арифметическая величина (\bar{x}), среднее квадратическое отклонение (s), ошибка средней величины ($S_{\bar{x}}$). На графиках и в таблицах приведены средние значения и ошибка средней величины ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$). Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и данного числа степеней свободы (df). Все описанные в работе эксперименты проводили в 5–14-кратной биологической повторности на 7-е сутки после высадки в почву пророщенных семян.

Результаты и их обсуждение

Влияние почвенной засухи на морфометрические показатели проростков ячменя. В ходе проведенных опытов было проанализировано влияние почвенной засухи на всхожесть семян, морфометрические показатели растений и содержание в проростках ячменя воды при действии АЛК в концентрации 10 мг/л. Концентрация была выбрана в соответствии с данными работы [10], где опрыскивание проростков ячменя раствором АЛК в такой концентрации приводило к наиболее значительной стимуляции роста растений. Образцы, выращенные в почве с поливом, в опытах выступали в качестве контроля. В экспериментах использовались два сорта ячменя – засухоустойчивый сорт Бровар [15], а также сорт Аванс, который сейчас активно возделывается в Беларуси, однако согласно проведенным нами предварительным исследованиям более подвержен негативному воздействию почвенной засухи, чем сорт Бровар.

Так, в ходе исследования была выявлена более высокая (на 10,3 %) всхожесть семян засухоустойчивого сорта Бровар по сравнению с таковой сорта Аванс в условиях дефицита влаги в почве (табл. 1).

Таблица 1

Всхожесть семян растений ячменя сортов Бровар и Аванс

Table 1

Germination of seeds of barley plants of the Brovar and Avans varieties

Вариант эксперимента	Сорт Бровар			Сорт Аванс		
	Общее количество семян	Количество проростков	Всхожесть, %	Общее количество семян	Количество проростков	Всхожесть, %
Контроль	222	216	97,0 ± 2,4	442	423	95,6 ± 0,4
Засуха	258	228	88,7 ± 4,2	520	419	78,4 ± 3,8*

* Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Изучение морфометрических показателей первого листа ячменя, определяемых по длине проростков от зерновки, показало, что дефицит воды приводит к уменьшению длины проростков на 23,4 и 20,4 % у необработанных и обработанных АЛК растений сорта Бровар соответственно и на 33,4 и 17,4 % у необработанных и обработанных АЛК растений сорта Аванс соответственно по сравнению с длиной проростков у контрольных растений (табл. 2). Обработка растений АЛК при ежедневном поливе увеличивает длину проростков в среднем на 6,9 % для сортов Бровар и Аванс по сравнению с длиной проростков у необработанных растений.

Анализ массовой доли воды в проростках ячменя показал незначительное, но достоверное снижение этого показателя в условиях засухи – в среднем на 2,6 % для сорта Бровар и на 1,9 % для сорта Аванс по сравнению с массовой долей воды в образцах, выращенных при нормальном водоснабжении (см. табл. 2).

Отметим также, что обработка растений ячменя сорта Бровар АЛК приводила к видимому увеличению длины корней, чего не наблюдалось для сорта Аванс (рис. 1). Таким образом, можно предположить, что как в условиях засухи, так и при нормальном поливе обработка растений ячменя АЛК проявляется в определенном ростостимулирующем эффекте, который более выражен для засухоустойчивого сорта Бровар.

Таблица 2

Изменение длины проростков растений ячменя,
а также массовой доли воды в них под влиянием почвенной засухи

Table 2

Change in the length of seedlings of barley plants,
as well as the mass fraction of water in them under the influence of soil drought

Вариант эксперимента	Сорт Бровар		Сорт Аванс	
	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %
Контроль	16,0 ± 0,2	92,4 ± 0,1	14,4 ± 0,1	91,6 ± 0,2
АЛК + H ₂ O	17,2 ± 0,2*	92,3 ± 0,1	15,5 ± 0,3	92,3 ± 0,1
Засуха	12,3 ± 0,2*	89,7 ± 0,4*	9,6 ± 0,1*	88,9 ± 0,2*
АЛК + засуха	12,8 ± 0,3*	89,8 ± 0,5*	11,9 ± 0,2*	91,1 ± 0,5*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

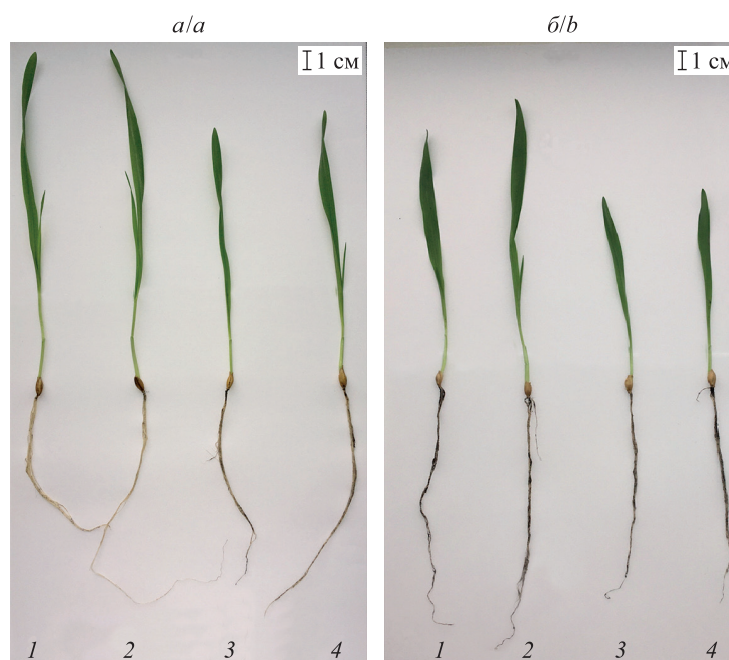


Рис. 1. Внешний вид растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б).
Варианты эксперимента: 1 – контроль; 2 – АЛК + H₂O; 3 – засуха; 4 – АЛК + засуха

Fig. 1. Appearance of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties.
Experiment options: 1 – control; 2 – ALA + H₂O; 3 – drought; 4 – ALA + drought
(ALA – 5-aminolevulinic acid)

Влияние почвенной засухи на накопление АФК в листьях растений ячменя. Для оценки степени стрессового воздействия на растения ячменя почвенной засухи было проанализировано накопление в листьях опытных и контрольных вариантов АФК в целом и H₂O₂ в частности. Результаты, представленные на рис. 2, четко демонстрируют индукцию окислительного стресса под действием почвенной засухи: во всех опытных вариантах наблюдалось существенное (до 100 %) увеличение содержания АФК в листьях.

Однако следует обратить внимание на три факта. Во-первых, обработка растений АЛК приводила к увеличению количества АФК как в опытных (АЛК + засуха), так и в контрольных (АЛК + H₂O) вариантах обоих сортов по сравнению с уровнем АФК в необработанных растениях (см. рис. 2), что может быть причиной активации под действием малых концентраций АЛК метаболических процессов, прежде всего фотосинтеза и дыхания [25–27]. Во-вторых, в условиях засухи содержание АФК в листьях растений ячменя сорта Аванс превышало уровень АФК в листьях растений ячменя сорта Бровар, что

указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях сорта Аванс при засухе. В-третьих, не происходило накопления повышенных количеств H_2O_2 на фоне увеличения содержания общего пула АФК при действии почвенной засухи (рис. 3), что свидетельствует об инициации окислительного стресса по пути образования синглетного кислорода, а не супероксидного радикала, являющегося предшественником H_2O_2 . В связи с этим можно предположить, что хлоропласты играют ключевую роль в развитии окислительных процессов в растениях ячменя при засухе.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление особенностей ответа хлоропластных компонентов при действии почвенной засухи на растения ячменя в присутствии АЛК и без нее.

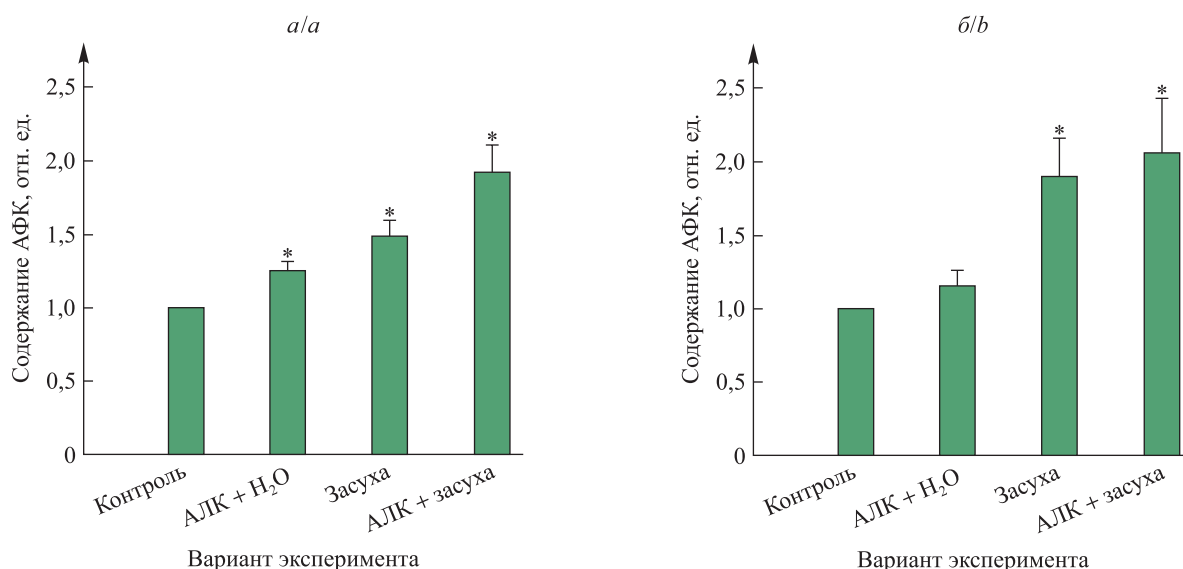


Рис. 2. Изменение содержания АФК в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 2. Changes in the content of reactive oxygen species in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under the influence of soil drought (asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

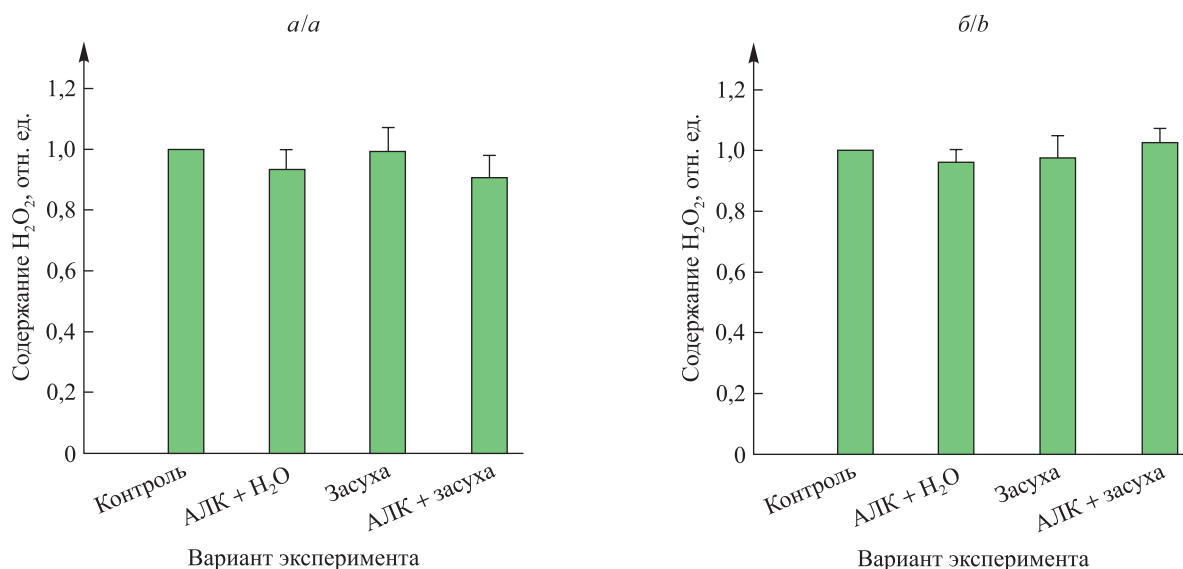


Рис. 3. Изменение содержания H_2O_2 в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Fig. 3. Changes in the content of H_2O_2 in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under the influence of soil drought

Влияние почвенной засухи на содержание Хл, Фео и Кар в листьях растений ячменя. Методом ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов листьев растений ячменя в условиях почвенной засухи. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить во всех исследуемых вариантах наличие Кар (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина), а также Хл *a*, Хл *b*, Фео *a* и следовых количеств Фео *b* [20].

В ходе настоящего исследования было изучено изменение содержания Хл *a*, Хл *b* и Кар в 7-дневных зеленых листьях растений ячменя в нормальных условиях (вариант «контроль») и при абиотическом стрессе, вызванном почвенной засухой (вариант «засуха»), а также после обработки АЛК в аналогичных условиях (варианты «АЛК + H₂O» и «АЛК + засуха»). Результаты представлены на рис. 4 и в табл. 3, 4. Установлено, что под действием почвенной засухи в листьях растений ячменя сорта Бровар достоверно снижается общее содержание Хл (Хл *a* + Хл *b*) на 13,6 % относительно контроля. Такая же закономерность наблюдается у этого сорта для Хл *a* (снижение показателя на 15,2 %) на фоне отсутствия изменений содержания Хл *b* (см. рис. 4, *a*). Однако при обработке растений ячменя сорта Бровар раствором АЛК в концентрации 10 мг/л достоверных отличий содержания Хл по сравнению с контролем не обнаружено, что указывает на стабилизирующее действие АЛК на пигментный аппарат.

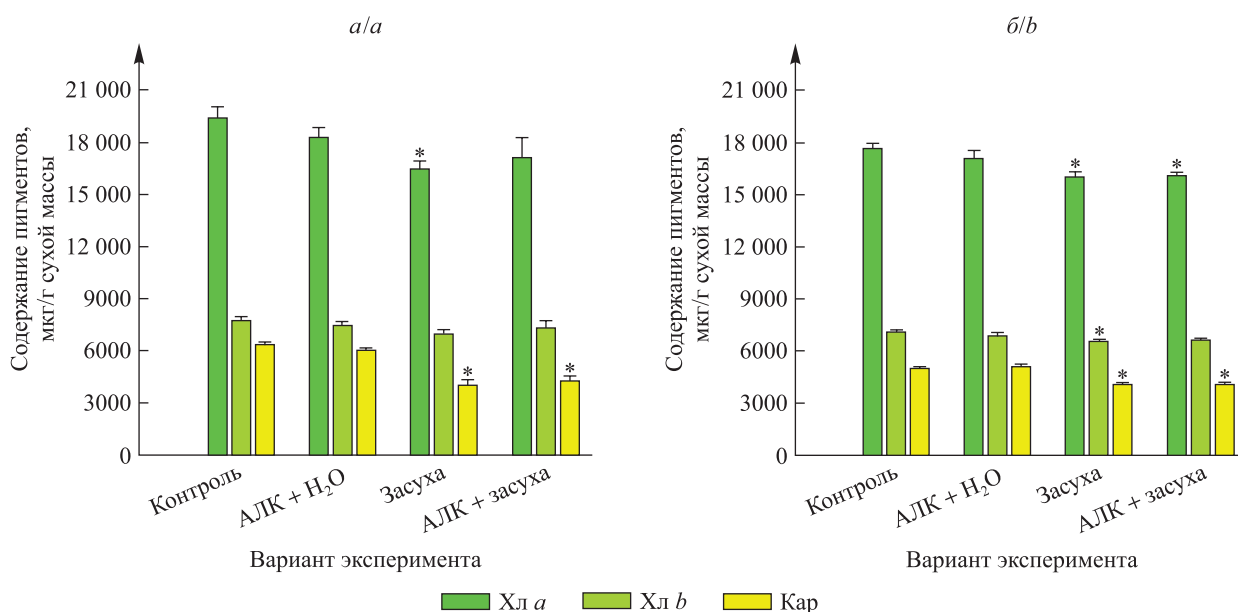


Рис. 4. Изменение содержания пигментов (Хл *a*, Хл *b* и Кар) в листьях растений ячменя сортов Бровар (*a*) и Аванс (*b*), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 4. Changes in the content of pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids) in the leaves of barley plants of the Brovary (*a*) and Avans (*b*) varieties treated with ALA, under the influence of soil drought (asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

Для сорта Аванс наблюдали несколько иную картину. Хотя почвенная засуха и приводила к снижению уровня фотосинтетических пигментов, оно было существенно меньшим, чем у сорта Бровар (см. рис. 4, *b*). При этом исходное содержание Хл и Кар в листьях растений ячменя сорта Аванс было значительно ниже (на 8,7 % для Хл и 20,1 % для Кар) их содержания в листьях растений ячменя сорта Бровар. В связи с этим даже большее снижение уровня фотосинтетических пигментов в условиях засухи в листьях растений ячменя сорта Бровар не привело к уменьшению их количества относительно содержания пигментов в аналогичных вариантах сорта Аванс.

Также было проанализировано влияние недостатка воды на уровень Кар (см. рис. 4). Установлено, что растения ячменя сорта Бровар, выращенные в условиях почвенной засухи, отличаются от контроля пониженным содержанием данных соединений (на 37,0 и 33,2 % меньше в пересчете на сухой вес для вариантов «засуха» и «АЛК + засуха» соответственно). При этом наблюдается уменьшение концентрации как кислородсодержащих (ксантофилловых) Кар – неоксантина, виолаксантина и лютеина (на 44,1; 45,6 и 23,8 % для варианта «засуха» и на 34,3; 43,6 и 17,7 % для варианта «АЛК + засуха» соответственно), так и бескислородного Кар – β -каротина (на 41,3 % для варианта «засуха» и на 41,4 % для варианта «АЛК + засуха») (см. табл. 3).

Таблица 3

Изменение содержания Кар и Фео в листьях растений ячменя сорта Бровар, обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Table 3

Changes in the content of carotenoids and pheophytin in the leaves of barley plants of the Brovar variety, treated with ALA, under the influence of soil drought

Вариант эксперимента	Содержание пигментов, мкг/г сухой массы				
	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Фео <i>a</i>	β-Каротин
Контроль	1132 ± 102	793 ± 40	1901 ± 38	120 ± 1	2425 ± 103
АЛК + H ₂ O	1100 ± 52	746 ± 21	1793 ± 60	120 ± 5	2263 ± 1
Засуха	633 ± 59*	431 ± 45*	1448 ± 61*	123 ± 14	1424 ± 249*
АЛК + засуха	744 ± 101*	447 ± 42*	1564 ± 138	111 ± 3*	1420 ± 22*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Растения ячменя сорта Аванс, выращенные в условиях недостатка влаги в почве (в присутствии АЛК и без нее), также отличаются от контрольных растений более низким содержанием Кар. Так, наблюдается уменьшение концентрации неоксантина, виолаксантина и лютеина (на 20,9; 31,1 и 12,2 % для варианта «засуха» и на 2,3; 9,1 и 14,9 % для варианта «АЛК + засуха» соответственно), а также β-каротина (на 20,7 % для варианта «засуха» и на 26,9 % для варианта «АЛК + засуха») (см. табл. 4).

Таблица 4

Изменение содержания Кар и Фео в листьях растений ячменя сорта Аванс, обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Table 4

Changes in the content of carotenoids and pheophytin in the leaves of barley plants of the Avans variety, treated with ALA, under the influence of soil drought

Вариант эксперимента	Содержание пигментов, мкг/г сухой массы				
	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Фео <i>a</i>	β-Каротин
Контроль	717 ± 35	373 ± 26	1698 ± 36	104 ± 3	2202 ± 56
АЛК + H ₂ O	847 ± 22*	504 ± 21*	1685 ± 51	102 ± 3	2061 ± 69
Засуха	567 ± 40*	257 ± 20*	1490 ± 41*	115 ± 7	1747 ± 66*
АЛК + засуха	700 ± 11	339 ± 7	1445 ± 38*	164 ± 18*	1610 ± 45*

*Достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Приведенные выше данные указывают, что дефицит влаги в почве отрицательно влияет на накопление пигментов в клетках растений ячменя. При этом обработка листьев растений ячменя сорта Бровар АЛК в условиях засухи приводила к тому, что содержание хлорофилльных пигментов в них достоверно не отличалось от контроля, тогда как у не обработанных раствором АЛК растений уровень хлорофилльных пигментов достоверно отличался от контроля. Для растений ячменя сорта Аванс такого эффекта действия АЛК не наблюдалось.

Более наглядно стрессопротекторные свойства АЛК демонстрирует изменение содержания Фео *a* по отношению к уровню Хл *a* (Фео *a* / Хл *a*) в листьях растений ячменя сорта Бровар (рис. 5). Так, в варианте «засуха» показатель Фео *a* / Хл *a* увеличился на 19,7 % по сравнению с контролем, а в варианте «АЛК + засуха» – только на 4,9 % по сравнению с контролем, что находится в пределах погрешности эксперимента. Для растений сорта Аванс наблюдался рост показателя Фео *a* / Хл *a* на 23,2 % для варианта «засуха» и на 73,7 % для варианта «АЛК + засуха», что указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи и его усугубление при добавлении АЛК.

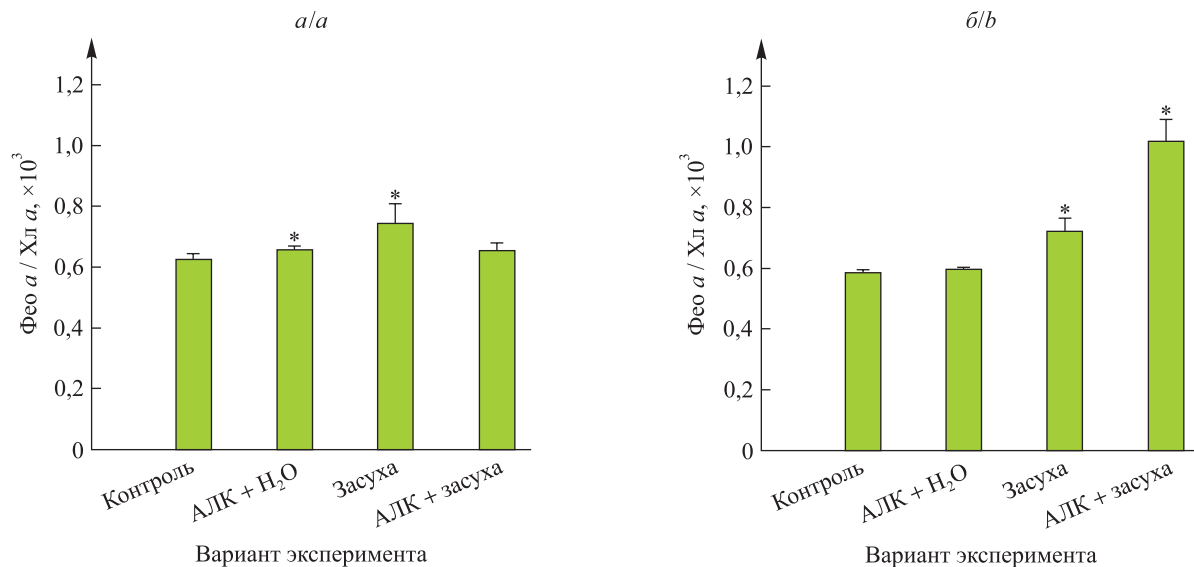


Рис. 5. Изменение содержания Фео *a* по отношению к уровню Хл *a* в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК в условиях почвенной засухи (звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 5. Changes in the content of pheophytin *a* in relation to chlorophyll *a* level in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under soil drought (asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

Влияние почвенной засухи на содержание структурных белков ФС в листьях растений ячменя.

Анализ содержания структурных белков ФС II (PsbA, Lhcb2, Lhcb4) и ФС I (Lhca2) показал принципиально разную регуляцию синтеза этих компонентов хлоропластных мембран в ответ на действие почвенной засухи в сочетании с обработкой растений АЛК для сортов Бровар и Аванс. Так, в листьях растений ячменя сорта Бровар при нормальном поливе АЛК стимулировала синтез белка внешней антенны ФС II Lhcb2, а также белка антенны ФС I Lhca2 (рис. 6, а). При почвенной засухе обработка листьев АЛК, наоборот, приводила к снижению содержания белков антенных комплексов ФС, что является эффективным фотопротекторным механизмом защиты ФСА в таких условиях.

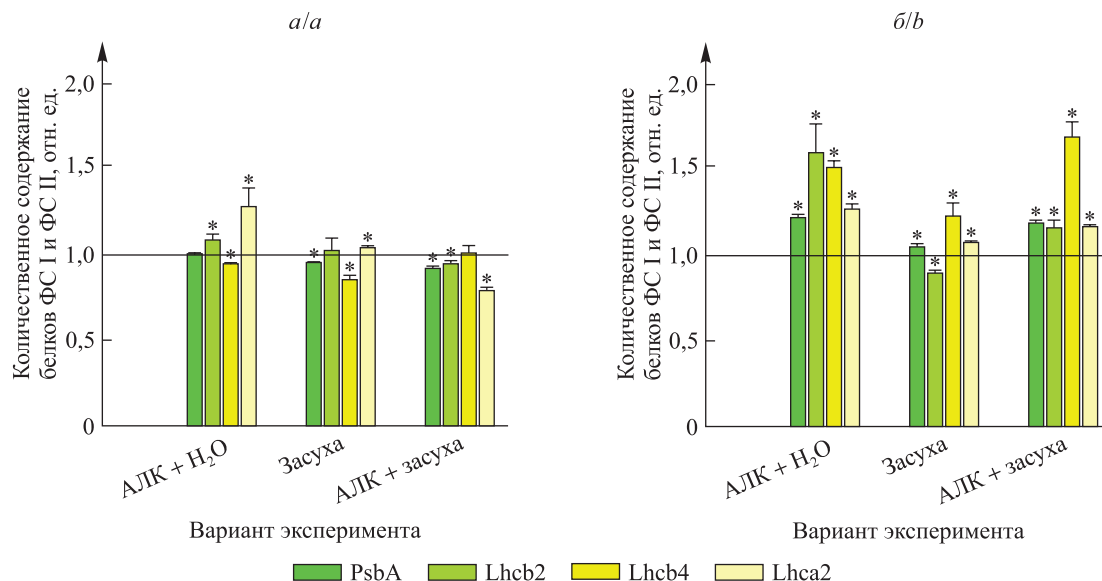


Рис. 6. Содержание белков ФС I и ФС II в листьях растений ячменя сортов Бровар (а) и Аванс (б), обработанных АЛК, в условиях почвенной засухи (контроль принят за единицу и представлен базовой линией; звездочкой отмечены достоверные различия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$))

Fig. 6. The content of photosystem I and photosystem II proteins in the leaves of barley plants of the Brovar (a) and Avans (b) varieties treated with ALA under soil drought conditions (control is taken as a unit and represented by the baseline; asterisk marked the significant differences compared with the control ($p \leq 0.05$))

Для сорта Аванс наблюдался противоположный ответ растительной клетки на обработку листьев АЛК в условиях засухи: количество всех проанализированных белков увеличивалось относительно их уровня и в контроле, и в варианте «засуха», что потенциально опасно с точки зрения развития в таких растениях фотоокислительного стресса при недостатке влаги (рис. 6, б).

Полученный результат объясняет существенно более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях сорта Аванс, чем в растениях сорта Бровар, при действии почвенной засухи и говорит о наличии у сорта Бровар дополнительных механизмов, связанных с регуляцией синтеза структурных белков фотосинтетических мембран и определяющих его засухоустойчивость. По мнению авторов, уменьшение количества пигментов в листьях этого сорта обусловлено в основном не деструкцией в результате стресса, а снижением их синтеза, что может быть адаптационной реакцией растений, позволяющей минимизировать вероятность образования АФК в фотосинтетических мембранах при недостатке влаги, а также оптимизировать в данных условиях использование энергии света для фотосинтетических процессов. На это указывает преимущественное снижение Кар (неоксантин, виолаксантин и β -каротин), активно участвующих в светосборе.

Заключение

Таким образом, установлено существенное влияние почвенной засухи на морфометрические показатели листьев растений ячменя сортов Бровар и Аванс, накопление в них АФК, а также содержание фотосинтетических пигментов. При действии засухи выявлено значительное снижение ростовых показателей растений (в частности, длины листьев более чем на 20 %), возрастание общего содержания АФК, уменьшение количества Хл и Кар. Наибольшее снижение содержания фотосинтетических пигментов в условиях засухи было отмечено для листьев растений ячменя сорта Бровар. При этом обработка листьев растений ячменя сорта Бровар АЛК в условиях засухи приводила к тому, что содержание хлорофилльных пигментов в них достоверно не отличалось от контроля, тогда как у не обработанных раствором АЛК растений уровень хлорофилльных пигментов достоверно отличался от контроля. Для растений ячменя сорта Аванс такого эффекта действия АЛК не наблюдалось.

Показано, что при засухе показатель Фео a / Хл a для растений сорта Бровар увеличился на 19,7 % по сравнению с контролем, а при использовании АЛК – только на 4,9 %. Для растений сорта Аванс отмечен рост показателя Фео a / Хл a на 23,2 % для варианта «засуха» и на 73,7 % для варианта «АЛК + засуха», что указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи и его усугубление при добавлении АЛК.

Выявлено, что при обработке листьев растений ячменя сорта Бровар АЛК в условиях недостатка воды в почве снижается содержание белков антенных комплексов ФС. Это приводит к уменьшению размера светособирающей антенны и является эффективным механизмом защиты ФСА в подобных условиях. Для сорта Аванс наблюдался противоположный ответ растительной клетки на обработку листьев АЛК в условиях засухи: количество всех проанализированных белков ФС увеличивалось относительно их уровня в контроле и варианте «засуха», что потенциально опасно с точки зрения развития в таких растениях фотоокислительного стресса при недостатке влаги.

Обнаруженная тонкая подстройка компонентов ФСА листьев растений ячменя сорта Бровар к действию засухи может быть одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость этого сорта к данному виду абиотического стресса. У сорта Аванс указанные адаптационные механизмы либо отсутствуют, либо проявляются в меньшей степени, что приводит к более интенсивному развитию окислительного стресса в растениях этого сорта при действии почвенной засухи. В случае обработки листьев растений ячменя сорта Аванс АЛК стресс не снимается, а, наоборот, усиливается.

Библиографические ссылки

1. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
2. Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80:3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
3. Wang Xuxu, Gao Yangang, Wang Qingjie, Chen Min, Ye Xinlin, Li Dongmei, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
4. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.

6. Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*. 2013;30(4):355–361. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.001.
7. Kebede A, Kang MS, Bekele E. Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. In: Sparks DL, editor. *Advances in agronomy. Volume 156*. Cambridge: Elsevier; 2019. p. 265–314. DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008.
8. Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:120–133. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
9. Chan Zhulong, Shi Haitao. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(3):e991577. DOI: 10.4161/15592324.2014.991577.
10. Яронская ЕБ, Балута ТВ, Коляго ВМ, Шальго НВ. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя и содержание пигментов. В: Зорина ТЕ, редактор. *Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Шестой съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков; 6–8 октября 2004 г.; Минск, Беларусь. Часть I*. Минск: Редакционно-издательский центр Академии управления при Президенте Республики Беларусь; 2004. с. 117–119.
11. Averina NG, Yaronskaya EB. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth. *Photosynthetica*. 1991; 25(1):27–31.
12. Averina NG, Gritskevich ER, Vershilovskaya IV, Usatov AV, Yaronskaya EB. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2010;57(6):792–798. DOI: 10.1134/S1021443710060075.
13. Beyzaei Z, Averina NG, Sherbakov RA. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(2):11. DOI: 10.1007/s11738-014-1752-0.
14. Beyzaei Z, Sherbakov RA, Averina NG. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2014;33(4):745–750. DOI: 10.1007/s00344-014-9422-4.
15. Доманская ИН, Радюк МС, Будакова ЕА, Самович ТВ, Спивак ЕА, Шальго НВ, составители. *Технология ДНК-манипулирования генов устойчивости ячменя к засухе*. Минск: Право и экономика; 2011. 31 с.
16. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.
17. Козел НВ, Шальго НВ. Антиоксидантная система листьев ячменя при фотоокислительном стрессе, индуцированном бенгальским розовым. *Физиология растений*. 2009;56(3):351–358.
18. Козел НВ. *Фотоокислительные процессы, индуцированные в растениях ячменя и табака сенсбилизаторами ксантеиновой природы* [диссертация]. Минск: [б. и.]; 2009. 146 с.
19. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*. 1997;202(2):133–141. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00244-x.
20. Каляга ТГ, Козел НВ. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:46–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
21. Azarin K, Usatov A, Makarenko M, Kozel N, Kovalevich A, Dremuk I, et al. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*. 2020;103(4–5):373–389. DOI: 10.1007/s11103-020-00997-x.
22. Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1997;1320(3):297–309. DOI: 10.1016/S0005-2728(97)00033-9.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
24. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. 3-е издание. Минск: Высшая школа; 1973. 320 с.
25. Wu Y, Jin X, Liao W, Hu L, Dawuda MM, Zhao X, et al. 5-Aminolevulinic acid (ALA) alleviated salinity stress in cucumber seedlings by enhancing chlorophyll synthesis pathway. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:635. DOI: 10.3389/fpls.2018.00635.
26. Liu D, Wu L, Naeem MS, Liu H, Deng X, Xu L, et al. 5-Aminolevulinic acid enhances photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant system in oilseed rape under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35(9):2747–2759. DOI: 10.1007/s11738-013-1307-9.
27. Емельянова АВ, Обуховская ЛВ, Аверина НГ. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на дыхательную активность растений озимого рапса, обогащенных антоцианами. В: Смолич ИИ, Демидчик ВВ, Падутов ВЕ, редакторы. *Клеточная биология и биотехнология растений. Тезисы докладов II Международной научно-практической конференции; 28–31 мая 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2018. с. 38.

References

1. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
2. Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;80:3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
3. Wang Xuxu, Gao Yangang, Wang Qingjie, Chen Min, Ye Xinlin, Li Dongmei, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
4. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.
6. Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*. 2013;30(4):355–361. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.001.

7. Kebede A, Kang MS, Bekele E. Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. In: Sparks DL, editor. *Advances in agronomy. Volume 156*. Cambridge: Elsevier; 2019. p. 265–314. DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008.
8. Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:120–133. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
9. Chan Zhulong, Shi Haitao. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules. *Plant Signaling & Behavior*. 2015;10(3):e991577. DOI: 10.4161/15592324.2014.991577.
10. Yaronskaya EB, Baluta TV, Kolyago VM, Shalygo NV. [Influence of 5-aminolevulinic acid on the growth of barley plants and pigment content]. In: Zorina TE, editor. *Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya «Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem». Shestoi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov; 6–8 oktyabrya 2004 g.; Minsk, Belarus'. Chast' I* [International scientific conference «Molecular, membrane and cellular bases of biosystems functioning». Sixth congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists; 2004 October 6–8; Minsk, Belarus. Part 1]. Minsk: Editorial and Publication Centre of the Academy of Public Administration under the aegis of the President of the Republic of Belarus; 2004. p. 117–119. Russian.
11. Averina NG, Yaronskaya EB. Involvement of 5-aminolevulinic acid in the regulation of plant growth. *Photosynthetica*. 1991; 25(1):27–31.
12. Averina NG, Gritskovich ER, Vershilovskaya IV, Usatov AV, Yaronskaya EB. Mechanisms of salt stress tolerance development in barley plants under the influence of 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2010;57(6):792–798. DOI: 10.1134/S1021443710060075.
13. Beyzaei Z, Averina NG, Sherbakov RA. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2015;37(2):11. DOI: 10.1007/s11738-014-1752-0.
14. Beyzaei Z, Sherbakov RA, Averina NG. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2014;33(4):745–750. DOI: 10.1007/s00344-014-9422-4.
15. Domanskaya IN, Radyuk MS, Budakova EA, Samovich TV, Spivak EA, Shalygo NV, compilers. *Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoychivosti yachmenya k zasukhe* [DNA typing technology for drought resistance genes in barley]. Minsk: Pravo i ekonomika; 2011. 31 p. Russian.
16. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):145–157. DOI: 10.1006/niox.1996.0113.
17. Kozel NV, Shalygo NV. [Antioxidant system of barley leaves under photooxidative stress induced by rose bengal]. *Fiziologiya rastenii*. 2009;56(3):351–358. Russian.
18. Kozel NV. *Fotooksislitel'nye protsessy, indutsirovannye v rasteniyakh yachmenya i tabaka sensibilizatorami ksantenovoi prirody* [Photo-oxidative processes induced in barley and tobacco plants by sensitizers of xanthene nature] [dissertation]. Minsk: [s. n.]; 2009. 146 p. Russian.
19. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods*. 1997;202(2):133–141. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00244-X.
20. Kaliaha TG, Kozel NV. The effect of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:46–53. Russian. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
21. Azarin K, Usatov A, Makarenko M, Kozel N, Kovalevich A, Dremuk I, et al. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*. 2020;103(4–5):373–389. DOI: 10.1007/s11103-020-00997-X.
22. Jansson S, Stefánsson H, Nyström U, Gustafsson P, Albertsson P-Å. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1997;1320(3):297–309. DOI: 10.1016/S0005-2728(97)00033-9.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1–2):248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
24. Rokitskii PF. *Biologicheskaya statistika* [Biological statistics]. 3rd edition. Minsk: Vysshaya shkola; 1973. 320 p. Russian.
25. Wu Y, Jin X, Liao W, Hu L, Dawuda MM, Zhao X, et al. 5-Aminolevulinic acid (ALA) alleviated salinity stress in cucumber seedlings by enhancing chlorophyll synthesis pathway. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:635. DOI: 10.3389/fpls.2018.00635.
26. Liu D, Wu L, Naeem MS, Liu H, Deng X, Xu L, et al. 5-Aminolevulinic acid enhances photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant system in oilseed rape under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;35(9):2747–2759. DOI: 10.1007/s11738-013-1307-9.
27. Yemelyanova HV, Obukhovskaya LV, Averina NG. [Influence of 5-aminolevulinic acid on the respiratory activity of winter rapeseed plants enriched with anthocyanins]. In: Smolich II, Demidchik VV, Padutov VE, editors. *Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rastenii. Tezisy dokladov II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 28–31 maya 2018 g.; Minsk, Belarus'* [Cell biology and plant biotechnology. Abstracts of the 2nd International scientific and practical conference; 2018 May 28–31; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. p. 38. Russian.

Получена 27.06.2022 / исправлена 18.07.2022 / принята 19.07.2022.
Received 27.06.2022 / revised 18.07.2022 / accepted 19.07.2022.