

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Хао Цзинжао

**Исследование молекулярных механизмов действия пестицидов
на фотосинтетический аппарат высших растений**

Специальность 1.5.2. Биофизика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители — *Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор.*
Рубин Андрей Борисович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН.

Официальные оппоненты — *Соловченко Алексей Евгеньевич, доктор биологических наук, кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор*

Яминский Игорь Владимирович, доктор физико-математических наук, профессор, кафедра физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор

Пашковский Павел Павлович, кандидат биологических наук, лаборатория физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в __ часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3264>.

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Известно, что неоникотиноидные инсектициды (НИ) используются в сельском хозяйстве в качестве защитных средств от насекомых (Gupta et al. 2008). Принцип действия НИ основан на их взаимодействии с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR) в нейронах центральной нервной системы насекомых, блокировании ее активности и гибели насекомого (Natalia, Robert 2016). Среди современных НИ широкое применение получили N-нитрогуанидин (имidakлоприд), тиаметоксам (ТМХ) и клотианидин (КЛ) (Jeschke et. al. 2011). НИ поглощаются растением через корни или листья, а также диффундируют к листьям по сосудам ксилемы растения, где могут накапливаться в течение нескольких недель, обеспечивая таким образом эффективную защиту от вредителей (Radolinski et. al. 2018). В отличие от высокой скорости диффузии в ксилеме, во флоэме НИ, практически, не транспортируются, о чем свидетельствует их низкое содержание в органах растения (корень, плод) (Sur, Stork 2003).

Современные представления о молекулярном механизме действия НИ на растения весьма противоречивы. С одной стороны, обработка НИ повышает всхожесть семян, рост корней (Calafiori, Barbieri 2001; Macedo, de Camargo Castro 2011), стрессоустойчивость растения (засуха, холод) (Cataneo et al. 2010; Larsen and Falk 2013), биомассу, скорость фотосинтеза (Cataneo et al. 2010), а также содержание белка, фиксирующего углекислый газ (CO₂) (Preetha, Stanley 2012) и устойчивость к заболеваниям (Ford et al. 2010). Действие НИ зависит от концентрации, площади посевов и генетики обработанных сельскохозяйственных культур.

С другой стороны, действие НИ на растение приводит и к негативным эффектам: блокирование фотосинтетических процессов и активности ряда ферментов (Xia et al. 2006), снижение прорастания и роста растения (Aksoy et al. 2013), изменение морфологии и стимуляция окислительного стресса растения (Kilic et al. 2015; Shakir et al. 2018). Действительно, у растений, обработанных НИ, увеличивается количество биомаркеров окислительного стресса, таких как пролин и малоновый диальдегид (Mahapatra et al., 2019; Shahid et al., 2021), что свидетельствует об образовании активных форм кислорода (АФК) (Touzout et al., 2021). Очевидно, что увеличение содержания АФК запускает процесс окисления полиненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах, что, в свою очередь, вызывает изменение вязкости и других функций клеточных и субклеточных мембран (García et al., 2014), а затем приводит к активации антиоксидантных ферментов растения (Shahid et al.,

2021; Touzout et al., 2021).

Цели и задачи исследования

Целью работы было изучение молекулярных механизмов воздействия неоникотиноидных инсектицидов (ТМХ, и его производного, КЛ) на молекулярную структуру и функции фотосинтетических пигментов различных генотипов кукурузы (инбредной линии кукурузы zpr1 225 и гибридной линии zр 341).

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать содержание и функциональные свойства пигментов листа растения с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния, ИК-спектроскопии, АСМ, ЭПР и переменной флуоресценции хлорофилла («JР-тест»).
- 2) Исследовать молекулярные свойства пигментов листа, подверженных воздействию пестицидов на целое растение (опрыскивание листьев и внесение пестицида в почву);
- 3) Исследовать действие КЛ на молекулярную структуру пигментов (хлорофилл, каротиноиды) в хлоропластах, а также на морфологию хлоропласта, вязкость мембраны и содержание АФК.
- 4) Исследовать роль молекулярной структуры пигментов в формировании устойчивости к действию пестицида у различных генотипов кукурузы.
- 5) Разработать дополнительные экспериментальные и теоретические подходы для исследования конформации молекул различных генотипов кукурузы (инбредной линии кукурузы zpr1 225 и гибридной линии zр 341) с помощью ИК- и КР спектров (SERS).

Положения, выносимые на защиту

Действие пестицида тиаметоксама на листья кукурузы (варианты внесения через опрыскивание или прикорневой полив растения) различных генотипов кукурузы (инбредной линии кукурузы zpr1 225 и гибридной линии zр 341) влияет на фотосинтетический аппарат растения: перенос электронов с Q_A^- в пул хинонов (ψ_{E_0}) и на функциональную активность ФСII (PI_{ABS}). Действию пестицида, клотианидина на фотосинтетический аппарат в хлоропластах влияет на скорость переноса электронов между Q_A и Q_B , а также долю центров ФСII, которые не могут восстановить пул хинонов, либо за счет блока электронного транспорта (механизм аналогичен действию диурона), либо за счет уменьшения скорости связывания пластохинона с Q_B . Данный процесс, сопровождается увеличением содержания активных форм кислорода (АФК) в хлоропластах: содержание МДА после освещения ($100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) хлоропластов, обработанных КЛ, увеличивается. Действию пестицида, клотианидина на частицы ФСII (способные к фотозависимому синтезу O_2 , и частицы ФСII не

способных к фотозависимому синтезу O_2) снижает скорость выделения O_2 и восстановления акцептора электронов что аналогично результатам, полученными на ФСII хлоропластов и свидетельствуют об отсутствии прямого действия пестицида на ФСII. Действие пестицида, клотианидина меняет дисковидную форму, рельеф поверхности и вязкость мембран хлоропластов.

Научная новизна работы

При изучении *характер действия пестицида* ТМХ на фотосинтетический аппарат листа кукурузы (варианты внесения пестицида с помощью опрыскивания или прикорневого полива растения) доказано его *ингибиторное действие*: изменения на акцепторной стороне ФСII обусловлены снижением переноса электронов от Q_A^- и функциональной активности ФСII (PI_{ABS}) (инбредная линия zprl 225), а также изменениями конформации молекулы каротиноидов (различных для инбредной линии кукурузы zprl 225 и гибридной линии zр 341).

При изучении *локализации действия пестицида* КЛ на фотосинтетический аппарат в хлоропластах, обработанных КЛ (в присутствии DCBQ) установлено, что число центров ФСII, способных осуществлять реакцию переноса с Q_A на Q_B снижалось. При изучении действия пестицида КЛ на *фотосинтетический аппарат активных частиц ФСII* (частицы, способные к образованию O_2 , и частицы ФСII без кислород-высвобождающих комплексов, КВК) установлено, что скорость выделения O_2 снижается на 20%, что согласуется с данными, полученными на хлоропластах. Скорость восстановления акцептора электронов DCPIP в присутствии КЛ уменьшалась как в препаратах мембран ФСII, так и в препаратах мембран, не содержащих КВК в присутствии искусственных доноров электронов (смесь катионов Mn^{2+} и H_2O_2), что свидетельствует о косвенном действии КЛ на ФСII. При изучении действия пестицида КЛ установлена *связь между активностью фотосинтетического аппарата и морфологией хлоропласта*: увеличение АФК коррелирует с тем, что 57% хлоропластов изменили форму с дисковидной на сферическую, рельеф поверхности хлоропласта отсутствовал, а вязкость мембран хлоропластов уменьшалась.

Теоретическая и практическая значимость

В работе исследовали действие пестицидов на генетически различные типы кукурузы, что в дальнейшем позволит использовать полученные данные в селекции растений или диагностики их состояния при селекции на фоне воздействия инсектицидов. Диагностика действия ТМХ на растения возможна не только с помощью контроля изменений активности ФСII, но и КР- и ИК- спектроскопии.

Методология и методы исследования

В работе использованы традиционные и современные методы молекулярной и клеточной биофизики. Для исследования молекулярных механизмов воздействия инсектицидов на молекулярную структуру и функции фотосинтетических пигментов различных генотипов кукурузы использовали сочетание биофизических методов (КР- и ИК- спектроскопия, ЭПР – спектроскопия, методы регистрации быстрой флуоресценции и модулированного отражения/поглощения света и АСМ) и подходов (выделение ВВУ-частиц ФСII, регистрация выделения и поглощения O₂).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается современными методами исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Сформулированные в тексте работы положения, выводы и практические рекомендации продемонстрированы в приведенных таблицах и рисунках. Основные результаты работы были представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" и Международной конференции и школе по нанобиотехнологии. Опубликовано 6 статей¹ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки), и представлены на семинаре кафедры биофизики, конференции "Форум молодых ученых "Ломоносов-2021" (Шэньчжэнь, 2021). "Lomonosov-2022"(Shenzhen, 2022).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 169 страниц, содержит 72 рисунка, 20 таблиц и 204 литературных источников.

Основное содержание работы

Введение

Обоснована актуальность темы диссертации, формулируется цель и задачи исследования, приводятся положения, выносимые на защиту.

¹ Хао Цзинжао участвовала в получении результатов, опубликованных в статье Liu W., Shutova V.V., Maksimov G.V., **Haо J.**, He Y. Use of nanostructured silver substrates (coatings) to study the content and conformation of β-carotene // Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences. – 2022. – Vol. 101, No. 2. – P. 112-124 для разработки метода исследования пигментов.

Обзор литературы

Представлен анализ современных представлений о строении и функциях пигментов листа (хлорофилл, каротиноиды) и результаты, характеризующие действие пестицидов на растения, а также современных методов исследования (КР- и ИК- спектроскопия, переменная флуоресценция, ЛР-тест, СЕРС и математическое моделирование) и набор объектов (различные генетические типы растений, субклеточные фракции, выделенные молекулы) для проведения работы по теме диссертации.

Материалы и методы

Глава **Материалы и методы** содержит описание объектов (различные генотипы кукурузы (инбредная линия кукурузы zpr1 225 и гибридной линии zr 341, лист, семена), хлоропласты гороха, методов исследования, процедуры приготовления препаратов и обработки полученных данных. *Объектом исследования* являлись листья кукурузы *Z. mays* инбредной (zpr1 225) и гибридной (zr 341) линий (Институт кукурузы «Земун Поле» Белград, Сербия). Кукуруза инбредной линии (zpr1 225) обладает высокой фотосинтетической эффективностью, обогащенным пигментным составом и повышенной пищевой ценностью. Гибрид (zr 341) – высокоурожайный гибрид, отличающийся высоким качеством и технологией выращивания (Тютяев и др., 2015). Семена проращивали до появления корешков (длина не менее 5 мм), после чего высаживали в грунт (смесь вермикулита с черноземом 1:1) и выращивали в условиях 16-часового светового дня при постоянной температуре 25 °С. При появлении 3-го настоящего листа длиной более 4 см (10й день после проращивания) растения опрыскивали, либо поливали сразу же после посадки раствором ТМХ [5-метил-3-(2-хлортиазол-5-илметил)-1,3,5-оксадиазинан-4-илиден-N-нитроамин] в концентрации 0,2 мг/л (Рис. 1). В качестве контроля использовали листья кукурузы, выращенные в аналогичных условиях без опрыскивания, либо полива ТМХ. Измерения проводили при достижении 5-м настоящим листом размера 12-14 см. *Выделение хлоропластов из листьев гороха:* в эксперименте использовали верхние листья гороха, которые трижды (по 10 с) гомогенизировали блендером в буфере (50 мМ трицин (рН 7,8), 400 мМ сахара, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂). Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя нейлона с последующим центрифугированием (300g, 1 мин, 0-4 °С). Надосадочную жидкость сливали в пробирку и центрифугировали (5000g, 5 мин.). Осадок, содержащий хлоропласты, гомогенизировали в буфере В. Хлоропласты замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °С.

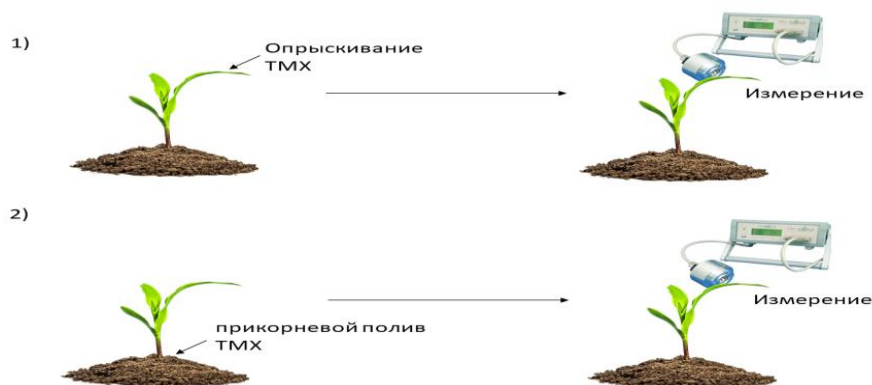


Рис. 1. Схема проведения эксперимента на целых растениях кукурузы (описание в тексте)

Выделение ВВУ-частиц ФСII: ВВУ-частиц, способных (ФСII +Mn) и неспособных (ФСII -Mn) к фотоиндуцированному высвобождению O₂, проводили согласно описанной ранее методике (Ловягина и др., 2022). Отметим, что ВВУ-частицы ФСII -Mn не содержат белков кислород-высвобождающего комплекса (КВК), катионов марганца и кальция. Экстракцию катионов марганца из КВК осуществляли путем обработки образцов в среде 0,8 М Трис-НСl буфером (рН 8,5) в течение 15 мин. (концентрация хлорофилла 0,5 мг/мл, 22 °С). Полученные препараты ФСII помещали в буфер, содержащий 400 мМ сахарозы, 15 мМ NaCl, 50 мМ MES/NaOH, рН 6,5, замораживали в растворе азота и хранили при температуре -80 °С.

Обработка хлоропластов клотианидином и определение содержания пигментов: Отметим, что, проникая в листья растений ТМХ, в течение 20 мин, метаболизируется до клотианидина (КЛ) (Nauen et al., 2003), который вызывает перестройку метаболизма обработанных НИ растений. В связи с этим, в нашей работе использовали ТМХ в экспериментах на тканях растения, а при изучении влияния НИ на структуру и функцию фотосинтетического аппарата *in vitro* – КЛ. Хлоропласты ресуспендировали в буфере (50 мМ трицин (рН 7,6), 400 мМ сахароза, 10 мМ NaCl) до концентрации 20-25 мкг/мл. Клотианидин (КЛ) добавляли в среду инкубации, исходя из конечной концентрации 22 или 110 мкг/л и инкубировали в течение 10 мин. при 4 °С без освещения. В качестве контроля использовали аналогичны объем дистиллированной воды. Затем хлоропласты помещали в буфер (около 27°С), инкубировали в течение 2 мин. при температуре 18-22° С и использовали в эксперименте. Содержание хлорофилла (в 95%-ном этаноле) определяли спектрофотометрическим методом (Lichtenthaler, 1987).

Изменения содержания и конформационные молекул каротиноидов регистрировали с

помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) на спектрометре ДФС-24 (ЛОМО), оснащенного лазером 473 нм и системой MORS 1/3648 (ЛОМО) на основе линейной ПЗС-матрицы TCD1304DG (Toshiba) с фильтром LPO2-473RS-50. Регистрация КР от листовой пластинки кукурузы проводилась в течение 5 с. при мощности лазера 3 мВт. Спектры КР выделенных хлоропластов регистрировали с помощью лазерного конфокального спектрометра Renishaw inVia, оснащенного лазерами (длина волны - 488 нм (50 мВт) и 532 нм (500 мВт). В ходе эксперимента регистрировали КР при интенсивности лазерного облучения 5% (объектив x5, числовая апертура 0,12). В работе использовали КР-спектрометры, разработанные на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова и коммерческая установка в университете МГУ-ППИ (Шеньчжень, КНР).

Измерение флуоресценции хлорофилла: в эксперименте на целых листьях использовался многофункциональный анализатор растений (М-РЕА-2) с помощью которого одновременно регистрировали кинетики быстрой флуоресценции и модулированного отражения/поглощения света при 820 нм (MR) ФС1 (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, England). Интенсивность возбуждающего света ($\lambda = 625$ нм) составляла 3000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, продолжительность освещения - 60 с. Измерения проводили на адаксиальной стороне интактных листьев, помещенных в измерительный блок. Перед экспериментом растение адаптировали к темноте. Для анализа ОЖР-кривых, использовали стандартный ЖР-тест со следующими параметрами: интенсивность на 20 мкс (F_0), 2 мс (F_j), 30 мс (F_l), F_m (максимальный уровень флуоресценции) (Strasser et al., 2004a). Эти характеристики учитывались при расчете параметров флуоресценции согласно Strasser et al., 2004a. *Кинетику индукции флуоресценции* (кривые ОЖР) регистрировали с помощью анализатора (РЕА) (Hansatech, Великобритания). Флуоресценция хлорофилла стимулировалась красным светом ($\lambda = 650$ нм) интенсивностью 1500 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. *Кинетику темнового затухания флуоресценции* хлорофилла (Q_A - реокисление) и *замедленной флуоресценции* (ЗФ) регистрировали с помощью прибора ФКМС-2 (МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия) (Волгушева и др., 2022). Флуоресценция хлорофилла возбуждалась синим светом ($\lambda=445$ нм) с интенсивностью 5000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$. Затухание флуоресценции регистрировали через 56 мкс после насыщающей вспышки длительностью 250 мкс (10 с).

Скорость выделения и поглощения O_2 определяли методом амперометрии с помощью электрода Кларка (прибор Oxygraph Plus, Hansatech, Великобритания) при интенсивности света 1500 мкмоль фотон $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, температуре 23°C и 10 мкг/мл Хл. Активность ФСII определяли в присутствии 0,125 мМ 2,6-дихлорбензохинона (ДХБХ). Скорость переноса электронов от H_2O или восстановленного дихлорфенол-индофенола (DCPIP- H_2) к

метилвиологену определяли по скорости поглощения O_2 (Curtis et al., 1975). Скорость выделения O_2 частицами ВВУ измеряли в присутствии искусственного акцептора электронов DCBQ (200 мкМ). *Регистрацию изменений скорости фотоиндуцированного переноса электронов в частицах ВВУ* ФСII проводили с помощью спектрофотометра SPECORD UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия), как описано в работе (Ловягина и др., 2022).

Определение содержания малонового диальдегида (МДА) и пигментов определяли количественно в соответствии с методом, описанным Харагучи и соавторами (Харагучи и др., 1997). Хлоропласты обрабатывали КЛ, как описано в выше. После этого контрольные образцы и образцы, обработанные КЛ, освещали в течение 5 минут под PPFD со скоростью 100 мкмоль фотонов $m^{-2}s^{-1}$, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,0) до концентрации 1 мг Хл/мл. 0,5 мл гомогената смешивали с 2 мл 0,25% тиобарбитуровой кислоты в 10% трихлоруксусной кислоте. Смесь инкубировали на водяной бане при 95°C в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 8000×g в течение 15 мин. Поглощение супернатанта регистрировали при 532 и 600 нм. Концентрацию МДА рассчитывали с коэффициента экстинкции 155 $mM^{-1}cm^{-1}$.

Для исследования морфологии и рельефа поверхности хлоропластов *использовали метод атомно-силовая микроскопия*: Структурную целостность хлоропластов поддерживали фиксацией в 0,5%-ном глутаральдегиде (Ted Pella) в течение 1 ч, затем объект промывали 4 раза дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Изображения получали с помощью АСМ-комплекса NTEGRA SPECTRA (NT-MDT Co., РФ) и программы регистрации Nova (NT-MDT Co., РФ). Измерения проводились в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG 10-A, средний коэффициент упругости которых составлял 11,8 Н/м, а радиус кривизны наконечника - 10 нм. Размер сканируемого изображения составлял 20х20 мкм или 5х5 мкм (256 × 256 точек); частота сканирования - 0,5-1 Гц.

С помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) исследовали вязкость мембран хлоропластов. В качестве спин-зонда использовали 16-доксилстеариновую кислоту, аналог спин-меченой стеариновой кислоты (Sigma, St. Louis, MO, USA), которая встраивается в липидного бисля мембраны и позволяет на расстоянии 2,2 нм от ее поверхности регистрировать изменения упорядоченности молекул фосфолипидов (Schreier-Muccillo et al., 1976). Суспензию хлоропластов, обработанных пестицидом (до 2,8 мг Хл/мл) инкубировали с 0,1 мМ 16-доксилстеариновой кислоты. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ЭПР РЭ 1308 (РФ) при 23-24°C и напряженности магнитного поля, СВЧ-мощности и постоянной

времени: 3338 Гс, 22 мВт и 0,1 с, соответственно. Время вращательной корреляции спин-метки (τ), являющееся мерой вязкости мембраны, рассчитывали, как описано ранее (Паршина Е.Ю., и др., 2004).

Статистический анализ: Значимые различия определялись с помощью одностороннего ANOVA, а средние значения анализировались с помощью теста Тьюки. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

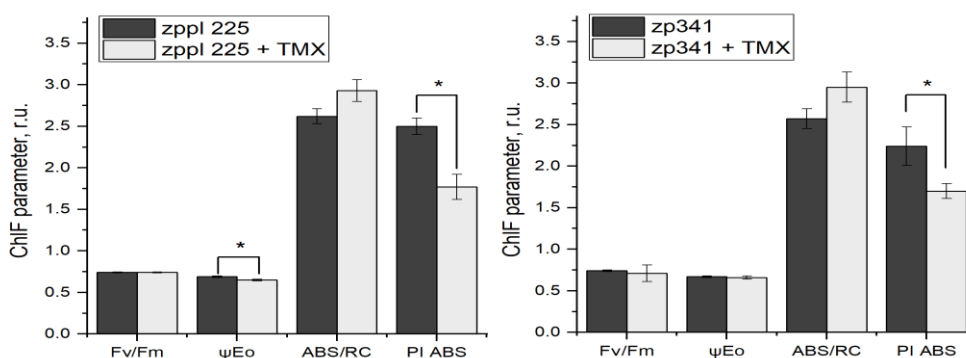
1. Изучение изменения содержания и функционального состояния пигментов листа кукурузы при действии пестицида (тиаметоксам)

В данной разделе представлены результаты серии экспериментов, проведенных на целых листьях двух различных генотипов кукурузы (zpp1 225 и zp 341) после воздействия пестицида тиаметоксама (ТМХ) при двух вариантах внесения пестицида: через внешнее опрыскивание листа и при внесении в почву с помощью прикорневого полива. В первом варианте эксперимента, после появления 3-го настоящего листа (длина более 4 см) листья растения опрыскивали раствором ТМХ в концентрации 0,2 мг/л. Во втором варианте эксперимента, внесения пестицида ТМХ на лист растения производился с помощью прикорневого полива (концентрация 0,2 мг/л в почве). Все измерения проводили при достижении растением фазы 5-го настоящего листа (12 –14 см). В качестве контроля использовали растения, выращенные в аналогичных условиях без опрыскивания или прикорневого полива ТМХ. Измерения проводили при достижении 5-м настоящим листом размера 12 –14 см. При опрыскивании ТМХ листьев установлено, что в фазу 5-го настоящего листа у инбредной линии zpp1 225 содержание хлорофиллов в присутствии ТМХ снижалось с 0,74 до 0,61 мг/г: количество хлорофилла *a* уменьшилось на 17 %, хлорофилла *b* — на 24 %. Напротив, в листьях гибрида zp 341 при воздействии ТМХ через опрыскивание изменений в пигментном составе не обнаружено. В случае с прикорневой обработкой растений ТМХ выявлено незначимое увеличение хлорофиллов и небольшое уменьшение каротиноидов.

ОЖР-кривые у контрольных и обработанных ТМХ листьев путем опрыскивания или прикорневого полива имели типичный вид кривых с характерными фазами O-J, J-I и I-P, которые отражали процессы последовательного восстановления переносчиков в электрон-транспортной цепи фотосинтеза (ЭТЦ) между двумя фотосистемами.

ОЛР-кривые контрольных и обработанных ТМХ листьев анализировали с помощью ЛР-теста (Рис. 2). Предполагается, что величина F_v/F_m коррелирует с максимальным квантовым выходом первичной фотохимической реакции ФСII и используется как показатель эффективности фотосинтеза. Отметим, что в наших экспериментах различий между контрольными и обработанными ТМХ листьями через опрыскивание и прикорневой полив двух генотипов кукурузы по величине максимального квантового выхода ФСII F_v/F_m не выявлено (Рис. 2). В отличие от параметра F_v/F_m , индекс производительности PI_{ABS} существенно менялся при воздействии ТМХ. Известно, что PI_{ABS} коррелирует с жизнеспособностью растения и отражает текущее состояние работы ФСА в условиях стресса. PI_{ABS} является показателем, который включает в себя три независимых параметра: общую долю активных, реакционных центров (РЦ) (ABS/RC), вероятность разделения зарядов в ФСII (F_v/F_m), эффективность переноса электронов за пределы Q_A (ψ_{Eo}). Сравнение PI_{ABS} в контроле и при воздействии ТМХ через опрыскивание выявило статистически значимые ($p < 0,05$) различия: в листьях у образцов zppl 225 и zp 341, обработанных ТМХ, параметр PI_{ABS} снижался соответственно на 29 и 24 %.

А). Опрыскивание листа ТМХ



Б). Прикорневой полив растения ТМХ

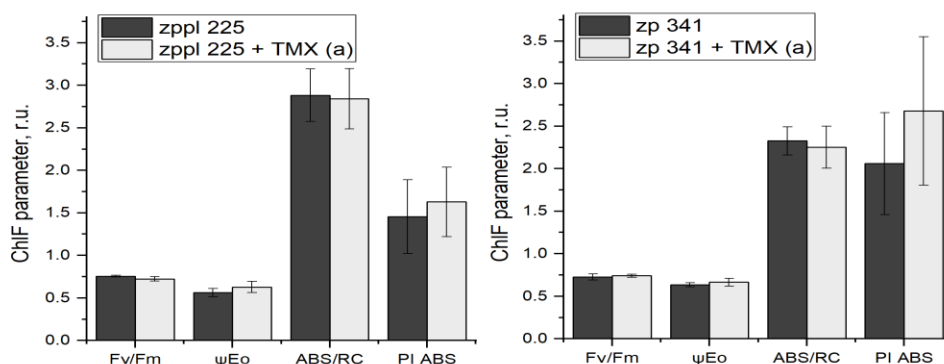


Рис. 2. Параметры JIP-теста листьев *Z. mays* инбредной (zpr1 225) и гибридной (zр 341) линий при обработке ТМХ путем опрыскивания (А) и прикорневого полива (Б). $n = 5$ для каждого образца.

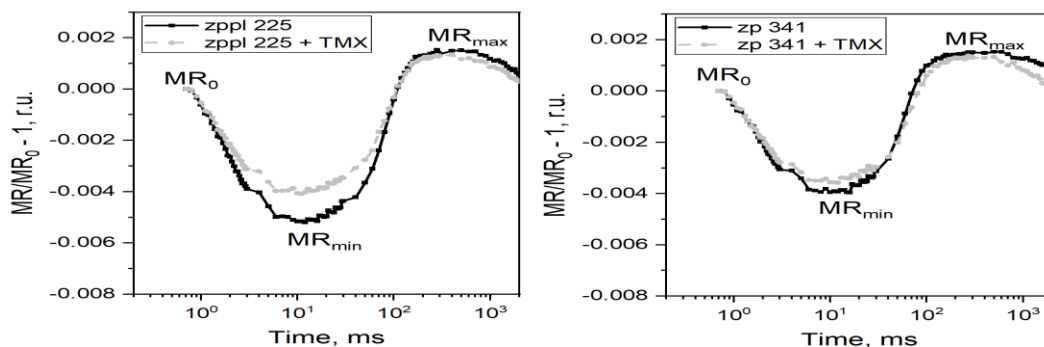
Отметим, что в присутствии ТМХ, снижение PI_{ABS} в листьях zpr1 225 обусловлено уменьшением эффективности электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII (ψ_{E_0}), а в листьях zр 341 – с незначительным уменьшением доли активных РЦ (увеличение ABS/RC) и фотохимии ФСII (F_V/F_M). В то же время, при обработке растений с помощью прикорневого полива выявлено незначимое увеличение PI_{ABS} в листьях двух генотипов, что свидетельствует, вероятно, о некотором увеличении продуктивности растений при обработке ТМХ через прикорневой полив.

Окислительно-восстановительные превращения реакционных центров молекул ФСI (P700) в присутствии ТМХ контролировали, регистрируя поглощение света при $\lambda = 820$ нм (MR) (Рис. 3). Известно, что кинетика светозависимого уменьшения амплитуды сигнала MR в первые 15-20 мс отражает процесс окисления P700 (быстрая фаза) и достигает минимума при ~ 20 мс (MRmin). MRmin — переходное устойчивое состояние с равными скоростями окисления и ре-восстановления P700. При больших временах, скорость восстановления преобладает над скоростью окисления за счет поступления электронов от ФСII, снижая величины поглощения при $\lambda = 820$ нм и росту сигнала MR (медленная фаза) до максимума при ~ 200 мс (MRmax). В присутствии ТМХ, внесенного через опрыскивание, в листьях кукурузы инбредной линии zpr1 225 и гибрида zр 341 были выявлены изменения в окислительно-восстановительных превращениях P700 (Рис. 2). Отметим, что в листьях zpr1 225 при воздействии ТМХ обнаружены изменения амплитуды MR, в частности в уменьшение сигнала при 20 мс (MRmin), обусловленные снижением потока электронов от и к ФСI. (Рис. 3 А). Напротив, в условиях опрыскивания, действию ТМХ на РЦ ФСI листьев гибрида zр 341 характеризовался некоторой устойчивостью (отсутствие значимых изменений в MR кинетике) (Рис. 3).

Известно, что молекулы каротиноидов входят в состав и регулируют активность комплекса ФСII. В спектрах комбинационного рассеяния (КР) листьев кукурузы были выявлены характерные максимумы КР-спектра каротиноидов, обусловленные электронно-валентными колебаниями в структуре молекулы (Рис. 4). Известно, что максимум КР-спектра - 1520 см^{-1} обусловлен колебаниями двойных связей углерода, максимум 1160 см^{-1} - колебаниями одинарных связей углерода в полиеновой цепи, а максимум КР- спектра 1006 см^{-1} обусловлен валентными колебаниями одинарных связей углерода в метильном радикале молекулы. После опрыскивания листа ТМХ, соотношение

полос I_{1520}/I_{1160} КР- спектра каротиноидов листа *zprl 225* уменьшилось, а в листьях *zr 341* увеличилось, что, вероятно, свидетельствует о различных конформациях молекулы каротиноидов у различных генотипов.

А). Опрыскивание листа ТМХ



Б). Прикорневой полив растения ТМХ

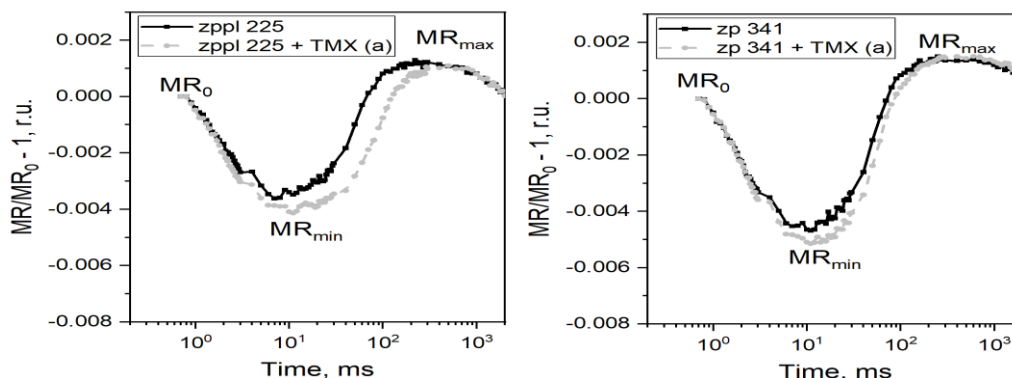


Рис. 3. Светоиндуцированные кинетики модулированного отражения при $\lambda = 820$ нм (MR) у листьев кукурузы (*Zea mays* L.) инбредной линии *zprl 225* и гибрида *zr 341* (В, Г) в контроле и при опрыскивании (А) и при прикорневом поливе (Б) тиаметоксамом. Кинетики MR нормированы и представлены в виде $MR/MR_0 - 1$, где MR_0 — интенсивность сигнала при 0,7

Отметим, что аналогичных изменений конформации молекулы каротиноидов в листе при корневом орошении растения ТМХ нами не обнаружено. Несмотря на то, что в листьях инбредной линии *zprl 225* содержание хлорофилла меньше, чем *zr 341*, изменений в составе пигментов в листьях *zr 341* при действии ТМХ не обнаружены. Представленные результаты свидетельствуют о различной чувствительности к действию ТМХ фотосинтетического аппарата растения с различным генотипом. При воздействии ТМХ (внесенного через прикорневой полив растения), при исследовании кинетики MR выявлено, что Р700 двух генотипов окисляется, однако, существуют различия в скорости его последующего восстановления, причем более выраженные в листьях *zprl 225* (Рис. 3 Б).

Итак, опрыскивание листа ТМХ сопровождается снижением содержания хлорофилла в листьях инбредной линии *zpr1 225* (по сравнению с гибридом *zр 341*), пула акцепторов на акцепторной стороне фотосистемы I (ФС1) и изменением конформации («расширением») молекулы каротиноида (по сравнению с «сжатием» молекулы каротиноида у гибрида *zр 341*).

А) Опрыскивание листа ТМХ

Б) Прикорневой полив растения ТМХ

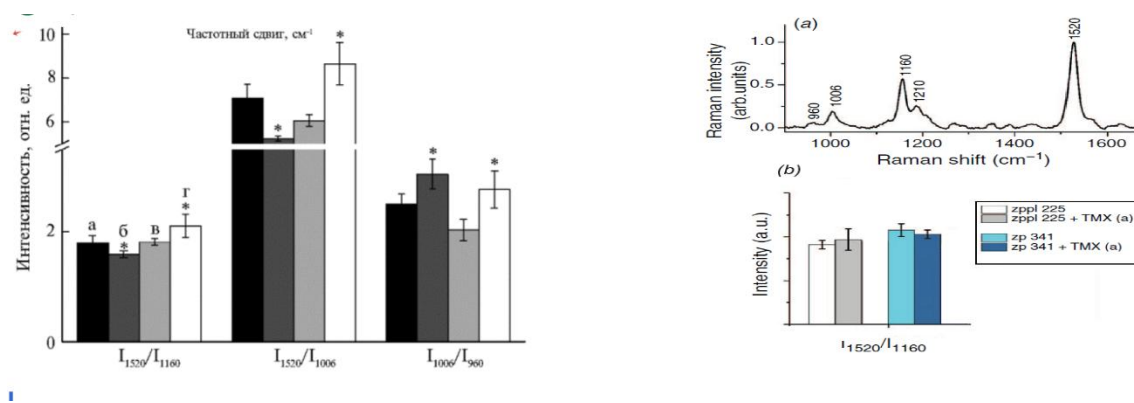


Рис. 4. Изменение спектров комбинационного рассеивания (КР) каротиноидов в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) двух генотипов при опрыскивании (А) и прикорневом поливе (Б) пестицидом ТМХ. А.: а — инбредная линия *zpr1 225*, б — *zpr1 225 + ТМХ*, в — гибриды *zр 341*, г — гибриды *zр 341 + ТМХ*. Звездочкой обозначены статистически значимые различия (p < 0,05).

2. Изучение изменений фотосинтетического аппарата и морфологии хлоропластов при действии пестицида (клотианидина)

2.1. Действие КЛ на скорость электронного транспорта в хлоропластах

Известно, что при опрыскивании листьев высших растений пестицидом, в течение 20 минут молекула ТМХ метаболизируется до клотианидина (КЛ) (Nauen et al., 2003). В связи с этим, для исследования действия НИ на фотосинтетический аппарата *in vitro* мы исследовали действие КЛ. Действие КЛ на электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) изолированных хлоропластов гороха исследовали в отсутствии освещения («темновые» условия), снижая вероятность окислительного стресса и активации фотозащитных механизмов. Эффективность функционирования ЭТЦ от H₂O до MV, который переносит электроны от ФС1 на молекулярный O₂, контролировали по скорости поглощения O₂ (Табл. 1, Рис. 5).

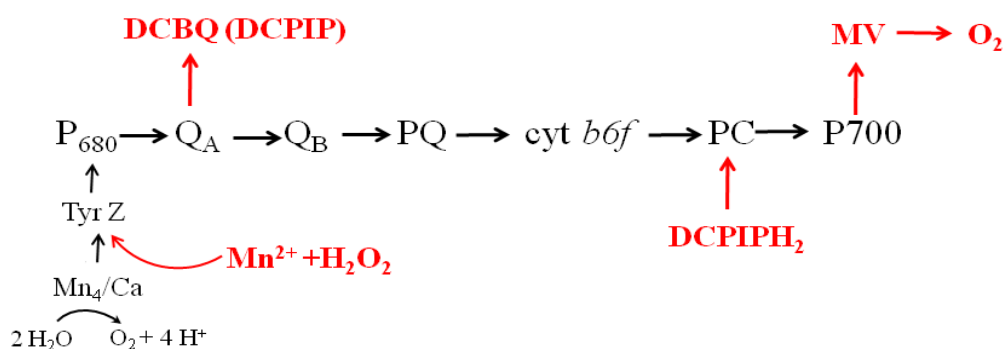


Рис. 5. Схема с указанием мест взаимодействия акцепторов и доноров электронов с ЭТЦ. Транспорт электронов в ЭТЦ: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCBQ}$, $\text{DCPIPH}_2 \rightarrow \text{MV}$, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$, $\text{Mn} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{DCPIP}$

Установлено, что при низких концентрациях КЛ не влиял на выделение O_2 , но увеличение концентрации до 110 мкг/л приводило к снижению скорости поглощения O_2 на 28%, по сравнению с контролем (Табл. 1). При исследовании участка ЭТЦ, в котором происходят нарушения при действии КЛ (в присутствии акцептора электронов DCBQ) было обнаружено, что выделение O_2 , связанное с активностью ФСII, снижалось на 24% (Рис. 5). В тоже время, выделение O_2 , связанного с активностью ФСI (в присутствии донора электронов DCPIPH₂) не обнаружено, что, вероятно, свидетельствует об изменении функционирования ЭТЦ в присутствии КЛ за счет нарушений электронного транспорта в ФСII.

Таблица 1. Изменения скорости выделения и поглощения O_2 в хлоропластах в присутствии КЛ

обработка	O_2 выделение (DCBQ)	O_2 поглощение ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$)	O_2 поглощение (DCPIPH ₂ → MV)
контроль	224 ± 17	206 ± 19	668 ± 27
22 мкг/лЛ КЛ	217 ± 21	175 ± 23	669 ± 20
110 мкг/лЛ КЛ	170 ± 20*	149 ± 19*	655 ± 15

Скорость выделения и поглощения O_2 представлены в мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ч⁻¹.

*Статистически значимый результат, $p < 0,05$.

Поскольку функционирование ФСII зависит от состояния донорной и акцепторной области, исследовали действие КЛ на активность ФСII в КВК частицах содержащих функционально активный марганцевый кластер (ФСII+Mn) и комплексов не содержащие КВК для которых в качестве доноров электронов использовали $\text{Mn} + \text{H}_2\text{O}_2$ (Табл. 2). В присутствии 0,11 мг/л КЛ и DCBQ скорость выделения O_2 в препаратах ФСII+Mn снижалась

на 20%, что согласуется с данными, полученными на хлоропластах (Табл.1). Так как скорость фотозависимого восстановления акцептора DCPIP в мембранах ФСII+Mn и ФСII-Mn в присутствии КЛ менялась аналогично, вероятно, КЛ не влияет непосредственно на функционирование КВК ФСII.

Таблица 2. Исследование действия КЛ (110 мкг/л КЛ) на скорость выделения O₂ и скорость восстановления DCPIP в мембранах ФСII+Mn и ФСII-Mn

Обработка	O ₂ выделение, % (DCBQ)	DCPIP, %
ФСII+Mn	100±4.9	100±3.4
(ФСII+Mn) + 110 мкг/л КЛ	80±5.2*	76±4.7*
ФСII-Mn	–	100±7.6
(ФСII-Mn) + 110 мкг/л КЛ	–	78±5.3*

Скорость выделения O₂ в мембранах ФСII+Mn составляла 450±22 мкмоль O₂ (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹. Скорость восстановления DCPIP в мембранах ФСII+Mn и ФСII-Mn составила 145 ± 5 и 105 ± 8 мкмоль DCPIP (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹ соответственно. * p < 0,05.

2.2. Кинетика световой индукции флуоресценции при действии КЛ

Для анализа действия КЛ на функционирование ЭТЦ в хлоропластах анализировали ОJIP-зависимости хлоропластов (рис. 6). Известно, что ОJIP-зависимость представляет собой график с четко выраженными тремя фазами изменения флуоресценции (OJ, JI и IP). Обработка хлоропластов КЛ приводила к значительному увеличению фазы OJ, но не влияла на минимальный (O) и максимальный (P) уровни флуоресценции. Известно, что амплитуда фазы OJ характеризует долю закрытых РЦ ФСII и соответствует параметру JIP теста - V_j (Рис.6, Табл.3).

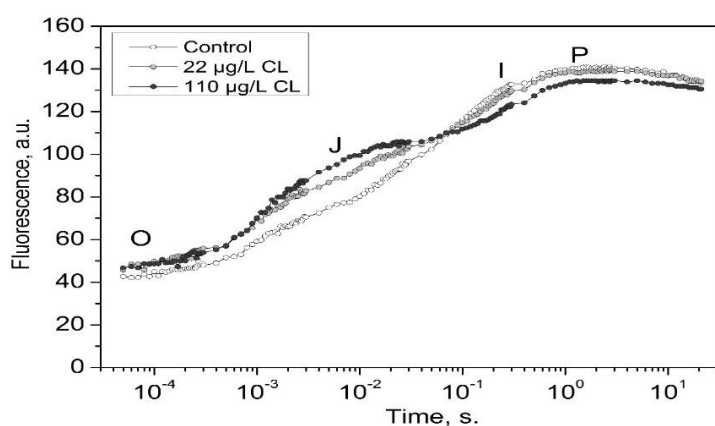


Рис. 2. Зависимости индукции флуоресценции хлоропласты гороха в присутствии КЛ (22 и 110 мкг/л).

Таблица 3. Параметры JIP-теста, рассчитанные по результатам ОJIP (Рис. 6).

Параметры	Контроль	22 мкг/л КЛ	110 мкг/л КЛ
V_j	0.246±0.02	0.342±0.03*	0.410±0.01*
M_0	0.062±0.03	0.343±0.02*	0.358±0.08*
Ret	3.06±0.15	1.93±0.23*	1.44±0.06*
F_v/F_0	1.48±0.13	1.50±0.18	1.40±0.04
F_v/F_m	0.69±0.02	0.67±0.03	0.65±0.04

* Статистически значимый результат, $p < 0.05$

В присутствии КЛ (22 и 110 мкг/л КЛ) амплитуда фазы OJ (V_j) в хлоропластах увеличивалась на 39 и 67% скорость накопления закрытых РЦ (M_0 – скорость восстановления Q_A) увеличивалась более чем в 5, а эффективность транспорта электронов (параметр Ret), т.е. вероятность переноса электронов из Q_A в пул PQ, снижалась на 37% и 53%, соответственно. При этом максимальная эффективность преобразования энергии в ФСII (F_v/F_m) не менялась. Аналогичный результат был получен в присутствии DCMU, который ингибирует транспорт электронов от Q_A к Q_B , но не вызывает снижения F_v/F_m по сравнению с контролем (Henrysson, Sundby, 1990). В присутствии КЛ отношение F_v/F_0 хлоропластов не изменялось, что согласуется с данными, полученными на мембранах ФСII (Табл. 2).

В следующей серии экспериментов исследовали механизм миграции электронов на акцепторной стороне ФСII при действии КЛ, регистрируя кинетику темнового затухания флуоресценции, которая коррелирует с скоростью реокисления Q_A и характеризуется тремя экспонентами (Vass et al. 1999) (Рис. 7, Табл. 4). В контроле, у большинства РЦ (64%, A1) перенос электронов от Q_A^- к Q_B происходит за 0.647 мс ($\tau_{1/2}$, 1), свидетельствуя об эффективном транспорте электронов на акцепторной стороне ФСII, у 23% центров (A2) ФСII реокисление Q_A^- происходит за время 19.5 мс ($\tau_{1/2}$, 2), а у 13% центров ФСII (A3) окисление Q_A^- (за счет рекомбинации между Q_A и S2 состоянием КВК) происходит за 1709 мс ($\tau_{1/2}$, 3), что свидетельствует об отсутствии у реакционных центров способности осуществлять прямой перенос электронов.

2.3 Кинетики темнового затухания флуоресценции при действии КЛ

В присутствии КЛ, прямой перенос электронов от Q_A^- к Q_B замедлялся на 51% ($\tau_{1/2}$, A1), а доля РЦ ФСII, способных осуществлять эту реакцию уменьшалась на 20% (A1, табл. 4). Доля центров ФСII с незаполненным сайтом связывания Q_B увеличилась на 26% ($\tau_{1/2}$, 2), а скорость окисления Q_A снизилась на 64%, вероятно, за счет уменьшения скорости связывания пластохинона с сайтом Q_B в ФСII. Количество центров, способных к реакциям рекомбинации

с донорной стороны ФСII, увеличилась на 39% ($\tau_{1/2}$, 3).

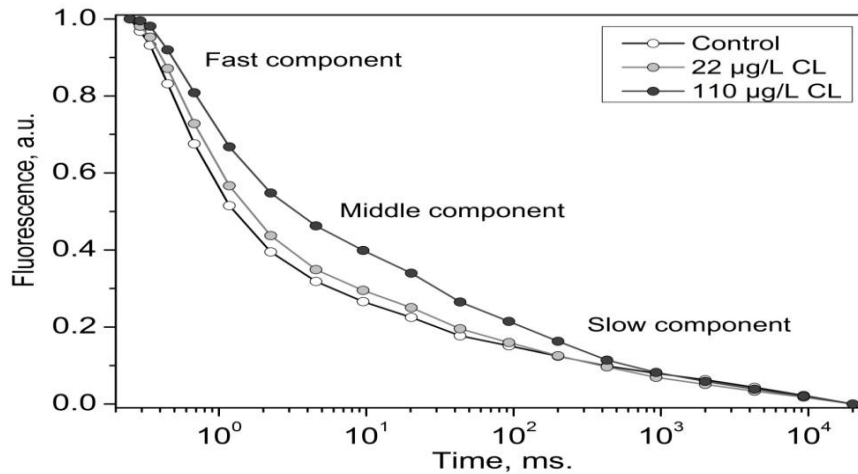


Рис. 7. Действие КЛ (22 мкг/л и 110 мкг/л) на кинетику затухания переменной флуоресценции в хлоропластах гороха.

2.4. Кинетика индукции замедленной флуоресценции хлоропластов при действии КЛ

В следующей серии, для исследования вклада процессов, формирующих энергизации и формированию ΔpH на тилакоидной мембране хлоропластов регистрировали кинетику замедленной флуоресценции (ЗФ) (Kalaji et al. 2012). В контроле, у быстрой фазы ЗФ длительность (время появления пиков при регистрации) максимумов I_1 и I_2 выявлено при 3,6 мс и 13,6 см, соответственно (Рис. 8а). Обычно, медленная фаза ЗФ наблюдается через 1с после освещения, но в наших экспериментах (интенсивность возбуждающего света составляла $4000 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) эта фаза обнаружена не была, что связано, вероятно, с быстрым перевосстановлением ЭТЦ и, как следствие, со снижением интенсивности ЗФ (Kalaji et al. 2012). В связи с этим, в наших экспериментах с КЛ, ЗФ измеряли в присутствии акцептора электронов DCBQ (Рис. 8, б). При инкубации хлоропластов в присутствии 110 мкг/л КЛ амплитуда быстрой и медленной фазы ЗФ уменьшались на 30% и 26% соответственно (Рис. 8 а,б). Поскольку инкубация хлоропластов с пестицидом не влияла на максимальную эффективность преобразования энергии в ФСII (F_v/F_m , Табл. 3), снижение ΔpH и процесса энергизации мембраны, вероятно, обусловлено негативным действием КЛ на морфологию и липидный бислой хлоропластов.

Таблица 4. Изменения константы времени и амплитуды кинетики затухания переменной флуоресценции в контроле и хлоропластах, обработанных 22 или 110 мкг/л КЛ

Условия	Быстрая компонента		Средняя компонента		Медленная компонента	
	A ₁₀ (%)	τ _{1/2,1} (ms)	A ₂ (%)	τ _{1/2,2} (ms)	A ₃ (%)	τ _{1/2,3} (ms)
1. контроль	64±2	0.647±0.05	23±2	19.5±4.5	13±1	1709±586
2. 22 мкг/л КЛ	62±3	0.785±0.06	23±2	22.6±5.1	14±1	973±284
2. 110 мкг/л КЛ	52±2	0.978±0.09	29±2	31.9±7.0	18±2	1051±303

Обычно, нарушения электронного транспорта в хлоропластах сопровождаются генерацией активных форм кислорода (продукции АФК) (Pinnola, Bassi, 2018). Для того, чтобы выявить изменения АФК при инкубации хлоропластов в присутствии КЛ, определяли содержание МДА после 5-минутного освещения (100 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹) хлоропластов. Установлено, что концентрация МДА возрастала на 46% в хлоропластах, обработанных 110 мкг/л СЛ, по сравнению с контролем (Таблица 5).

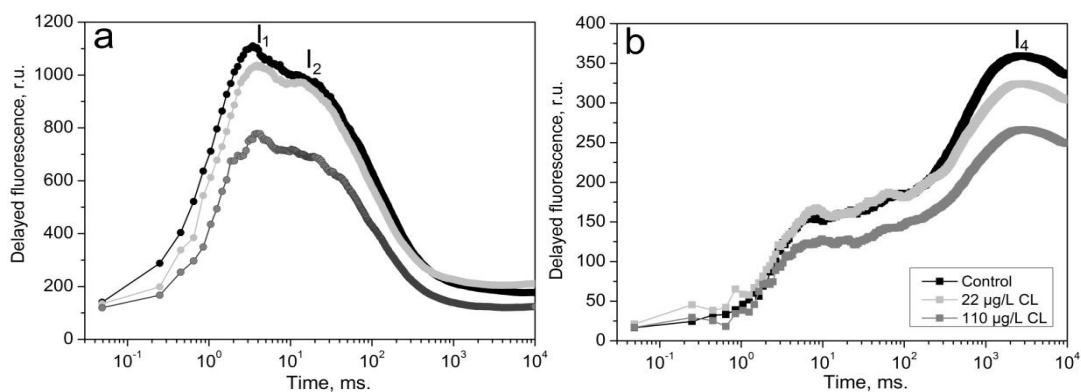


Рис. 8. Исследование действия КЛ на кинетику замедленной ФХ контрольных и обработанных хлоропластах в отсутствие (а) и присутствии 0.125 мМ DCBQ (б).

2.5. Изменение морфологии хлоропластов при действии КЛ

В связи с описанными выше молекулярными изменениями пигментов и увеличения содержания АФК в хлоропластах в присутствии КЛ мы исследовали изменения их морфологии этой субклеточной структуры. С помощью атомно-силовой микроскопии установлено, что в норме, хлоропласты имеют дисковидную форму, а рельеф поверхности мембраны определяется глобулярными

структурами, связанными с гранами хлоропластов (Chuartzman et al. 2008) (Рис. 9в, г).

Таблица 5. Исследование действия КЛ на параметры спектров ЭПР спин-меток 16-DS(τ) и содержание МДА

Условия	$\tau \times 10^9$ (с)	MDA (пмоль г^{-1} сухого веса)
Контроль	1.78 ± 0.03	1.3 ± 0.02
110 мкг/л КЛ	$1.57 \pm 0.01^*$	$1.9 \pm 0.06^*$

*Статистически значимый результат, $p < 0,05$.

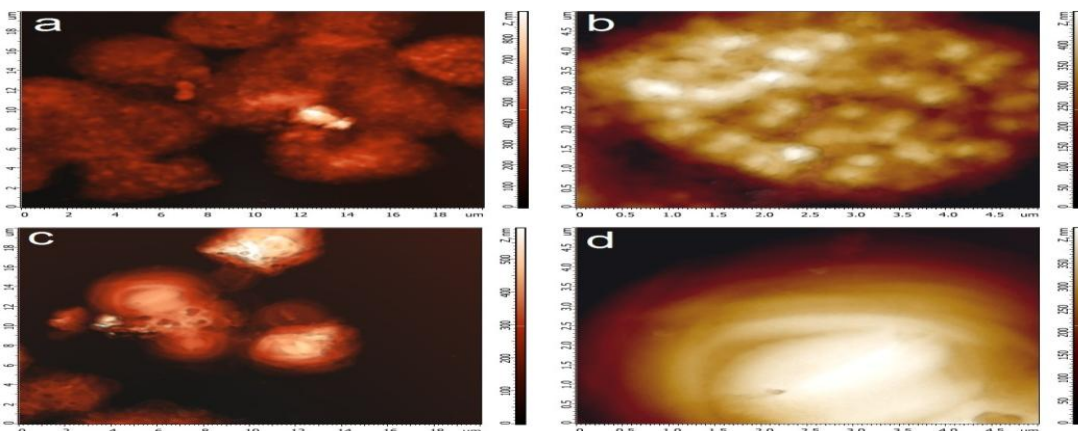


Рис. 9. АСМ-изображения хлоропласта - контроль (а, б) и хлоропласта, обработанного 110 мкг/л КЛ (с, д)

Обработка хлоропластов КЛ существенно изменяла морфологию хлоропластов: 57% хлоропластов приобретали сферическую форму, а рельеф поверхности мембраны хлоропласта не был выявлен. Вероятно, подобные изменения рельефа поверхности мембраны хлоропласта связаны с разрушением части тилакоидных мембран и гранов хлоропластов (Chuartzman et al., 2008). Изменение морфологии хлоропластов в присутствии КЛ сопровождаются изменениями вязкости мембран. С помощью ЭПР спектроскопии установлено, что величина τ спин-меченого 16-ДС в мембране хлоропласта снижается на 12%, что свидетельствует об уменьшении вязкости мембраны (упорядоченность расположения «хвостов» жирных кислот фосфолипидов) (Таблица 5).

Заключение

В данной работе представлены результаты исследования, проведенного на листьях двух различных генотипов кукурузы (zrpl 225 и zr 341) после воздействия пестицидом (ТМХ,

внешнее опрыскивания листа или при внесении в почву за счет прикорневого полива растения) и на хлоропласты (КЛ). При действии ТМХ непосредственно на лист $P_{I_{ABS}}$ и содержание хлорофилла существенно уменьшается (особенно для zprl 225), что, вероятно, свидетельствует о снижении синтеза хлорофилла в пользу увеличения синтеза каротиноидов. Отметим, что различий в величинах максимального квантового выхода ФСII (F_v/F_m) у контрольных и обработанных тиаметоксамом листьев в условиях их опрыскивания или после введения ТМХ путем прикорневого полива у обоих видов кукурузы нами не выявлено. Анализ кинетики ЗФ, связанной с окислительно-восстановительным состоянием P700, при опрыскивании листьев ТМХ, свидетельствует об уменьшении образования окисленных и увеличении - восстановленных форм акцепторов ФСI (P700) только листьев zprl 225. Вероятно, это связано с уменьшением пула акцепторов, таких как P700, на акцепторной стороне ФСI, что не происходит РЦ ФСI листьев гибрида zр 341. Это предположение подтверждает еще и тот факт, что после действия ТМХ конформация молекулы каротиноидов в листе zprl 225 и zр 341 противоположны вероятно, свидетельствует о различном механизме устойчивости растений к воздействию ТМХ.

В связи с задачами, нами было проведено исследование влияния КЛ (производного ТМХ) не только на функционирование фотосинтетических процессов (Pinnola, Bassi 2018), но и на структуру (Chuartzman et al. 2008), а также вязкость мембраны хлоропласта (Tardy, Navaux 1997). Установлено, что в хлоропластах, обработанных КЛ, уменьшается поток электронов, что сопровождается снижением выделения O_2 (Табл. 1). Это, вероятно, происходит за счет уменьшения числа РЦ, способных к реокислению Q_A , а также увеличения доли РЦ с незаполненным сайтом связывания Q_B (Рис. 6, табл. 4). Поскольку перенос электронов в ФСII зависит от локализации переносчиков электронов и их ред/окс-потенциалом, мы исследовали причины возможного изменения транспорта электронов при действии КЛ на хлоропласты. Известно, что ТМХ – пестицид, сходный по структуре с КЛ, и способен связываться с белками за счет водородных, электростатических и гидрофобных связей. (Su et al., 2021). Вероятно, и КЛ способен за счет аналогичных взаимодействий связываться с гидрофобными и/или полярными аминокислотами в сайте Q_B белка D_1 (Battaglino et al., 2021), конкурируя за сайт связывания с пластохиноном. Это предположение согласуется с нашими результатами, свидетельствующими о появлении Q_B -центров, со свойствами аналогичными, возникающими при действии DCMU (Рис. 6 - 8, Табл. 3). Действительно, DCMU (занимает сайт связывания Q_B) может блокировать прямой перенос электронов от Q_A без изменения F_v/F_m . (Henrysson and Sundby 1990). Отметим, что при действии КЛ меняется морфология хлоропластов, вероятно, за счет нарушения

гранулярных структур в области тилакоидной мембраны, где в основном и локализован ФСII. Возможно, эти процессы вызывают конформационные изменения белка D_1 и, как следствие, модификацию сайта Q_B . Таким образом, изменения в функционировании ЭТЦ, вероятно, в основном зависят от состояния сайта Q_B , поскольку скорость потока электронов от H_2O к MV и активность ФСII (Табл. 1) под действием КЛ менялись аналогично. Вероятно, что нарушения процесса переноса электронов между Q_A и Q_B инициирует обратный перенос электронов и рекомбинацию заряда с генерацией триплетного состояния хлорофилла (Rutherford et al. 2012). Известно, что этот процесс, как правило, коррелирует с увеличением количества маркеров окислительного стресса (например, малоновый диальдегид) (Mahapatra et al., 2019; Shahid et al., 2021), свидетельствуя об образовании активных форм кислорода (АФК) (Touzout et al., 2021). Данные, полученные с помощью АСМ и ЭПР (Рис. 9), свидетельствуют как об изменении морфологии хлоропласта, как и о нарушении рельефа поверхности и вязкости тилакоидной мембраны, что, вероятно, инициирует выход протонов через мембрану хлоропластов. Итак, действие КЛ на хлоропласты меняет транспорт электронов за счет либо сайта Q_B , либо ФСII из-за структурных изменений тилакоидной мембраны.

Выводы

- 1) Установлено, что обработка растения пестицидом тиаметоксамом (ТМХ), как при опрыскивании листа, так и с помощью прикорневого полива растения, меняет функциональную активность фотосистемы II (ФСII) (PI_{ABS}), но не влияет на максимальный квантовый выход ФСII (F_V/F_M) листа как у инбредной линии *zpr1 225*, так и у гибрида *zr 341*.
- 2) При опрыскивании листа ТМХ, снижение PI_{ABS} в листьях двух генотипов кукурузы обусловлено уменьшением эффективности электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII (ψ_{E0}).
- 3) При опрыскивании листьев ТМХ двух генотипов кукурузы (*zpr1 225* и *zr 341*) выявлены характерные различия: снижение содержания хлорофилла в листьях инбредной линии *zpr1 225* по сравнению с гибридом *zr 341*; в листьях *zpr1 225* обнаружено снижение потока электронов в ЭТЦ от и к ФСI, и противоположные изменения конформации молекул каротиноидов по сравнению с *zr 341*.
- 4) Установлено, что в хлоропластах, обработанных КЛ (22 и 110 мкг/мл КЛ), в присутствии DCBQ количество РЦ ФСII, способных осуществлять реакцию переноса с Q_A на Q_B уменьшилось на 23 и 26%, а скорость реакции снижалась на 64% и 52% соответственно, что аналогично процессу блокирования переноса электронов между

Q_A и DCBQ.

- 5) Установлено, что инкубация с КЛ функционально активных частиц ФСII (частиц, способных и не способных к образованию O₂) с 110 мкг/мл КЛ снижает скорость выделения O₂ на 20%, что согласуется с данными, полученными на ФСII целых хлоропластов. В препаратах обоих типов частиц ФСII скорость восстановления акцептора электронов DCPIP в присутствии КЛ уменьшается.
- 6) Нарушение процесса переноса электронов между Q_A и Q_B повышает вероятность «триплет- триплетного» перехода электрона с хлорофилла на молекулу кислорода, что сопровождается увеличением количества маркеров окислительного стресса, (малоновый диальдегид) (Rutherford et al. 2012). Установлено, что после 3 мин освещения (100 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹) содержание МДА в хлоропластах, обработанных 110 мкг/л КЛ, увеличивается на 46% по сравнению с контролем.
- 7) С помощью метода атомно-силовой микроскопии установлено, что в контроле, хлоропласты обладают типичной дисковидной формой, а рельеф мембраны обусловлен наличием глобулярных структур. Действию на хлоропласты 110 мкг/л КЛ существенно меняет морфологию хлоропласта: 57% обладали дисковидной формой, а рельеф поверхности мембраны отсутствовал, вероятно, за счет разрушения части тилакоидных мембран (Chuartzman et al., 2008).
- 8) С помощью метода ЭПР-спектроскопии выявлены изменения вязкости мембран хлоропластов при действии 110 мкг/л КЛ: параметр τ уменьшался на 12%, что свидетельствует о снижении упорядоченности распределения «хвостов» жирных кислот фосфолипидов липидного бислоя мембраны хлоропласта.

Основные публикации Хао по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах / вклад автора в печатных листах).

1. Тодоренко Д.А., Слатинская О.В., **Хао J.**, Сейфуллина Н.Х., Radenović Ć.N., Маторин Д.Н., Максимов Г.В. Фотосинтетические пигменты и фотохимическая активность фотосинтетического аппарата листьев кукурузы (*Zea mays* L.) под влиянием тиаметоксама // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, № 1. – С. 66-76. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.1.66rus (SJR 0.164, 0.688/ 0.172 п.л.)

2. Todorenko Daria A., **Hao Jingrao**, Slatinskaya Olga V., Allakhverdiev Elvin S., Khabatova Venera V., Ivanov Aleksey D., Radenovic Cedomir N., Matorin Dmitry N., Alwasel Saleh, Maksimov Georgy V., Allakhverdiev Suleyman I. Effect of thiamethoxam on photosynthetic pigments and primary photosynthetic reactions in two maize genotypes (*Zea mays* L.) // *Functional Plant Biology*. – 2021. – Vol. 48, No. 10. – P. 994-1004. DOI: 10.1071/FP21134 (**SJR 0.652, 0.688/ 0.229 п.л.**).
3. Radenovich C.N., Максимов Г.В., Шутова В.В., **НАО J.**, Delich N.S., Sechansky M.D., Popovich A.S. Использование инфракрасной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния для анализа состояния биомолекул у линий кукурузы *Zea mays* L. // *Сельскохозяйственная биология*. – 2021. – Т. 56, № 5. – С. 948-957. DOI: 10.15389/agrobiology.2021.5.948rus [C.N. Radenovich, G.V. Maksimov, V.V. Shutova, **J. Hao**, N.S. Delich, M.D. Sechansky, A.S. Popovich. Using infrared spectroscopy and Raman spectroscopy to evaluate the conformation of biomolecules in maize (*Zea mays* L.) LINES // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. – 2021. – Vol. 56, No. 5. – P. 948-957. DOI: 10.15389/agrobiology.2021.5.948eng] (**SJR 0.164, 0.625/ 0.125 п.л.**)
4. Radenovic Č.N., Максимов Г.В., Курамшина Г.М., Шутова В.В., **НАО J.**, Delić N.S., Sechanski M.D., Popović A.S., Bajuk-Bogdanović D.V., Radosavljević M.M., Pavlov J.M. Использование метода поверхностного внутреннего отражения для диагностики зерна кукурузы (*Zea mays* L.) // *Сельскохозяйственная биология*. – 2022. – Т. 57, № 5. – С. 933-944. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.5.933rus [Radenović Č.N., Maksimov G.V., Kuramshina G.M., Shutova V.V., **НАО J.**, Delić N.S., Sechanski M.D., Popović A.S., Bajuk-Bogdanović D.V., Radosavljević M.M., Pavlov J.M. Use of internal reflection spectroscopy for maize (*Zea mays* L.) grain diagnosis // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. – 2022. – Vol. 57, No. 5. – P. 933-944. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.5.933eng] (**SJR 0.164, 0.75/ 0.15 п.л.**)
5. Liu W., Shutova V.V., Maksimov G.V., **НАО J.**, He Y. Use of nanostructured silver substrates (coatings) to study the content and conformation of β -carotene // *Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences*. – 2022. – Vol. 101, No. 2. – P. 112-124. DOI: <https://doi.org/10.18698/1812-3368-2022-2-112-124> (**SJR 0.258, 0.813/ 0.163 п.л.**)
6. Volgusheva Alena A., **Hao Jingrao**, He Yanlin, Lovyagina Elena R., Loktyushkin Aleksey V., Parshina Evgenia Yu., Luneva Oksana G., Baizhumanov Adil A., Khruschev Sergei S., Maksimov Georgy V., Rubin Andrew B. Effect of the insecticide clothianidin on the photosynthetic electron transport chain in pea // *Photochemistry and Photobiology*. – 2024. – DOI: <https://doi.org/10.1111/php.14018> (**JIF 2.6, 0.75/ 0.25 п.л.**)