

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*

*Паиковский 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 «17» апреля 2025 г. в 14 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 системе 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 (CO<sub>2</sub>) (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). 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 вызывает изменение вязкости и других функций клеточных и субклеточных мембран (García et al., 2014), а затем приводит к активации защиты, с помощью антиоксидантных ферментов растения (Shahid et al., 2021; Touzout et al., 2021).

В связи со сказанным важным является исследование молекулярных механизмов воздействия НИ на молекулярную структуру и функции фотосинтетического аппарата и пигментов высших растений.

### **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, клотианидина, меняет форму, рельеф поверхности и вязкость мембран хлоропластов за счет увеличения содержания АФК в хлоропластах.

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 zr 341) влияет на фотосинтетический аппарат растения: перенос электронов с  $Q_A^-$  в пул хинонов ( $\psi_{E_0}$ ) и на функциональную активность ФСII ( $PI_{ABS}$ ).

Действие 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, либо за счет уменьшения скорости связывания пластохинона с  $Q_B$ .

Действие пестицида клотианидина на частицы ФСII (способные и не способные к фотозависимому выделению  $O_2$ ) снижает скорость выделения  $O_2$  и восстановления акцептора электронов (как и в целых хлоропластах), свидетельствуя об отсутствии прямого действия пестицида на ФСII.

### **Научная новизна работы**

При изучении действия пестицида КЛ установлена связь между увеличением содержания АФК и изменением формы хлоропластов (с дисковидной на сферическую), рельефа поверхности хлоропласта и уменьшением вязкости мембран хлоропластов. При изучении действия пестицида ТМХ на фотосинтетический аппарат листа кукурузы (варианты внесения пестицида с помощью опрыскивания или прикорневого полива растения) установлено, что изменения на акцепторной стороне ФСII обусловлены снижением переноса электронов от  $Q_A^-$  и функциональной активности ФСII ( $PI_{ABS}$ ) (инбредная линия zpr1 225), а также изменениями конформации молекулы каротиноидов (различных для инбредной линии кукурузы zpr1 225 и гибридной линии zr 341). При изучении 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  $Q_B$  снижается. 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, 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 ФСЦ.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В связи с тем, что неоникотиноидные инсектициды используются в сельском хозяйстве в качестве защитных средств от насекомых (Gupta et al.2008), полученные данные о молекулярных механизмах воздействия НИ (ТМХ, и его производного, КЛ) на молекулярную структуру и функции фотосинтетических пигментов различных генотипов кукурузы могут использоваться в селекции для диагностики состояния растения на фоне воздействия инсектицидов с помощью методов КР- и ИК-спектроскопии, АСМ, ЭПР и переменной флуоресценции хлорофилла («JIP-тест»).

### **Методология и методы исследования**

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 ФСЦ, регистрация выделения и поглощения  $O_2$ ).

### **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 статей<sup>1</sup> в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2.

---

<sup>1</sup> 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  $\beta$ -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.

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 172 страницы, содержит 71 рисунок, 20 таблиц и 213 литературных источников.

## **Основное содержание работы**

### **Введение**

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

### **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, JIP-тест, SERS 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 zр 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 (zр 341) линий (Институт кукурузы «Земун Поле» Белград, Сербия). 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. *Выделение хлоропластов из листьев гороха:* в эксперименте использовали верхние листья проростка гороха, которые трижды (по 10 с) гомогенизировали в буфере (50 мМ трицин (рН 7,8), 400 мМ сахараза, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>). Полученный гомогенат фильтровали с последующим центрифугированием (300g, 1 мин, 0-4 °С), а осадок, содержащий хлоропласты, гомогенизировали в буфере В.



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 O<sub>2</sub>, проводили согласно методике (Ловягина и др., 2022). 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 сахаразы, 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:* Хлоропласты ресуспендировали в буфере (50 мМ трицин (рН 7,6), 400 мМ сахараза, 10 мМ NaCl), а клотианидин (КЛ) добавляли в среду и инкубировали в течение 10 мин. при 4 °С без освещения. Содержание хлорофилла (в 95%-ном этаноле) определяли



спектрофотометрическим методом (Lichtenthaler, 1987). *Изменения содержания и конформации 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 (М-PEA-2) с помощью которого 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. Перед экспериментом растение адаптировали к темноте. Для анализа ОЛР-кривых, использовали стандартный JIP-тест со следующими параметрами: интенсивность на 20 мкс ( $F_0$ ), 2 мс ( $F_I$ ), 30 мс ( $F_I$ ),  $F_M$  (максимальный уровень флуоресценции) (Strasser et al., 2004a). *Кинетику индукции флуоресценции* (кривые ОЛР) регистрировали с помощью анализатора (PEA) (Hansatech, Великобритания). Флуоресценция хлорофилла стимулировалась светом ( $\lambda = 650$  нм) интенсивностью 1500 мкмоль фотонов  $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ . *Кинетику темнового затухания флуоресценции хлорофилла и замедленной флуоресценции (ЗФ)* регистрировали с помощью прибора ФКМС-2 (МГУ им. М.В. Ломоносова, РФ) (Волгушева и др., 2022). *Скорость выделения и поглощения  $O_2$*  определяли методом амперометрии с помощью электрода Кларка (прибор Oxugraph 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<sub>2</sub>) к метилвиологену определяли по скорости поглощения O<sub>2</sub> (Curtis et al., 1975). Скорость выделения O<sub>2</sub> частицами ВВУ измеряли в присутствии искусственного акцептора электронов DCBQ (200 мкМ). *Регистрацию изменений скорости фотоиндуцированного переноса электронов в частицах ВВУ* ФСП проводили с помощью спектрофотометра SPECORD UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия), как описано в работе (Ловягина и др., 2022). *Содержание малонового диальдегида (МДА) и пигментов* определяли в соответствии с методом, описанным ранее (Харагучи и др., 1997). Хлоропласты, обработанные КЛ (и без КЛ), освещали в течение 5 минут (100 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>), 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. Концентрацию МДА рассчитывали, используя величину поглощения супернатанта при 532 и 600 нм (коэффициент экстинкции 155 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Для исследования морфологии и рельефа поверхности хлоропластов *использовали метод атомно-силовой микроскопии*: Структурную целостность хлоропластов поддерживали фиксацией в 0,5%-ном глутаральдегиде (Ted Pella) в течение 1 ч, затем объект промывали и высушивали на воздухе. Изображения хлоропластов 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 20x20 мкм или 5x5 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) (Schreier-Muccillo et al., 1976). 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. *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.

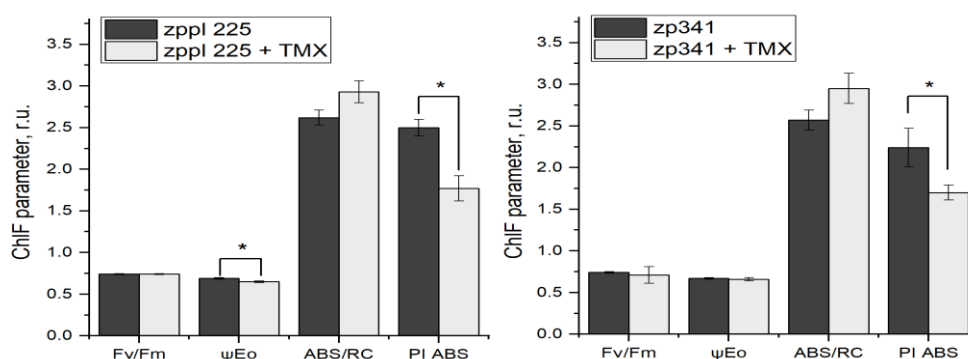
## Результаты и их обсуждение

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

В данном разделе представлены результаты серии экспериментов, проведенных на целых листьях двух различных генотипов кукурузы (zpr1 225 и zр 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). 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 zpr1 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 zр 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.

ОЛР-кривые у контрольных и обработанных ТМХ листьев путем опрыскивания или прикорневого полива имели типичный вид кривых с характерными фазами О-*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).

### А). Опрыскивание листа ТМХ



### Б). Прикорневой полив растения ТМХ

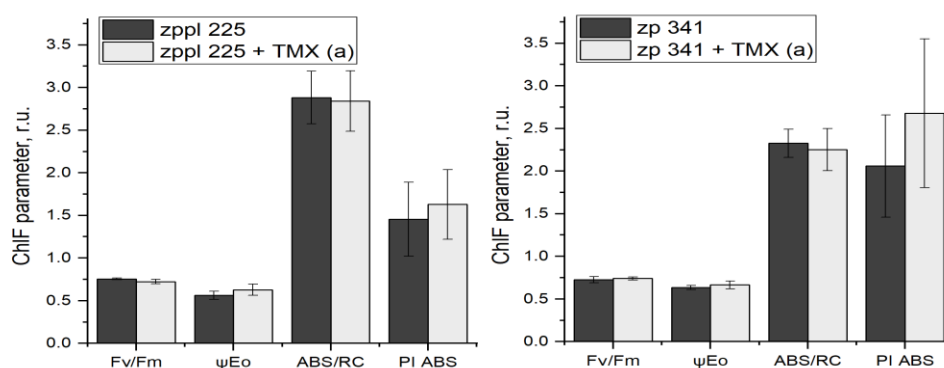


Рис. 2. Параметры JIP-теста листьев *Z. mays* инбредной (zppi 225) и гибридной (zp 341) линий при обработке ТМХ путем опрыскивания (А) и прикорневого полива (Б).  $n = 5$  для каждого образца.

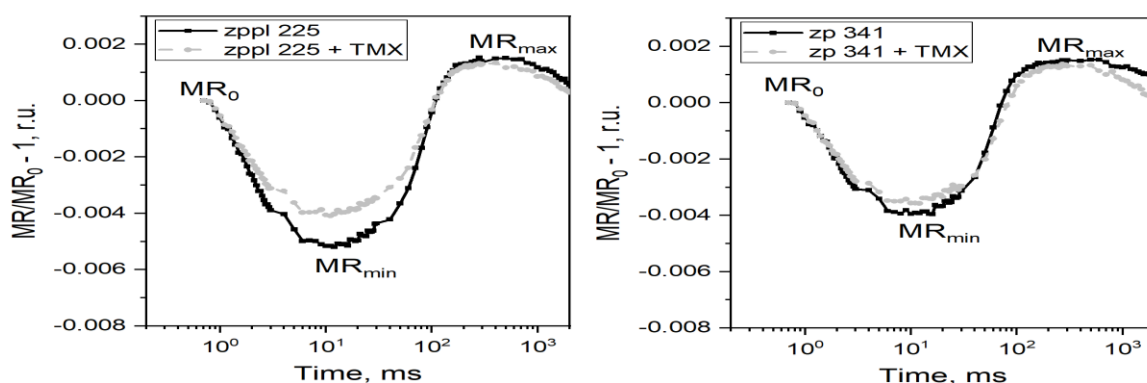
В отличие от параметра  $F_v/F_m$ , индекс производительности  $PI_{ABS}$  существенно менялся при воздействии ТМХ. Известно, что  $PI_{ABS}$  коррелирует с жизнеспособностью растения и отражает текущее состояние работы ФСА в условиях стресса.  $PI_{ABS}$  является показателем, который включает в себя 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  $Q_A$  ( $\psi_{Eo}$ ). Сравнение  $PI_{ABS}$  в контроле и при воздействии ТМХ через опрыскивание выявило статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия: в листьях у образцов zppi 225 и zp 341, обработанных ТМХ, параметр  $PI_{ABS}$  снижался соответственно на 29 и 24 %. Вероятно, что в присутствии ТМХ, снижение  $PI_{ABS}$  в листьях zppi 225 обусловлено уменьшением эффективности электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII ( $\psi_{Eo}$ ), а

в листьях zр 341 – с незначительным уменьшением доли активных РЦ (увеличение ABS/RC) и фотохимии ФСЦ ( $F_v/F_M$ ). В то же время, при обработке растений с помощью прикорневого полива выявлено незначимое увеличение  $PI_{ABS}$  в листьях двух генотипов, что свидетельствует, вероятно, либо о специфике действия ТМХ на растение, либо о трансформации ТМХ в КЛ.

Окислительно-восстановительные превращения реакционных центров молекул ФСЦ (P700) в присутствии ТМХ исследовали, регистрируя поглощение света при  $\lambda = 820$  нм (MR) (Рис. 3). Известно, что кинетика фотозависимого уменьшения амплитуды сигнала MR в первые 15-20 мс отражает процесс окисления P700 (быстрая фаза) и достигает минимума при  $\sim 20$  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 ФСЦ, снижая величину поглощения при  $\lambda = 820$  нм и рост сигнала MR (медленная фаза) до максимума при  $\sim 200$  мс (MRmax). При опрыскивании ТМХ листа гибридной линии zрpl 225 и гибрида zр 341 были выявлены окислительно-восстановительных изменения P700 (Рис. 2). Отметим, что в листьях zрpl 225 при воздействии ТМХ обнаружены изменения амплитуды MR, в частности в уменьшение сигнала при 20 мс (MRmin) (Рис. 3 А). Напротив, в условиях опрыскивания, действие ТМХ на РЦ ФСЦ листьев гибрида zр 341 характеризовался некоторой устойчивостью (отсутствие значимых изменений в MR кинетике) (Рис. 3).

Каротиноиды входят в состав и регулируют активность комплекса ФСЦ. В спектрах комбинационного рассеяния (КР) листьев кукурузы были выявлены характерные максимумы КР-спектра каротиноидов, обусловленные электронно-валентными колебаниями в структуре молекулы (Рис. 4). После опрыскивания листа ТМХ, соотношение полос  $I_{1520}/I_{1160}$  КР-спектра каротиноидов листа zрpl 225 уменьшилось, а в листьях zр 341 увеличилось, что, вероятно, свидетельствует о различных конформациях молекул каротиноидов у различных генотипов. Отметим, что аналогичных изменений конформации молекулы каротиноидов в листе при корневом орошении растения ТМХ нами не обнаружено.

### А). Опрыскивание листа ТМХ



### Б). Прикорневой полив растения ТМХ

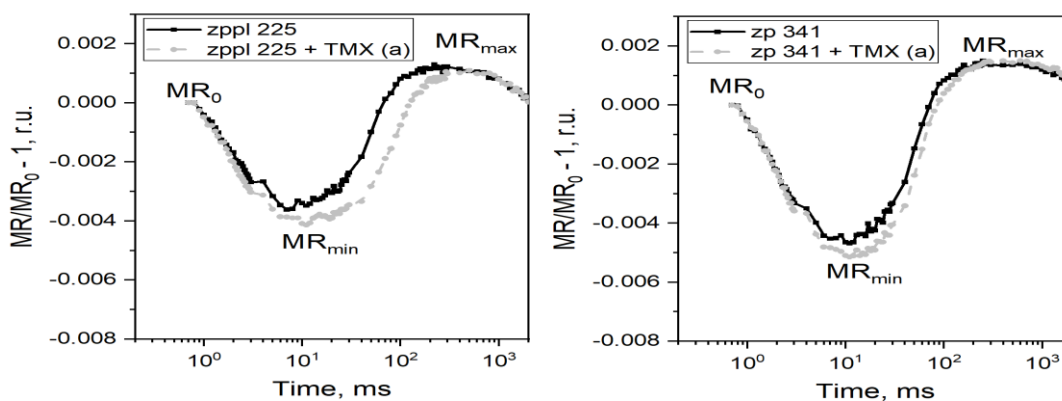


Рис. 3. Светоиндуцированные кинетики модулированного отражения при  $\lambda = 820$  нм (MR) у листьев кукурузы (*Zea mays* L.) инбредной линии zppl 225 и гибрида zp 341 (В, Г) в контроле и при опрыскивании (А) и при прикорневом поливе (Б) тиаметоксамом.

Установлено, что в листьях инбредной линии zppl 225 содержание хлорофилла меньше, чем zp 341, но изменений его содержания при действии ТМХ в листьях zp 341 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 P700 двух генотипов окисляется, однако, существуют различия в скорости его последующего восстановления, причем более выраженные в листьях zppl 225 (Рис. 3 Б).

## А) Опрыскивание листа ТМХ

## Б) Прикорневой полив растения ТМХ

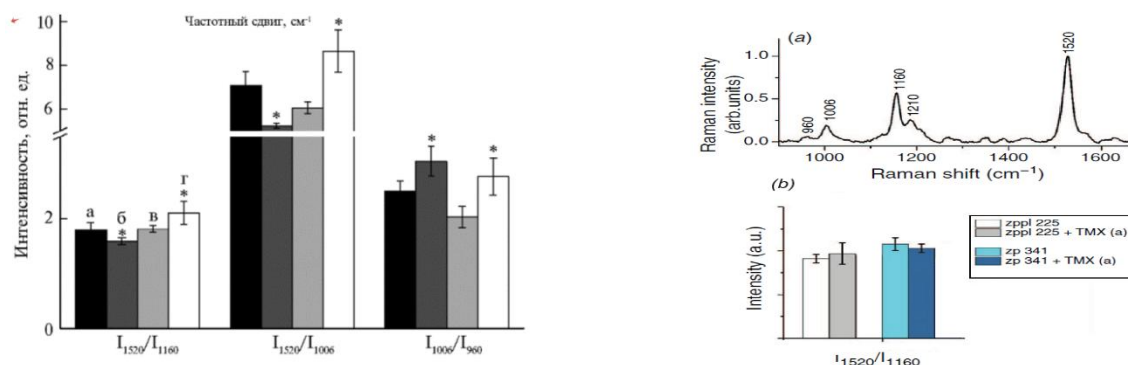


Рис. 4. Изменение спектров комбинационного рассеивания (КР) каротиноидов в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) двух генотипов при опрыскивании (А) и прикорневом поливе (Б) пестицидом ТМХ. А.: а — инбредная линия zpr1 225, б — zpr1 225 + ТМХ, в — гибрид zpr 341, г — гибрид zpr 341 + ТМХ. Звездочкой обозначены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

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

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

### 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 клатианидина (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 темноте, снижая вероятность окислительного стресса и активации фотозащитных механизмов. Эффективность функционирования ЭТЦ от  $H_2O$  до MV, который переносит электроны от ФСI на молекулярный  $O_2$ , контролировали по скорости выделения и поглощения  $O_2$  (Табл. 1, Рис. 5). 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). Выделения  $O_2$ , связанного с активностью ФСI (в присутствии донора электронов DCPIPH<sub>2</sub>) не обнаружено, что, вероятно, свидетельствует об изменении функционирования ЭТЦ в присутствии КЛ за счет нарушений электронного транспорта в ФСII.

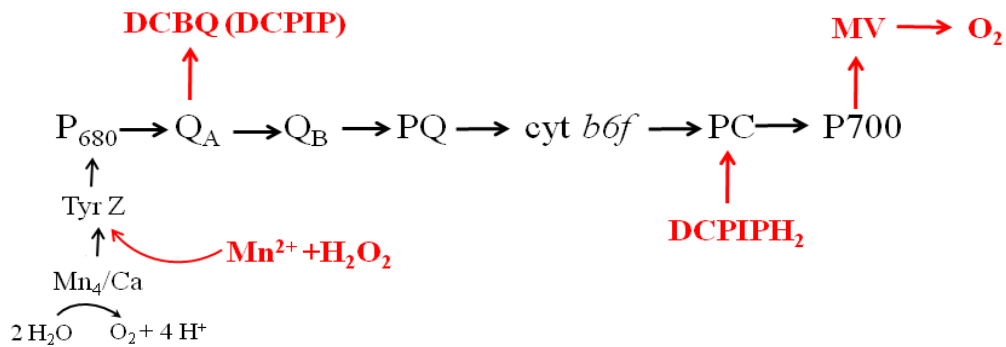


Рис. 5. Схема с указанием мест взаимодействия акцепторов и доноров электронов с ЭТЦ. Транспорт электронов в ЭТЦ:  $H_2O \rightarrow MV$ ,  $H_2O \rightarrow DCBQ$ ,  $DCPIPH_2 \rightarrow MV$ ,  $H_2O \rightarrow DCPIP$ ,  $Mn+H_2O_2 \rightarrow DCPIP$

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

обработка	$O_2$ выделение (DCBQ)	$O_2$ поглощение ( $H_2O \rightarrow MV$ )	$O_2$ поглощение ( $DCPIPH_2 \rightarrow MV$ )
контроль	$224 \pm 17$	$206 \pm 19$	$668 \pm 27$
22 мкг/лЛ КЛ	$217 \pm 21$	$175 \pm 23$	$669 \pm 20$
110 мкг/лЛ КЛ	$170 \pm 20^*$	$149 \pm 19^*$	$655 \pm 15$

Скорость выделения и поглощения  $O_2$  представлены в мкмоль  $O_2$  (мг Хл)<sup>-1</sup>ч<sup>-1</sup>.

\*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 содержащих КВК для которых в качестве доноров электронов, использовали  $Mn+H_2O_2$  (Табл. 2). В



присутствии 0,11 мг/л КЛ и DCBQ скорость выделения O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> и скорость восстановления DCPIP в мембранах ФСII+Mn и ФСII-Mn

Обработка	O <sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> в мембранах ФСII+Mn составляла 450±22 мкмоль O<sub>2</sub> (мг Хл)<sup>-1</sup> ч<sup>-1</sup>.

Скорость восстановления DCPIP в мембранах ФСII+Mn и ФСII-Mn составила 145 ± 5 и 105 ± 8 мкмоль DCPIP (мг Хл)<sup>-1</sup> ч<sup>-1</sup> соответственно. \* p < 0,05.

## 2.2. Кинетика световой индукции флуоресценции при действии КЛ

Для анализа действия КЛ на функционирование ЭТЦ в хлоропластах анализировали ОЛР-зависимости хлоропластов (Рис. 6). Известно, что ОЛР-зависимость представляет собой график с четко выраженными тремя фазами изменения флуоресценции (OJ, J 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 - Vj (Рис.6, Табл.3). В присутствии КЛ (22 и 110 мкг/л КЛ) амплитуда фазы OJ (Vj) в хлоропластах увеличивалась на 39 и 67%, скорость накопления закрытых РЦ (M<sub>0</sub> – скорость восстановления Q<sub>A</sub>) - более чем в 5, хотя эффективность транспорта электронов (параметр Pet), т.е. вероятность переноса электронов из Q<sub>A</sub> 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  $F_v/F_o$  хлоропластов не изменялось, что согласуется с данными, полученными на мембранах ФСII (Табл. 2).

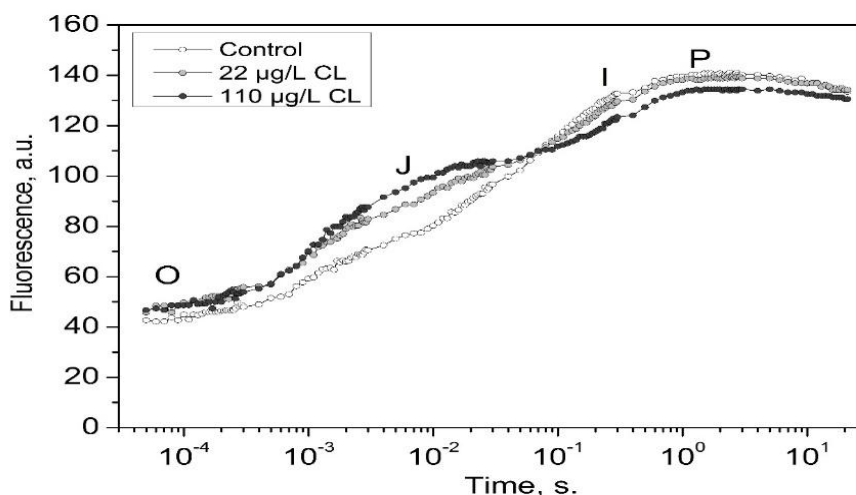


Рис. 6. Зависимости индукции флуоресценции хлоропластов гороха в присутствии КЛ (22 и 110 мкг/л).

Таблица 3. Параметры JIP-теста, рассчитанные по результатам OJIP (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*
Pet	3.06±0.15	1.93±0.23*	1.44±0.06*
$F_v/F_o$	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 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, вероятно, об отсутствии у реакционных центров способности осуществлять прямой перенос электронов.

Таблица 4. Изменения амплитуды (A) и константы времени ( $\tau_{1/2}$ ) затухания переменной флуоресценции в контроле и хлоропластах, обработанных 22 или 110 мкг/л КЛ

Условия	Быстрая компонента		Средняя компонента		Медленная компонента	
	A <sub>10</sub> (%)	$\tau_{1/2, 1}$ (ms)	A <sub>2</sub> (%)	$\tau_{1/2, 2}$ (ms)	A <sub>3</sub> (%)	$\tau_{1/2, 3}$ (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
3. 110 мкг/л КЛ	52±2	0.978±0.09	29±2	31.9±7.0	18±2	1051±303

### 2.3 Кинетики затухания флуоресценции при действии КЛ на хлоропласт

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

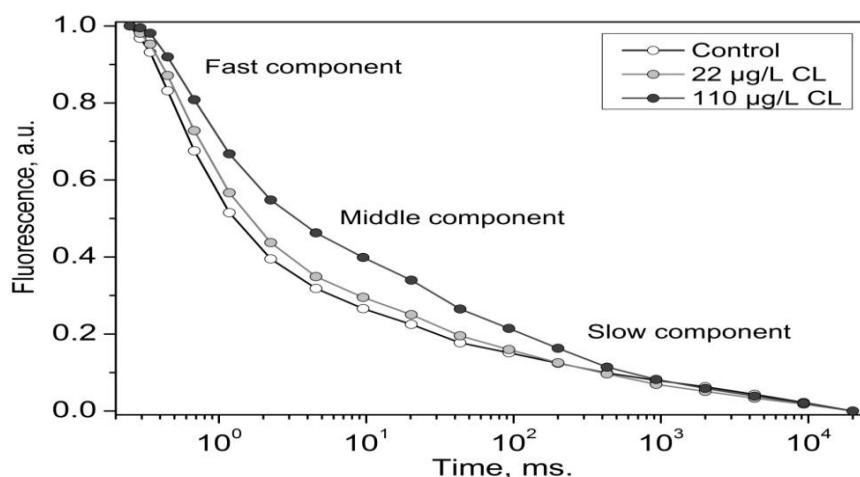


Рис. 7. Действие КЛ (22 мкг/л и 110 мкг/л) на кинетику затухания переменной флуоресценции в хлоропластах гороха.

#### 2.4. Кинетика индукции замедленной флуоресценции хлоропластов при действии КЛ

В следующей серии, для исследования вклада процессов энергизации и формирования  $\Delta pH$  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 мс, 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 отсутствовала, 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 DCBQ (Рис. 8б).

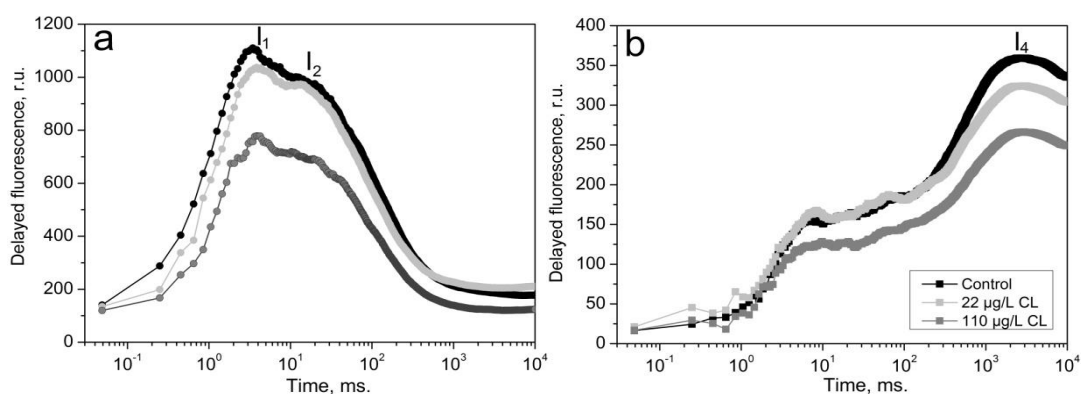


Рис. 8. Исследование действия КЛ на кинетику замедленной ФХ контрольных и обработанных хлоропластах в отсутствие (а) и присутствии 0.125 мМ DCBQ (б).

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 (Fv/Fm, Табл. 3), снижение  $\Delta pH$  и процесса энергизации мембраны, вероятно, обусловлено негативным действием КЛ на морфологию и липидный бислой хлоропластов.

Известно, что 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 ( $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ) хлоропластов. Установлено, что концентрация МДА возрастала на 46% в хлоропластах, обработанных 110 мкг/л КЛ, по сравнению с контролем (Таблица 5).

### 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 хлоропластов (Chuartzman et al. 2008) (Рис. 9). 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 хлоропластов (Chuartzman et al., 2008).

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

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

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

Изменение морфологии хлоропластов в присутствии КЛ сопровождаются изменениями вязкости мембран. С помощью ЭПР спектроскопии установлено, что величина  $\tau$  спин-меченого 16-ДС в мембране хлоропласта снижается на 12%, что свидетельствует об уменьшении вязкости мембраны (упорядоченность расположения «хвостов» жирных кислот фосфолипидов) (Таблица 5).

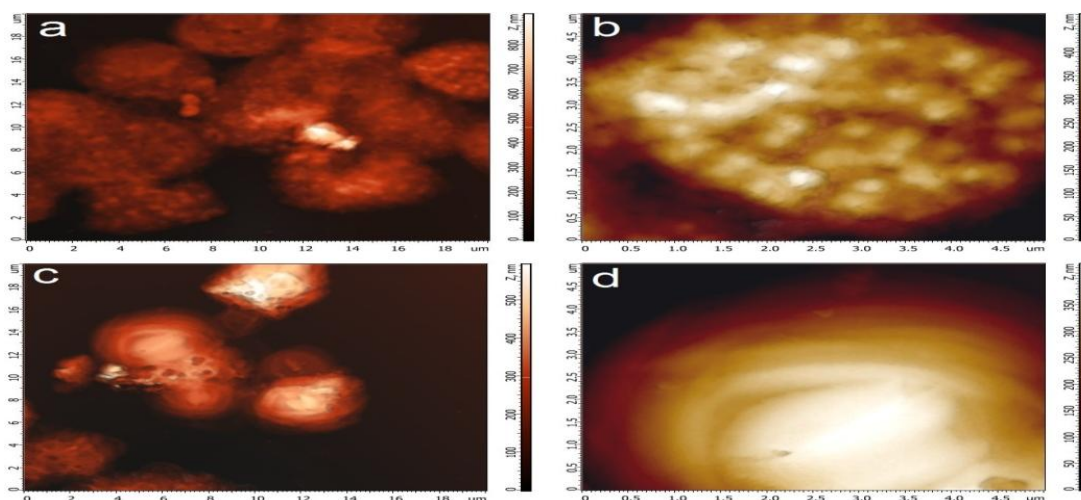


Рис. 9. АСМ-изображения хлоропласта - контроль (а, b) и хлоропласта, обработанного 110 мкг/л КЛ (с, d)

### Заключение

В данной работе представлены результаты исследования, проведенного на листьях двух различных генотипов кукурузы (zpr1 225 и zр 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  $PI_{ABS}$  содержание хлорофилла существенно уменьшается (особенно для zpr1 225), что, вероятно, свидетельствует о снижении синтеза хлорофилла и увеличения синтеза каротиноидов (антиоксидантная защита). Анализ кинетики ЗФ, при опрыскивании листьев ТМХ, свидетельствует об уменьшении образования окисленных и увеличении - восстановленных форм акцепторов ФСІ (P700) только у zpr1 225. Вероятно, это связано с уменьшением пула акцепторов, таких как P700, на акцепторной стороне ФСІ, что не происходит РЦ ФСІ листьев гибрида zр 341.

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). Вероятно, КЛ способен связываться с гидрофобными и/или полярными аминокислотами в сайте  $Q_B$  белка  $D_1$  (Battaglino et al., 2021), конкурируя за сайт связывания с пластохиноном. Так как при действии КЛ меняется морфология и вязкости мембраны хлоропластов, вероятно, нарушение конформации белка  $D_1$ , как следствие, модифицирует  $Q_B$  и переноса электронов между  $Q_A$  и  $Q_B$ , инициируя генерацию триплетного состояния хлорофилла (Rutherford et al. 2012). Этот процесс, как правило, коррелирует с увеличением количества маркеров окислительного стресса и активных форм кислорода (АФК) (Mahapatra et al., 2019; Shahid et al., 2021; Touzout et al., 2021).

### 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 *zprl 225*, так и у гибрида *zр 341*.
- 2) При опрыскивании листа ТМХ, снижение  $PI_{ABS}$  в листьях двух генотипов кукурузы обусловлено уменьшением эффективности электронного транспорта на акцепторной стороне ФСII ( $\psi_{E_0}$ ).
- 3) При опрыскивании листьев ТМХ двух генотипов кукурузы (*zprl 225* и *zр 341*) выявлены характерные различия: снижение содержания хлорофилла в листьях инбредной линии *zprl 225* по сравнению с гибридом *zр 341*; в листьях *zprl 225* обнаружено снижение потока электронов в ЭТЦ от и к ФСI, изменения конформации молекул каротиноидов.
- 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  $O_2$ ) с 110 мкг/мл КЛ снижает скорость выделения  $O_2$  на 20%, что согласуется с данными, полученными на ФСII хлоропластов.
- 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 ( $100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ) 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 действие на хлоропласты 110 мкг/л КЛ меняет морфологию хлоропласта: около 40% теряют дисковидную форму, а рельеф поверхности мембраны, обусловлен наличием глобулярных структур, сглаживается, 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  $\tau$  уменьшался на 12%, что свидетельствует о снижении упорядоченности распределения «хвостов» жирных кислот фосфолипидов липидного мембраны хлоропласта.



**Основные публикации Хао Ц. 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, объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах)**

1. Тодоренко Д.А., Слатинская О.В., **Хао Ж.**, Сейфуллина Н.Х., Radenović Č.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 (**ИФ РИНЦ 1.193, 0.688/ 0.172 п.л.**)
2. Todorenko D.A., **Хао Ж.**, Slatinskaya O.V., Allakhverdiev E.S., Khabatova V.V., Ivanov A.D., Radenovic C.N., Matorin D.N., Alwasel S., Maksimov G.V., Allakhverdiev S.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., **Хао Ж.**, 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 (**ИФ РИНЦ 1.193, 0.625/ 0.125 п.л.**) [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. Radenović Č.N., Максимов Г.В., Курамшина Г.М., Шутова В.В., **Хао Ж.**, 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 (**ИФ РИНЦ 1.193, 0.75/ 0.15 п.л.**) [Radenović Č.N., Maksimov G.V., Kuramshina G.M., Shutova V.V., **Хао Ж.**, 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., **Хао Ж.**, He Y. Use of nanostructured silver substrates (coatings) to study the content and conformation of  $\beta$ -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 A.A., **Хао Ж.**, He Y., Lovyagina E.R., Loktyushkin A.V., Parshina E.Yu., Luneva O.G., Baizhumanov A.A., Khrushev S.S., Maksimov G.V., Rubin A.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.**)