

СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 6, 2021

ОБЗОРЫ

Взаимодействие сигнальных путей при формировании защитных реакций растений в ответ на стрессовые факторы окружающей среды

А. Р. Лубянова, М. В. Безрукова, Ф. М. Шакирова

563

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Инактивация гена мембранного рецептора цитокинина АНК2 вызывает дифференциальную экспрессию генов *транс*-факторов, участвующих в регуляции старения листьев *Arabidopsis thaliana*

Н. В. Кудрякова, М. Н. Данилова, А. А. Андреева, А. С. Дорошенко, А. В. Клепикова, В. Ю. Штратникова, В. В. Кузнецов

579

Содержание сахаров в спелом плоде томата коррелирует с уровнем экспрессии изоформы *RIN2i* гена *Ripening inhibitor*

М. А. Слугина, Е. А. Джос, А. В. Шенникова, Е. З. Кочиева

589

Фотосинтетическая и дыхательная способность талломов крупнолистоватого лишайника *Lobaria pulmonaria* в годичном цикле

М. А. Шелякин, И. Г. Захожий, И. В. Далькэ, О. В. Дымова, Р. В. Мальшев, Т. К. Головки

600

Действие фураностаноловых гликозидов клеток *Dioscorea deltoidea* на редокс-состояние клеток люцерны *in vitro*

Л. А. Волкова, В. В. Урманцева, А. Б. Бургутин, А. М. Носов

612

Возможная активация C_3 -пути фотосинтеза у C_4 -галофита *Kochia prostrata* под влиянием повышенной концентрации CO_2

З. Ф. Рахманкулова, Е. В. Шуйская, М. Ю. Прокофьева

622

Влияние NaCl на продуктивность и показатели флуоресценции у *Nasturtium officinale* R. Вг. применительно к искусственным замкнутым экосистемам

А. М. Павлова, Н. А. Гаевский, О. В. Анищенко, Н. А. Тихомирова, А. А. Тихомиров

631

Изменение активности инвертаз при закаливании *Nicotiana tabacum* L. и *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) к гипотермии

В. Н. Попов, Н. В. Астахова

644

Влияние гипотермии на баланс фенольных соединений в растениях гречихи с различным уровнем плоидности

Е. А. Гончарук, В. В. Казанцева, Н. В. Загоскина

654

Влияние бактерий рода *Vacillus* на содержание H_2O_2 и экспрессию генов ингибиторов гидролаз в растениях картофеля при инфицировании *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Л. Г. Яруллина, В. О. Цветков, Г. Ф. Бурханова, А. В. Сорокань, Е. А. Заикина

664

УДК 581.1

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ В ОТВЕТ НА СТРЕССОВЫЕ ФАКТОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2021 г. А. Р. Лубянова^а, *, М. В. Безрукова^а, Ф. М. Шакирова^а

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: Lubyanova555@mail.ru

Поступила в редакцию 03.11.2020 г.

После доработки 09.03.2021 г.

Принята к публикации 10.03.2021 г.

В процессе эволюции растения выработали множество специфических регуляторных сигнальных путей, основные из них – гормональные. К фитогормонам относятся не только такие признанные эндогенные регуляторы роста, как абсцизовая кислота, ауксины, цитокинины, гиббереллины, брассиностероиды (БС), этилен, салициловая кислота (СК) и жасмонаты, но и недавно охарактеризованные растительные гормоны, производные апокаротиноидов – стриголактоны (СЛ). Между сигнальными путями происходит взаимодействие как на уровне биосинтеза мессенджеров, их транспорта, так и при активации генов-мишеней. Поскольку абиотические и биотические стрессоры окружающей среды отрицательно влияют на продуктивность растений, то понимание индуцированных стрессами молекулярных механизмов регуляции может помочь получить стресс-устойчивые и урожайные растения при помощи молекулярных методов. Данная работа является обзором современной литературы касательно взаимодействия и взаимовлияния негормональных и гормональных сигналов, регулирующих рост и развитие растений в динамично меняющихся условиях окружающей среды.

Ключевые слова: стресс-устойчивость растений, фитогормоны, взаимодействие сигнальных путей, протеинкиназы, факторы транскрипции, липидные сигналы, кальций, оксид азота, активные формы кислорода, стриголактоны

DOI: 10.31857/S0015330321060129

ВВЕДЕНИЕ

Растения, будучи прикрепленными к определенному местообитанию организмами, часто подвергаются воздействию разнообразных, зачастую одновременно действующих биотических и абиотических стрессовых факторов. Засуха, засоление, экстремальные температуры, химические токсиканты, а порой также заражение, в той или иной степени приводят к дегидратации (осмотическому стрессу), что характеризуется снижением тургорного давления и потерей воды растением и является главной конвергентной точкой многих абиотических стрессов [1]. При продолжительном воздействии засоления, влиянии тяжелых металлов, а также при нерациональном внесении удобрений, кроме осмотического стресса, наблюдается

токсическое действие избыточного количества ионов на растительные клетки и индукция окислительного стресса у растений, который происходит из-за дисбаланса в производстве и удалении активных форм кислорода (АФК) и азота в различных клеточных компартментах, приводящего к избытку этих молекул [2]. Генерация АФК и активация системы их детоксикации относится к числу характерных ответных реакций растений на неблагоприятные воздействия среды, что включает проявление их повреждающего действия на клетки и, в то же время, развитие в них системы защиты. Важную роль в вызванной стрессовыми воздействиями активации антиоксидантных ферментов играет АБК [3]. Более того, предполагается, что АФК и фитогормоны являются ключевыми сходящимися точками абиотического и биотического стрессовых взаимодействий.

Стрессовые факторы различной природы благодаря перекрывающимся сигнальным путям вызывают похожие ответы растений: повреждение клеточных компонентов; нарушение метаболизма;

Сокращения: БС – брассиностероиды; ЖК – жасмоновая кислота; МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа; МЖ – метилжасмонат; СК – салициловая кислота; СЛ – стриголактоны; АСС – 1-аминоциклопропан-1-карбоксикислота.

уменьшение энергоснабжения путем торможения или блокирования фотосинтеза и увеличение доли катаболических реакций; торможение роста [4]. В стрессовых условиях растения стремятся поддерживать на необходимом для выживания уровне тургор клеток, фотосинтез и транспирацию, регулировать накопление осмолитов и баланс окислительно-восстановительной системы с помощью разнообразных путей сигналинга. Обзор посвящен выявлению перспективных компонентов сигнальных путей растений, воздействие на которые с помощью генной инженерии может помочь в ближайшем будущем получить устойчивые и урожайные сорта.

НЕГОРМОНАЛЬНЫЕ ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ

Кальций. Эволюция приняла положительно заряженные ионы кальция в качестве основного сигнального элемента клеток. Кальций – один из основных мессенджеров для функционирования в качестве центрального узла в общей “сигнальной сети”, играет важную роль в обеспечении стресс-устойчивости растений [5, 6]. Преходящий (в пределах секунд) приток Ca^{2+} из апопласта в цитозоль является частью первоначального ответа на различные стрессовые состояния, наряду с этим, высвобожденный из внутриклеточных депо Ca^{2+} также участвует в формировании кальциевого сигнала [7]. Клетки могут различать разное по природе и силе воздействия стимул-индуцированное увеличение концентрации свободного кальция в цитозоле [5, 6]. Специфичность и/или перекрестные помехи в передаче сигналов Ca^{2+} могут зависеть от величины, продолжительности и субклеточной локализации Ca^{2+} осцилляций, а также разнообразия кальциевых сенсоров. Эти различия могут позволить растительным клеткам отличить один вид стресса от другого и индуцировать экспрессию гена, необходимого для адаптации к конкретному стрессу.

Стресс-индуцированное накопление Ca^{2+} в цитоплазме далее активирует НАДФ-Н-оксидазу и сигналинг активных форм кислорода, демонстрируя синергизм сигнальных механизмов кальция и АФК [8]. Кальций-проницаемые каналы и НАДФ-Н-оксидаза образуют самоусиливающуюся петлю, где повышение уровня Ca^{2+} приводит к большей продукции АФК и наоборот [6]. Кроме того, уровень кальция в клетках растений находится также под контролем сигнальных молекул, например, липидных сигналов. Так, инозитолтрифосфат вызывает стресс-индуцированное высвобождение Ca^{2+} в цитоплазме замыкающих клеток и закрытие устьиц [9]. Изменение уровня цитозольного Ca^{2+} воспринимается кальций-связывающими белками, которые взаимодействуя с

последующими сигнальными компонентами киназами и/или фосфатазами передают сигнал на белки цитоскелета, ферменты, ионные каналы, запускают экспрессию основных стресс-индуцируемых генов, ведущих к физиологическому ответу, или транскрипцию факторов, контролирующих эти гены [5, 6]. Основными сенсорами кальция являются кальмодулины (CaMs), В-подобные белки кальцийневрины (CBLs) и кальций-зависимые протеинкиназы (СРК/СДРК) и некоторые другие. Эти датчики Ca^{2+} вместе с другими компонентами декодируют сигналы Ca^{2+} в последующие события сигналинга, такие как фосфорилирование, транскрипционное перепрограммирование, активация MAPK-каскада, а также накопление АФК или оксида азота (NO), предполагая, что передача сигналов Ca^{2+} играет ключевую роль в опосредовании реакции растений на стресс [8].

Существует множество перспективных белков-сенсоров стресса, которые могут быть использованы для получения устойчивых и урожайных сортов. У арабидопсиса предполагаемым сенсором осмотического стресса является OSCA1 [10], сенсором низкой температуры – COLD1/RGA1 [11], сенсором высокой температуры – CNGC2 [12], которые являются белковыми переносчиками кальция в плазматической мембране. Активация сенсора ионов натрия MOCA1 последовательно приводит к деполяризации потенциала плазматической мембраны, инактивации каналов притока Ca^{2+} и активации Na^+/H^+ -антипортера [13]. Кроме того, накопление АФК и АБК вызывает увеличение концентрации свободного кальция в цитозоле клеток растений. Так, перекись водорода (H_2O_2) активирует локализованный на плазматической мембране сенсор НРСА1, что приводит к аутофосфорилированию НРСА1, активации этим белком кальциевых каналов в замыкающих клетках и закрытию устьиц [14]. Кальций-зависимая активация этих сенсорных белков в дальнейшем приводит к взаимодействию с СРКs (специфической группой протеинкиназ) и к активации насосов, исключаяющих ионы натрия из цитоплазмы растений при засолении [15]. Индуцированная засухой экспрессия генов *OsDSM2* и *OsCam1-1* риса, кодирующих *b*-каротингидролазу и Ca^{2+} -связывающий кальмодулин соответственно, запускают сначала Ca^{2+} сигналинг, затем накопление АБК и формирование устойчивости к стрессу [16]. В растениях *A. thaliana* избыточная экспрессия кальций-связывающего мембранного белка PcaP2 вызывает устойчивость к засухе, причем на этом белке сходится стресс-индуцированный сигналинг трех путей: не только кальциевого, но и АБК и салицилатного, потому что экспрессия гена *PcaP2* индуцируется как АБК, так и салициловой кислотой (СК) [15]. Также кальций регулирует сигналинг ауксинов, потому что даже кратковременное увеличение со-

держания кальция в цитозоле изменяет полярность локализации транспортеров ауксина [17].

Активные формы кислорода. При воздействии стрессов жесткая система регуляции гомеостаза активных форм кислорода нарушается, обратимое накопление АФК действует в качестве сигналов, запускающих стресс-индуцированные клеточные процессы, и вызывает окисление молекул клетки, в том числе и фитогормонов [18]. НАДФ·Н-оксидаза катализирует генерацию супероксид-аниона, однако самой стабильной и, вероятно, самой эффективной сигнальной молекулой среди АФК является H_2O_2 . Отзывчивые на H_2O_2 гены участвуют в обмене веществ и энергии, транспорте белка, гомеостазе ауксинов, транскрипции генов и защите клеток от стрессов. Повышенные уровни АФК могут влиять на градиент ауксина и/или чувствительность растений к этому фитогормону посредством окислительной дегградации или конъюгирования, изменения транспорта ауксинов по растению, и локализации экспортеров ауксина протеинов PINFORMED (PIN) [19]. Баланс между уровнем АФК и ауксинов частично определяет стресс-индуцированные морфологические изменения растений, а основными точками взаимодействия путей передачи сигналов АФК и ауксинов, вероятно, является АФК-зависимый MAPK-каскад и кальциевый сигналинг. Rho-гуанозинтрифосфатазы у *Arabidopsis* являются еще одной точкой взаимодействия между ауксином и АФК. Один из подклассов этих разнообразных мономерных ГТФ-связывающих белков, кодируемый генами *RAC/ROP*, регулирует такие процессы, как гормональные и стрессовые реакции, рост, развитие, размножение и передачу кальциевых сигналов. Белки *RAC/ROP* активируются ауксином и через индукцию ферментативной работы НАДФ·Н-оксидаз далее вызывают продукцию АФК в апопласте [19]. Рецепторы ауксина TIR1/AFB участвуют в активации экспрессии генов устойчивости к окислительному стрессу, регулирующих уровень АФК антиоксидантных ферментов и содержание хлорофилла в растениях. Совместно с ауксинами АФК активно влияют на различные важные этапы роста и развития растений, такие как адаптация к стрессам, клеточный цикл и пластичность клеточной стенки, ветвление побегов и время цветения. Так, ауксин-индуцированное накопление H_2O_2 регулирует гравитропизм корней, размер апертуры устьиц и жесткость клеточной стенки.

При стресс-индуцированном закрытии устьиц вначале происходит АФК-опосредованное накопление NO и далее – АБК [20]. Вместе с салициловой кислотой АФК участвует в индукции защитных реакций растений сои [21]. АФК и сигнальные пути этилена также взаимодействуют во время запрограммированной гибели клеток, акклиматизации, развития защитных реакций на биотрофные пато-

гены и органогенез [19], причем активация каскадов передачи сигналов при участии АФК и Ca^{2+} происходит синергично [4, 9]. АФК и гиббереллины совместно регулируют прорастание семян ячменя. АФК, продуцируемые НАДФ·Н-оксидазой, участвуют в биосинтезе гиббереллинов посредством регуляции экспрессии генов ферментов их биосинтеза *HvKAO1* и *HvGA3ox1* в эмбрионах ячменя [22].

Оксид азота. NO – эндогенная сигнальная молекула, которая играет одну из ключевых ролей в адаптации растений к стрессовым воздействиям. NO синтезируется ферментативно во всех клетках растений при окислительных реакциях не идентифицированного NOS-подобного фермента, а также из полиаминов и при восстановительных реакциях с помощью нитратредуктазы, нитрит-NO-редуктазы, пероксисомной ксантиноксидоредуктазы и митохондриальной цитохром *c*-оксидазы [23]. Накопление NO в растениях динамически регулируется такими фитогормонами, как АБК, ауксин, цитокинин, СК, жасмоновая кислота (ЖК) и этилен, а также абиотическими и биотическими стрессовыми факторами [20]. Увеличение содержания NO в растениях приводит к таким же последствиям, как и воздействие стрессового фактора, что выражается в подавлении роста первичного корня, активности клеточных делений и, соответственно, размеров корневой меристемы, вероятно за счет взаимодействия оксида азота с сигнальным Ca^{2+} , АФК и протеинкиназами. Кроме того, избыточное накопление NO в мутанте *nox1* вызывает снижение уровня экспрессии *PIN1* и уменьшает накопление ауксина в корне растений [24]. Кроме ауксинов, NO влияет на сигнальные каскады гиббереллинов, цитокининов, этилена, АБК, СК, ЖК, brassinosterоидов (БС) и стриголактонов (СЛ) на уровне биосинтеза, транспорта, дегградации и конъюгации всех звеньев сигналинга [20]. Под влиянием NO происходит нитрозилирование переходных металлов (Fe, Zn, Cu) в составе белков, ковалентная модификация аминокислотных остатков цистеина – S-нитрозилирование, а также нитрирование аминокислотных остатков тирозина. В результате этих посттрансляционных модификаций изменяются активность белков, их стабильность, внутриклеточная локализация и взаимодействие с белками-партнерами, а также фосфорилирование белков [23]. Многие физиологические процессы в растениях регулируются фитогормонами при участии оксида азота. Так, NO и СК координируют фотосинтез и генерацию АФК, а при засолении действуют синергично и нормализуют поступление натрия в растения. NO совместно с АФК и фитогормонами АБК, СК и ЖК участвует в стресс-индуцированном закрытии устьиц [20].

Липидные сигналы. Мембраны являются источником компонентов липидного сигналинга,

таких как фосфатидная кислота, фосфоинозитиды, сфинголипиды, лизофосфолипиды, оксипирины, N-ацилэтаноламины, свободные жирные кислоты и другие, которые генерируются ферментами фосфолипазами, липидкиназами или фосфатазами. Сигнальные молекулы липидной природы при воздействии абиотических и биотических стрессоров, а также под влиянием фитогормонов быстро и транзитно накапливаются, способны быстро привлечь белковые мишени к мембране и таким образом влиять на конформацию и активность внутриклеточных белков и метаболитов. Взаимодействие с таким липидным сигналом, как фосфатидная кислота может вызывать транслокацию привлеченных к мембране белков и тем самым препятствовать их активности. Кроме того, фосфатидная кислота способствует закрытию устьиц путем связывания и ингибирования протеинфосфатазы ABI1 – отрицательного регулятора сигнального пути АБК. Фосфатидная кислота, взаимодействуя с отрицательным регулятором этиленового сигнального пути конститутивной киназой тройного ответа (CTR1) *Arabidopsis*, приводит к ингибированию его активности, тогда как при связывании со сфингозинкиназой происходит ее активация. Доказано наличие пула фосфоинозитидов и липидкиназ в ядре, причем их активность увеличивается при стрессе. Консенсусный мотив связывания фосфатидной кислоты не идентифицирован, и такой мотив может не существовать. Этот факт позволяет предполагать наличие “электростатической/водородной связи”, которая объясняет молекулярную основу связывания фосфатидной кислоты на основе уникальных свойств ее молекулы. Кроме того, инозитол-5-фосфат является структурным кофактором нечувствительного к коронатину рецептора ЖК (COI1), а инозитол-6-фосфат – ингибитором рецептора ауксинов (TIR1), что связывает липидный и гормональный сигналинг [9].

ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ

Фитогормоны являются ключевыми регуляторами физиологических процессов растений на протяжении всего их жизненного цикла в нормальных условиях произрастания и при стрессовых воздействиях. Процессы метаболизма и каскады передачи гормональных сигналов – это подходящие цели, при манипуляции с которыми можно добиться увеличения стресс-устойчивости растений. Решающее значение при этом имеет такое поддержание гормонального баланса, при котором уменьшаются возможные отрицательные эффекты на рост и развитие растений. Необходимо при этом учитывать интеграцию множества внешних и внутренних сигнальных факторов как гормональной, так и негормональной природы, при этом важно пространственное расположение в растении ми-

шеней сигнальных факторов, время накопления сигнальных факторов и активации ими защитных механизмов, а также стадия развития самого растения.

АБК. Стрессоры окружающей среды стимулируют синтез в пластидах изопреноидного фитогормона АБК, который вызывает множество приспособительных реакций в растениях, включая закрытие устьиц и экспрессию защитных генов. Начинается АБК-опосредованный ответ растений на стресс при взаимодействии АБК с растворимыми рецепторами PYR/PYL/RCAR и PP2C и многочисленными транспортерами АБК, например, с NPF4.6, участвующим в межклеточном транспорте этого гормона [25]. В реализации АБК-зависимого сигналинга киназы SnRK2 являются центральными регуляторами, которые затем фосфорилируют ARE/ARF и запускают транскрипцию генов.

Также АБК регулирует экспрессию генов транскрипционных факторов, которые в свою очередь взаимодействуют с чувствительными к АБК элементами *ABRE* АБК-регулируемых генов [26]. Чувствительные к АБК факторы транскрипции, такие как ABF, MYC и MYB участвуют в экспрессии АБК-зависимых стрессовых генов через взаимодействие с *ABRE* (ACGTGGC), *MYCRS* (CAAnTG) и *MYBRS* (YAACR) соответственно, причем для начала экспрессии требуется взаимодействие более чем с одним чувствительным к АБК элементом [27]. Активация чувствительных к АБК транскрипционных факторов происходит посредством фосфорилирования АБК-индуцируемыми киназами [28]. Гиперэкспрессия факторов транскрипции AREB/ABF, контролирующих передачу сигналов АБК и регулирующих экспрессию АБК-зависимых генов, увеличивает стресс-устойчивость растений [27].

Нужно отметить, что АБК-зависимый и АБК-независимые пути передачи сигнала в стрессовых условиях взаимодействуют друг с другом [29]. Регуляция роста и развития растений происходит при совместном участии АБК и других сигналов, например, в созревании винограда участвуют АБК, этилен и H₂O₂ [30]. Сульфуразы регулируют импорт двух хлоропластных альдегидоксидаз, которые катализируют последние стадии биосинтеза как ИУК, так и АБК, а также регулируют ксантидегидрогеназы XND1 и XND2, участвующие в деградации пурина и генерации АФК в стрессовых условиях окружающей среды. Таким образом, этот фермент действует как датчик окислительно-восстановительного потенциала, а также влияет на генерацию гормонов ИУК и АБК [31]. Индуцированное засухой накопление ЖК в растениях совместно с АБК регулируют закрытие устьиц посредством стимуляции притока внеклеточного Ca²⁺ и/или путем активации сигналинга H₂O₂/NO. Далее происходит увеличение Ca²⁺-зависимой активности про-

теинкиназы CDPK и последующий каскад защитных реакций растений, в том числе и уменьшение устьичной апертуры в листьях арабидопсиса [28]. Взаимовлияние между сигнальными путями метилжасмоната (МЖ) и АБК при стрессе, вероятно, происходит посредством взаимодействия их сигнальных белков и рецепторов [29]. Экзогенная обработка растений АБК негативно регулирует ключевой ген пути биосинтеза цитокининов изопентилтрансферазу и активирует гены, кодирующие цитокининоксидазы и дегидрогеназы [32].

Ауксины синтезируются одним триптофан-независимым и четырьмя триптофан-зависимыми путями. Наиболее распространенная форма ауксина в растительной клетке – ИУК является важным регулятором деления, удлинения и дифференцировки растительных клеток. Остальные ауксины – индолил-3-масляная кислота, 4-хлориндол-3-уксусная кислота и фенилуксусная кислота – также обладают гормональной активностью и содержатся в растениях в заметных концентрациях. Такая избыточность активных ауксинов и путей их синтеза свидетельствует о необычайной важности этих фитогормонов для растений, в том числе и для адаптации к стрессовым условиям. Многие эндогенные и внешние сигналы вызывают в растениях *Arabidopsis* дифференциальное распределение ауксина посредством изменения полярности локализации белков-переносчиков ауксина PIN. Кроме того, активное участие ауксинов при адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды подтверждает наличие нескольких ауксин-зависимых генов, которые реагируют как на биотические, так и на абиотические стрессы.

Взаимодействие ауксина с цитоплазматическим рецептором AUXIN-BINDING PROTEIN1 (ABP1) инициирует нетранскрипционную передачу ауксинового сигнала посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза, являющуюся важной обратной связью ауксина с его собственным транспортом [19]. Воздействие ауксина на растения также активирует транскрипцию с помощью депрессии, при которой связывание ауксина с его рецепторными белками TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1) и AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB) запускает убиквитинирование и дальнейшую протеасомную деградацию белков-репрессоров транскрипции Auh/IAA и высвобождение факторов транскрипции, реагирующие на ауксин (ARF). Данные ARF активируют или подавляют экспрессию генов, чувствительных к ауксину.

При стрессе происходит подавление роста растений для того, чтобы выделить ресурсы на выживание, то есть в целом этапы синтеза и транспорта ауксина подавляются. Для транспорта ауксина в мембранах клеток растений есть переносчики ауксинов, изменяя активность и/или количество

которых можно получить устойчивые сорта. Так, переносчик OsPIN3t участвует в полярном транспорте ауксинов риса при засухе, нокдаун его гена приводит к аномалиям корня на ранней стадии, а избыточная экспрессия этого гена индуцирует повышенную засухоустойчивость [33]. Слабокислая протонированная ауксиновая гидролаза индолуксусной кислоты (IAAH) также может свободно диффундировать через липидную плазматическую мембрану и активно взаимодействовать с клеточными переносчиками AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX/LAX), а в цитозоли клеток-мишеней – диссоциировать в свою депротонированную форму. Для регуляции содержания ИУК в клетках предполагаемых устойчивых растений, вероятно, необходим активный отток этого фитогормона с помощью PIN и P-гликопротеинов (PGP) семейства В АТФ-связывающих кассетных переносчиков [19].

Трансгенные растения с избыточной экспрессией гена *YUCCA6 Arabidopsis*, участвующего в триптофан-зависимом пути биосинтеза ИУК, содержат больше свободного ИУК и транскриптов раннего ответа генов на ауксин, чем контрольные растения. Такие трансгенные линии устойчивы к засухе, вероятно, за счет снижения уровня АФК [34].

Цитокинины. Гормоны растений б-аминопуринового ряда стимулируют клеточное деление, регулируют апикальное доминирование, биогенез хлоропластов, мобилизацию питательных веществ, старение листьев, сосудистую дифференцировку, созревание. В стрессовых условиях цитокинины предотвращают повреждения клеток АФК, снижают активность хлорофиллаз и дехелатаз, которые разрушают хлорофилл при старении, а также повышают активность антиоксидантных ферментов и вызывают накопление молекул антиоксидантов, ксантофиллов. Экспрессия цитокинин-чувствительных генов, как правило, подавляется в ответ на стрессовые воздействия [35].

Активные цитокинины воспринимаются плазматической мембраной или внутриклеточными мембранами с помощью мембран-связанных белков гистидинкиназ (у арабидопсиса – АНК2, АНК3 и АНК4/CRE1), которые далее аутофосфорилируются и передают фосфорильную группу гистидин-фосфотрансферазным белкам (АНР). Белки АНР впоследствии перемещаются в ядро и фосфорилируют регулятор ответа (ARR). ARR бывают двух типов: фосфорилирование регуляторов ответа В типа активирует гены-мишени, связываясь с промоторами этих генов, экспрессия ARR А типа возрастает под влиянием регуляторов В типа, а сами они забирают значительное количество активированных фосфатов, что снижает цитокинин-зависимую транскрипцию и приводит к подавлению цитокининового ответа [36]. При этом NO ингибирует некоторые этапы фосфорилирования, а гистидин-фосфотрансферазный белок

ETR1 получает сигналы с рецепторов этилена, объединяя сигналинг этилена и цитокининов [37].

При развитии стрессовых реакций растений сигнальные пути цитокининов и АБК оказываются антагонистичными и взаимодействующими процессами [38]. Три рецептора цитокинина АНК2, АНК3 и АНК4/CRE1 играют роль отрицательных регуляторов в АБК-зависимом и в АБК-независимом сигналинге [39]. Помимо этого, ключевыми регуляторными компонентами сигналинга цитокининов являются ферменты, отвечающие за деактивацию цитокининов – цитокининоксидазы и дегидрогеназы (СКХ), которые положительно регулируются АБК [40]. Как в случае ауксина, при стрессе большинство тканей растений уменьшает накопление цитокининов, также как и увеличивает чувствительность растений к АБК для медиации стрессового ответа. В устойчивых сортах пшеницы при воздействии стресса цитокинины супрессируются практически сразу, а в чувствительных – не сразу и в меньшей степени [40]. На начальных этапах действия стресса количество цитокининов в растениях может транзитно увеличиться. При воздействии абиотических стрессов большой силы количество цитокининов может поддерживаться на высоком уровне [35].

Также как и в случае ауксина, нарушение синтеза и сигналинга цитокинина приведет к отрицательному плейотропному влиянию. Например, дефицитный по цитокинину *Arabidopsis* с избыточной экспрессией *СКХ* или нокаутный по четырём генам *ipt1*, *3*, *5*, *7* очень чувствителен к АБК при прорастании семян и при экспрессии генов, связанных с АБК [32]. Однако прицельное разумное регулирование ферментов биосинтеза цитокининов или выключение некоторых сигнальных компонентов в их сигналинге в некоторых тканях могут быть полезными для улучшения урожайности и сохранения засухоустойчивости.

Гиббереллины. Гибберелловые кислоты (ГК), группа из 130 дитерпеноидов тетрациклических карбоновых кислот, являются ключевыми регуляторами роста на различных стадиях развития растений, влияющие на деление и удлинение клеток, репродуктивное развитие [26]. Их биосинтез регулируется диоксигеназами – ГК3-оксидазой (*GA3oxs*) и ГК20-оксидазой (*GA20oxs*), а для их инактивации требуется ГК2-оксидаза (*GA2oxs*). Мутантные гены *GA2ox6* умеренно снижают уровень накопления ГК, что в свою очередь приводит к уменьшению высоты растений, формированию более развитой корневой системы, увеличению скорости фотосинтеза, повышению урожайности на 10–30%, а также повышению стресс-устойчивости у трансгенного риса [41]. Рецептором активных ГК (ГК1, ГК3, ГК4, ГК7) является растворимый белок GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (*GID1*),

который взаимодействует с белками DELLA – отрицательными регуляторами ответа растений на ГК, при этом включается целевая дегградация транскрипционных факторов DELLA 26S протеосомным комплексом и появление ответа растений на ГК [42].

Стрессоры окружающей среды тормозят рост растений, уменьшая эндогенные уровни ГК посредством снижения уровня их биосинтеза или увеличения скорости распада [43]. Мутантные растения с уменьшенным содержанием ГК проявляют карликовый фенотип и засухоустойчивы. Такие важные сельскохозяйственные культуры, как рис и ячмень, известны своими карликовыми сортами. Применение ингибиторов ГК в условиях засухи увеличивает одновременно стресс-устойчивость, биомассу и урожайность растений [44]. Полная ликвидация ГК в растениях неизбежно приведет к уменьшению урожая, поэтому для получения урожайных устойчивых сортов лучше сосредоточиться на ферментах, контролирующих содержание ГК. Так, эктопическая экспрессия нескольких генов *GA2ox* в рисе привела к умеренному уменьшению ГК, к низкорослому фенотипу, но растения использовали воду с более высокой эффективностью, у них повышалась продуктивность и устойчивость к абиотическому стрессу [41].

JUNGBRUNNEN1 (*JUB1*) является транскрипционным регулятором передачи сигналов гиббереллинов и brassinosterоидов в *A. thaliana*, который репрессируя гены биосинтеза гормонов *GA3ox1* и *DWARF4* (*DWF4*) приводит к снижению уровня ГК и БС, а также способствует образованию типичных фенотипов при дефиците этих гормонов. *JUB1* также подавляет *PIF4*, важный транскрипционный фактор, связывающий гормональные сигналы и факторы окружающей среды. С другой стороны, *JUB1* активирует гены *DELLA GA INSENSITIVE* (*GAI*) и *RGA-LIKE1* (*RGL1*). Кроме того, *BZR1* (*BRASSINAZOLE-RESISTANT1*) и *PIF4* действуют как прямые репрессоры транскрипции, устанавливая отрицательную петлю обратной связи. Таким образом, *JUB1* образует ядро регулирующего модуля, который запускает накопление DELLA, ограничивая тем самым удлинение клеток, одновременно повышая устойчивость к стрессу [45].

Браassinостероиды. Группа полигидроксильных стероидных гормонов играет важную роль в регуляции роста, развития и защитных реакций растений. Широкий спектр регуляторных функций БС включает деление и удлинение клеток, терминацию клеточного удлинения, сосудистую дифференцировку, реакцию на биотические и абиотические воздействия и старение. Экзогенная обработка brassinosterоидами устраняет стресс-индуцированное торможение роста и фотосинтетической активности, улучшает состоя-

ние мембран растений, увеличивает активность антиоксидантных ферментов и содержание пролина [46, 47]. Таким образом, манипуляции с сигналингом БС с целью увеличения стресс-устойчивости и урожайности растений являются перспективными.

Рецепторами БС являются локализованные в мембране киназа *BRI1* и гомологи этой киназы – *BRL1* и *BRL3*. Связывание БС с рецепторами запускает формирование гетеродимера *SERK3* (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE3), который в свою очередь инициирует внутриклеточный каскад фосфорилирования. Растительные факторы транскрипции *BZR1* и *BES1* (*BRI1-EMS-SUPPRESSOR1*) контролируют транскрипцию специфичных к брассиностероидам генов. При отсутствии БС специальная *GSK3*-подобная киназа *BIN2* (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2) фосфорилирует белки *BZR1/BES1* и инактивирует их, способствуя их деградации, что подавляет способность *BZR1/BES1* связывать ДНК [48]. *BIN2* киназы фосфорилируют также и *SnRK2*, что является общей частью в сигналингах АБК и БС [49].

У трансгенных растений *A. thaliana* с избыточной экспрессией *TaBRI1*, киназа *BRI1* взаимодействует с пятью членами семейства рецепторной киназы соматического эмбриогенеза пшеницы *TaSERK*, находящихся на плазматической мембране и увеличивает урожайность, термостойчивость, стимулирует более раннее цветение [50]. Поскольку после *BRI1* в каскаде передачи сигнала БС начинает действовать отрицательный регулятор БС киназа синтазы гликогена (*BIN2*), выяснение точных механизмов, контролирующих активацию *BIN2* во время стресса, может помочь в молекулярной селекции устойчивых сортов растений [1].

Вероятно, БС активно участвуют в формировании устойчивости растений к стрессам не только сами, а также при взаимодействии с каскадами передачи сигналов других гормонов и посредством наличия общих мишеней. Брассиностероиды вместе с ауксинами участвуют в формировании сосудов растений *Arabidopsis*, активируют экспрессию фактора транскрипции *ERF115* (ETHYLENE RESPONSE FACTOR115), играющего ключевую роль в росте и развитии корней [48]. Пути передачи сигналов ауксинов и БС содержат общие ключевые компоненты сигналинга такие, как *BZR1* и *ARF* (AUXIN-RESPONSE FACTORS). Для нормального роста и развития растений требуется определенное соотношение ауксинов и БС, а восстановление нарушенного баланса происходит при регуляторном участии брассиностероидов по типу обратной связи [51, 52].

АБК и БС являются антагонистами в таких процессах, как прорастание семян, рост корня и закрытие устьиц растений, однако это не мешает им совместно регулировать экспрессию около

100 различных генов [53]. БС уменьшают накопление АБК в растениях [47], тогда как АБК ингибирует сигналинг БС через компоненты передачи сигналов АБК, включая его рецепторы и *ABI2*. АБК и белки сигналинга брассиностероидов *GSK3*, в частности *BIN2*, *BIL1* и *BIL2*, антагонистично и совместно регулируют экспрессию общих стрессовых генов [49]. У растений арабидопсиса и риса прямое взаимодействие *BZR1/BES1* позволяет связываться с промоторами многочисленных метаболических генов ГК, а затем контролировать их экспрессию [51, 52]. Так, у *Arabidopsis* *BZR1/BES1* контролирует экспрессию гена биосинтеза ГК *GA20ox1* (*GA 20-oxidase1*) [54], а также физически взаимодействует с основным отрицательным регулятором передачи сигналов ГК – белками *DELTA* [53]. Одновременное возникновение БС-активированных *BZR1* и ГК-инактивированных регуляторов транскрипции *DELTA* позволяют этим двум классам фитогормонов действовать синергично.

Салициловая кислота является эндогенным фенольным соединением растений, регулирующим их рост и развитие, состояние антиоксидантной системы, прорастание, фотосинтез и созревание. Синтез СК происходит через изохоризмат и фенилаланинаммиакилазу. При экзогенном применении более благоприятны низкие концентрации СК, тогда как высокие концентрации салициловой кислоты усиливают окислительный стресс в растениях [55]. Большинство генов, которые отвечают на обработку СК, связаны со стрессовыми и сигнальными путями, которые в конечном итоге приводят к гибели клеток. Активируемые СК гены кодируют шапероны, белки теплового шока, дегидрины, антиоксиданты, гены, кодирующие вторичные метаболиты. Обработка растений пшеницы СК несколько снижает стресс-индуцированное торможение роста, а также предотвращает повреждение мембран, нормализует водный обмен, стимулируя накопление осмолитов. Экзогенная обработка СК уменьшает стресс-индуцированное повреждение растений путем регуляции уровня АФК, влияя на генерацию H_2O_2 НАДФН-оксидазой, что в свою очередь стимулирует продукцию и активность антиоксидантных ферментов.

Сигнальные пути СК и ИУК взаимодействуют, предобработка растений салициловой кислотой увеличивает накопление ауксина в растениях и благоприятно воздействует на рост растений при стрессе [55]. Процесс происходит при участии амидосинтаз ациловой кислоты *Gretchen Hagen3* (*GH3*), например *AtGH3.5*, способной конъюгировать как ИУК, так и СК [56]. Функции этих ферментов в растениях затрагивают и жасмонаты: *GH3* группы I являются амидосинтазами не только салициловой, но и жасмоновой кислот, *GH3* группы II участвуют в регуляции концентрации ИУК по типу отрицательной обратной

связи, а GH3 группы III участвуют в передаче сигналов салициловой кислоты [57].

СК действует совместно с БС в процессах стимуляции роста, повышения количества фотосинтетических пигментов и активации антиоксидантной защиты растений капусты при стрессе. При этом чувствительный к АФК белок NPR1 является важным компонентом в формировании опосредованной и БС и СК стресс-устойчивости растений [58]. Факторы транскрипции WRKY46, WRKY54 и WRKY70, участвующие в каскаде передачи сигнала БС, работают совместно с BES1 в реализации защитных программ растений в стрессовых условиях биотической и абиотической природы, в частности регулируя закрытие устьиц [59]. Кроме того, WRKY70, транскрипционный фактор, действующий несколько позже NPR1, участвует в экспрессии СК-индуцированного PR гена [60]. Таким образом, WRKY и NPR1 могут являться потенциальными точками схождения сигнальных путей СК и БС.

Воздействие СК на растение уменьшает стресс-индуцированное накопление этилена, ингибируя аминокислотопропанкарбоксилатсинтазу (АСС-синтазу) пшеницы, таким образом снижая ингибирующий эффект стресса, что позволяет предполагать, что СК и этилен являются антагонистами [61].

Жасмонаты. Жасмоновая кислота, метилжасмонат, 3R,7S-жасмонил-L-изолейцин (ЖК-Ile), цис-жасмонат и жасмонил-1-аминокислотопропан-1-карбоновая кислота (ЖК-АСС) являются циклопентановыми фитогормонами, синтезирующимися в метаболизме жирных кислот. Жасмонаты регулируют не только развитие растений в нормальных условиях произрастания, в частности – цветение, плодоношение, старение, но и ответ растений на биотический стресс и атаку патогенов, а также играют важную роль в устойчивости растений к абиотическим стрессам [62]. Экзогенная обработка жасмонатами оказывает благоприятное влияние на рост и продуктивность растений при абиотических стрессах [63], вероятно за счет увеличения экспрессии и ферментативной активности антиоксидантных ферментов, активации аскорбат-глутатионового цикла, снижения окислительного повреждения, индуцированного АФК посредством накопления ЖК-индуцированного оксида азота. Обработка ЖК проростков пшеницы в условиях засухи вместе с ингибитором NO не приводит к повышению засухоустойчивости, что является доказательством участия NO в передаче сигнала от ЖК к аскорбат-глутатионовому циклу [64].

ЖК-Ile является единственной известной активной биомолекулой. Остальные жасмонаты превращаются в конъюгат ЖК с изолейцином, в дальнейшем это способствует взаимодействию

жасмоната с ZIM доменами факторов транскрипции JAZ и с F-box J-рецепторов убиквитинлигазы COI1, которые инициирует деградацию белков JAZ. Из-за того, что JAZ-протеины являются транскрипционными репрессорами, их деградация вызывает транскрипцию множества ЖК-зависимых генов. Активный гормон жасмонат опосредует белок-белковое взаимодействие, которое приводит к полиубиквитинированию и деградации белков JAZ протеасомой 26S. Транскрипционные факторы MYC2 могут далее активировать экспрессию генов, задействованных в сигнальном пути ЖК. Существует корепрессор TPL, который репрессирует сигналинг не только жасмонатов, но и этилена [62].

Последовательность промотора *TaMYB33* содержит четыре потенциальных отзвучивающих к МЖ мотива, что указывает на его участие в каскаде передачи сигналов жасмонатов. Избыточная экспрессия *TaMYB33* в *Arabidopsis* привела к усилению активности защитного гена *PDF1.2A*, что свидетельствует о том, что *TaMYB33* может быть звеном, объединяющим сигнальные каскады на биотический и абиотический стресс [65]. Экспрессия гена *TaEXPB23* экспанзина пшеницы индуцируется засухой и экзогенным применением МЖ. Промоторная область *TaEXPB23* содержит МЖ-чувствительный повтор, а избыточная экспрессия *TaEXPB23* в табаке увеличивает устойчивость растений при засолении [66].

Ген оксидиклазы пшеницы *TaAOC1* также объединяет ответ на ЖК, АБК и устойчивость к абиотическим стрессам. В растениях пшеницы экспрессия *TaAOC1* индуцируется засолением, засухой, обработкой АБК и МЖ. При избыточной экспрессии *TaAOC1* в растениях пшеницы и арабидопсиса наблюдалось повышение стресс-устойчивости, причем за счет увеличения биосинтеза ЖК и накопления MYC2. У мутанта *myc2-2* избыточная экспрессия *TaAOC1* повышает до этого момента слабую устойчивость к засолению, что позволяет предложить, что MYC2 является важным звеном в передаче сигнала ЖК. Вероятно, что MYC2 является точкой схождения в каскадах передачи сигналов АБК и ЖК при засолении. Перекрестное взаимодействие сигнальных путей ЖК и АБК интегрирует ответы растений на стрессовые условия внешней среды [67].

Сигнальные пути жасмонатов и цитокининов также взаимодействуют, поскольку предобработка МЖ вызывает транзитное накопление цитокининов в проростках пшеницы [68], что тоже важно учитывать при анализе стресс-устойчивости растений. ЖК и БС обладают разнонаправленным действием на растения при действии биотических стрессов. Так, БС способствуют восприимчивости риса к насекомым-вредителям путем воздействия на сигналинг жасмонатов. Атака на-

секомых-вредителей ингибирует путь передачи сигнала БС и активирует сигнальный путь ЖК [69]. Однако при действии абиотических стрессов ЖК и БС обладают синергичным действием, совместно усиливая устойчивость растений [53].

Этилен. Предшественником газообразного этилена, полиаминов, метионина и других аминокислот, получаемых из аспартата, является S-аденозилметионин (SAM). Дефицит воды вызывает накопление SAM, который участвует в лигнификации клеточных стенок растений путем метилирования мономеров лигнина, что позволяет избежать потери воды. АСС-синтаза превращает SAM в циклическую небелковую аминокислоту АСС, а затем АСС-оксидаза превращает АСС в этилен. Обычно этилен действует, как отрицательный регулятор роста. В ответ на стресс-факторы окружающей среды этилен останавливает рост, стимулирует старение растений, останавливает развитие зародыша и уменьшает налив зерна, влияет на распределение питательных веществ в растении [70, 71].

Этилен, как и цитокинин, воспринимается клеточными рецепторами, обладающими гистидин-киназной активностью и находящимися на мембранах эндоплазматического ретикулума, которые далее автофосфорилируются и запускают гистидин-аспартатфосфотрансферазную систему. В этой системе фосфаты передаются на гистидин-фосфотрансферазные белки, которые после этого активируют факторы транскрипции, известные как ERF [72]. ERF регулируют экспрессию этилен-зависимых генов путем прямого связывания с множественными *цис*-элементами в промоторных областях генов-мишеней ERF. Некоторые из этих белков способны интегрировать передачу сигналов не только этилена. Так, Sl-ERF.B3 воспринимает сигналы этилена и ауксина посредством регуляции экспрессии сигнального компонента ауксина *Sl-IAA27* [73].

Этилен и АБК действуют антагонистически по отношению друг к другу, что помогает временно десенсибилизировать ткани растений к АБК и поддерживать устьичную проводимость и фотосинтез [71], а также совместно активируют экспрессию некоторых увеличивающих устойчивость к стрессам белков ERF, в том числе TaERF1 и TaERF3 [72]. Засуха и тепловой стресс-фактор сильно стимулируют активность АСС-синтазы, вызывая накопление АСС в зернах, которая значительно ингибирует ферменты, необходимые для синтеза и накопления крахмала (синтетазы сахарозы, ADP-глюкофосфорилазы и синтетазы растворимого крахмала) и соответственно уменьшается налив зерна, ускоряется созревание и высыхание семян, инициируется раннее старение флагового листа. Ингибитор АСС-синтазы аминоксивинилглицин уменьшает вызванные этим

ферментом процессы [74]. Показано, что некоторые ERF играют важную роль в передаче сигналов при стрессовых воздействиях окружающей среды, например при засолении. Повышенная экспрессия этих факторов у растений сохраняет фотосинтетический потенциал, увеличивает накопление осмолитов, уменьшает накопление H_2O_2 , увеличивая устойчивость к засолению, засухе и низкой температуре [72], в то время как применение ингибиторов синтеза этилена уменьшают устойчивость растений к стрессовым условиям внешней среды [70]. Таким образом, применение ингибиторов восприятия и/или биосинтеза этилена при стрессовых воздействиях окружающей среды могут помочь в уменьшении стресс-индуцированных ответов растений на этилен, в том числе в поддержании роста и повышении урожайности. Кроме того, регуляция и гиперэкспрессия некоторых генов *ERF* (например, *TaERF1* и *TaERF3*) могут повысить общую устойчивость к стресс-факторам внешней среды [72].

Этилен и ауксин регулируют рост и развитие растений посредством убиквитин-опосредованного протеолиза транскрипционных репрессоров; убиквитинлигаза SCFTIR1/AFB гидролизует Aux/IAA и запускает транскрипционный сигналинг ауксинов, а убиквитинлигаза SOR1 контролирует этилен-зависимые реакции корней, изменяя стабильность белка Aux/IAA. Фермент SOR1 взаимодействует с OsIAA26 (атипичным белком Aux/IAA) и OsIAA9 (каноническим белком Aux/IAA), направляя OsIAA26 для убиквитин/26S-опосредованной протеасомной деградации, тогда как OsIAA9 защищает белок OsIAA26 от деградации, ингибируя активность убиквитинлигазы SOR1. Вероятно, модуль SOR1-OsIAA26 действует в нисходящем направлении передачи сигналов OsTIR1/AFB2-ауксин-OsIAA9 при регуляции ингибирования этиленом роста корней риса [75].

У этилена и полиаминов (путресцина, спермина и спермидина) есть общий предшественник, поэтому увеличение их продукции наряду с увеличением устойчивости растений к стрессору уменьшают стресс-индуцированное накопление этилена. Этилен часто действует совместно с СК и ЖК в регуляции защиты растений от вредителей и патогенов. Антагонистично действуют друг на друга пути передачи сигналов БС и этилена при регуляции процессов гравитропизма и активности антиоксидантных ферментов [60]. Взаимодействие этилена и БС, опосредованное H_2O_2 , наблюдается у растений томата в условиях засоления. Активность фермента синтеза этилена АСС увеличивается при предобработке растений БС, а снижение генерации этилена или подавление активности компонентов сигналинга этилена уменьшает индуцированную БС солеустойчивость [76].

Стриголактоны. Недавно охарактеризованные растительные гормоны, производные апокаротиноидов, участвуют в программах развития растений, а также в симбиотических отношениях в ризосфере всех исследованных до сих пор растений с помощью независимых путей рецепции и каскадов передачи сигнала. На сегодняшний день известны 20 СЛ, которые являются терпеноидными молекулами лактона с трициклическим кольцом АВС, ковалентно связанным с кольцом D через энол-эфирный мост, который считается биоактивной частью всех молекул семейства стриголактонов [77]. СЛ способны регулировать стресс-индуцированное формирование систем побега и корня, что очень важно при реализации программ устойчивости растений. Так, при воздействии стресс-факторов окружающей среды СЛ подавляют активность пазушной меристемы, направляя ресурсы в главный стебель и корень растений, а также стимулируют рост корневых волосков.

Биосинтез СЛ происходит преимущественно в корнях, а транспорт по растению в обоих направлениях, вероятно, осуществляется с участием переносчика PDR1, который имеет асимметричную локализацию на плазмалемме в зависимости от типа клеток корня, что определяет направление переноса СЛ. Кроме того, существует быстрый транспорт стриголактонов по ксилеме. Рецепторами СЛ у растений являются специфические α/β -гидролазы, после взаимодействия с которыми происходит деградация белка-репрессора [77]. Некоторые белки, задействованные в сигналинге стриголактонов, имеют сходство по своей аминокислотной последовательности с рецепторами ауксинов, жасмоновых кислот, а сам механизм передачи сигналов СЛ напоминает сигналинг гибберелинов.

Экзогенная обработка синтетическим аналогом СЛ (GR24) *Brassica napus* улучшает рост растений при засолении, повышает активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и пероксидазы [78], заметно тормозит стресс-индуцированное уменьшение массы тысячи зерен и урожайности озимой пшеницы [78], поэтому воздействие на каскад передачи сигнала СЛ в растениях с помощью генной инженерии является перспективным.

ПРОТЕИНКИНАЗЫ И ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ

Протеинкиназы – медиаторы стрессовых ответов и факторы транскрипции – мишени, чувствительные к фитогормонам и негормональным сигналам, являясь универсальными механизмами сигналинга в живых организмах. Использование молекулярно-генетических методов по отношению к этим белкам, а также к белкам теплового шока, способных регулировать сигналинг фито-

гормонов, перспективно в плане получения урожайных и стресс-устойчивых сортов растений.

Протеинкиназы. Растительные протеинкиназы SnRK1 активируются в ответ на стресс-индуцированное снижение энергоснабжения, вызывая усиление катаболизма и подавление энергозатратных анаболических процессов и роста. Сигналинг SnRK1 во время стресса блокируется сахарами [80]. SnRK2 субкласса III участвуют в каскаде передачи сигнала АБК, тогда как SnRK2 субкласса I и II – в реакциях на абиотические стрессы, в том числе на осмотический стресс, не затрагивая АБК [81], в то время как SnRK3 – важные регуляторы ионного гомеостаза, необходимые для выживания при засолении или стрессовых изменениях содержания питательных веществ в почве [4]. Воздействуя на количество или активность SnRK можно получить урожайные и стресс-устойчивые растения. Так, растения табака с избыточной экспрессией гена *SoSnRK2.1* обладают повышенной устойчивостью к засухе [82]. На растениях *Arabidopsis* показано, что неактивируемые АБК SnRK2.4 и SnRK2.10 при засолении повышают стресс-устойчивость, регулируя баланс АФК, воздействуя на активность антиоксидантных ферментов и экспрессию их генов [83].

Протеинкиназы TOR играют важную и антагонистическую SnRK1 роль в регуляции метаболизма и экспрессии генов [80]. TOR способствуют активации роста и биосинтетических процессов в ответ на доступность энергии в виде глюкозы [84]. Сигналинг SnRK1-TOR имеет решающее значение для адаптации растений к условиям окружающей среды и тесно переплетен с гормональными сигнальными путями. На активность TOR влияют ауксины и TOR в свою очередь регулируют экспрессию компонентов ауксинового сигналинга [85]. Кроме того, TOR стабилизирует фактор транскрипции BZR1 – компонент сигналинга БС [86] и индуцирует экспрессию генов, участвующих в сигналинге АБК, этилена, СК и ЖК, одновременно подавляя гены, участвующие в сигнальных путях БС, ГК, ауксинов и цитокининов [87]. Гиперэкспрессия генов TOR увеличивает устойчивость растений *Arabidopsis* к абиотическому стрессу [88].

Все стрессовые пути также включают митоген-активируемые протеинкиназы MAPK, которые имеют консервативную функцию стрессового сигнала в живых организмах. У растений обнаружено большое количество белков MAPK-киназного пути, быструю активацию нескольких из них регистрировали в растениях не только в ответ на стрессовые воздействия окружающей среды, но и в обычных условиях произрастания при воздействии сигналов роста и развития [89]. Так, низкая температура активирует MAPK-каскад у *Arabidopsis*, который в свою очередь контролирует экспрессию генов *COR* и устойчивость растений к

замерзанию [90]. Для реализации устойчивости к стрессовым факторам каскад МАРК является связующим звеном передачи сигнала от АФК к фитогормонам [18]. Показано и обратное: взаимодействие БС с элементами МАРК-каскада приводит к устойчивости табака к табачной мозаике [91].

Большое семейство рецептор-подобных киназ (RLK) участвует в защитных реакциях растений в ответ на абиотический стресс, объединяя ответы растений на обработку АБК, воздействие кальция и АФК. В рисе избыточная экспрессия гена *OsSIK1* приводит к увеличению засухоустойчивости посредством уменьшения количества устьиц. При участии RLK происходит стресс-индуцированная активация антиоксидантной системы, регулируется активность водных каналов и транспортеров ионов, увеличивается экспрессия АБК-индуцируемых генов. При воздействии стресс-факторов рецептор-подобная киназа CRLK1 может объединить накопление кальция с каскадом МАРК, поскольку CRLK1 связывается с кальцием и кальмодулином, взаимодействует с MEKK1 и необходим для активации МАРК при воздействии низкой температуры [92].

Факторы транскрипции. АБК-независимый путь развития стрессовых ответов опосредован несколькими семействами регуляторных факторов транскрипции. Абиотические стрессоры могут быть сигналом индукции факторов транскрипции семейства NAC и DREB через *NACRS (CACG)* и *DRE (G/ACCGAC)*-связывающие последовательности ДНК в промоторных областях и экспрессии стрессовых генов, независимых от АБК. Кроме DREB и белков домена NAC, гомодомен цинковый палец (ZFHD), за исключением ZFHD1, может независимо от АБК регулировать экспрессию стрессовых генов. Гиперэкспрессия транскрипционных факторов DREB1/CBF, DREB2 и SNAC под контролем подходящих промоторов увеличивает стресс-устойчивость растений [27].

Одно из самых больших семейств белков, способных взаимодействовать с ДНК и регулировать экспрессию генов роста, развития и защитных реакций растений на стресс являются факторы транскрипции WRKY. Быстрая, транзиторная и тканеспецифичная экспрессия WRKY начинается сразу, как только растение подвергается стрессу или воздействию регуляторных молекул. Например, у растений пшеницы транскрипция *TaWRKY70* увеличивается при атаке патогенов, влиянии низкой температуры, при обработке СК, этиленом, а снижается при действии высокой температуры и МЖ [93]. Факторы транскрипции WRKY способны прямо взаимодействовать с компонентами МАРК-киназного пути передачи сигналов [94], а также задействованы в АБК-опосредованном сигналинге [95]. Стресс-индуцированные защитные реакции

при участии WRKY реализуются за счет транскрипции стрессовых генов, регуляции осмотического и окислительного баланса растений [94].

Белки теплового шока. Абиотические стрессоры и патогенная атака приводят к накоплению белков теплового шока (HSP). *Arabidopsis* кодирует семь изоформ HSP90, четыре из которых являются цитоплазматическими, а остальные локализируются в хлоропластах, в митохондриях и в просвете эндоплазматического ретикулума, тогда как у кукурузы 15 изоформ HSP90 [96]. Многие HSP функционируют в качестве консервативных плейотропных молекулярных шаперонов для предотвращения денатурации белка и поддержания гомеостаза белка. Кроме того, HSP70, HSP90 и их ко-шапероны SGT1 и RAR1 связаны с целевым транспортом и деградацией белков, а также с сигналингом. Так, при патогенной атаке растений табака комплекс SGT1-HSP90 участвует в формировании реакции гиперчувствительности, индуцированной MEK2DD [97]. HSP90 способен взаимодействовать с BES1 и влиять на сигналинг БС [98]. Комплекс HSP90-SGT1 также участвует в передаче сигналов ЖК, ауксина и ГК [96, 98], что позволяет предположить наличие взаимосвязи шапероновой системы HSP90 с другими гормонами растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре рассмотрели различные сигнальные пути растений при воздействии абиотических и биотических стресс-факторов окружающей среды, с акцентом на взаимосвязь между каскадами передачи сигналов наиболее изученных сигнальных молекул – фитогормонов. В работе кратко описали пути биосинтеза фитогормонов, а также уже известные точки взаимодействия сигнальных фитогормонов и негормональных сигнальных молекул, изменение регуляции которых может привести к получению новых урожайных и стресс-устойчивых растений. Взаимодействие сигнальных путей у растений имеет сложный характер, бывает видо- и тканеспецифичным, синергичным и антагонистичным, зависит от концентрации рассматриваемых веществ. Среди многочисленных сигнальных путей есть общие, конвергентные точки. Нужно подчеркнуть, что комплексные знания о регуляции роста и развития растений в нормальных и стрессовых условиях произрастания помогут наметить перспективные направления работы генных инженеров и селекционеров для получения устойчивых и урожайных сортов сельскохозяйственных растений. На сегодняшний день очень важной задачей ученых является предоставление генетических маркеров, с которыми будут работать селекционеры.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 20-14-50236, № 20-04-00904 и выполнена в рамках

государственного задания (тема № АААА-А21-121011990120-7).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abhinandan K., Skori L., Stanic M., Hickerson N.M.N., Jamshed M., Samuel M.A.* Abiotic stress signaling in wheat – an inclusive overview of hormonal interactions during abiotic stress responses in wheat // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: 734. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00734>
2. *Romero-Puertas M.C., Terron-Camero L.C., Peláez-Vico M.A., Olmedilla A., Sandalio L.M.* Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress // *Environ. Exp. Bot.* 2019. V. 161. P. 107. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.012>
3. *Marques D.N., Carvalho M.E.A., Piotto F.A., Batagin-Piotto K.D., Nogueira M. L., Gaziola S.A., Azevedo R.A.* Antioxidant defense response in plants to cadmium stress // *Cadmium tolerance in plants* / Eds M. Hasanuzzaman et al. Academic Press. 2019. P. 423. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815>
4. *Zhu J.K.* Abiotic stress signaling and responses in plants // *Cell.* 2016. V. 167. P. 313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
5. *Medvedev S.S.* Calcium signaling system in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2005. V. 52. P. 249. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0038-1>
6. *Demidchick V., Shabala S.* Mechanisms of cytosolic calcium elevation in plants: the role of ion channels, calcium extrusion systems and NADPH oxidase-mediated 'ROS-Ca²⁺ Hub' // *Func. Plant Biol.* 2017. V. 45. P. 9. <https://doi.org/10.1071/FP16420>
7. *Mohanta T.K., Bashir T., Hashem A., Abd-Allah E.F., Khan A.L., Al-Harrasi A.S.* Early events in plant abiotic stress signaling: interplay between calcium, reactive oxygen species and phytohormones // *J. Plant Growth Regul.* 2018. V. 37. P. 1033. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9833-8>
8. *Yuan P., Yang T., Poovaiah B.W.* Calcium signaling-mediated plant response to cold stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19: 3896. <https://doi.org/10.3390/ijms19123896>
9. *Hou Q., Ufer G., Bartels D.* Lipid signalling in plant responses to abiotic stress // *Plant Cell Environ.* 2016. V. 39. P. 1029. <https://doi.org/10.1111/pce.12666>
10. *Liu X., Wang J., Sun L.* Structure of the hyperosmolality-gated calciumpermeable channel OSCA1.2 // *Nat. Commun.* 2018. V. 9: 5060. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07564-5>
11. *Ma Y., Dai X., Xu Y., Luo W., Zheng X., Zeng D., Pan Y., Lin X., Liu H., Zhang D., Xiao J., Guo X., Xu S., Niu Y., Jin J., et al.* COLD1 confers chilling tolerance in rice // *Cell.* 2015. V. 162. P. 1209. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.046>
12. *Finka A., Cuendet A.F.H., Maathuis F.J.M., Saidi Y., Goloubinoff P.* Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 3333. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095844>
13. *Jiang Z., Zhou X., Tao M., Yuan F., Liu L., Wu F., Wu X., Xiang Y., Niu Y., Liu F., Li C., Ye R., Byeon B., Xue Y., Zhao H., et al.* Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx // *Nature.* 2019. V. 572. P. 341. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1449-z>
14. *Wu F., Chi Y., Jiang Z., Xu Y., Xie L., Huang F., Wan D., Ni J., Yuan F., Wu X., Zhang Y., Wang L., Ye R., Byeon B., Wang W., et al.* Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis* // *Nature.* 2020. V. 578. P. 577. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2032-3>
15. *Zhang Y., Lv Y., Jahan N., Chen G., Ren D., Guo L.* Sensing of abiotic stress and ionic stress responses in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19: 3298. <https://doi.org/10.3390/ijms19113298>
16. *Saeng-ngam S., Takpirom W., Buaboocha T.S.C.* The role of the OsCam1-1 salt stress sensor in ABA accumulation and salt tolerance in rice // *J. Plant Biol.* 2012. V. 55. P. 198. <https://doi.org/10.1007/s12374-011-0154-8>
17. *Li T., Yan A., Bhatia N., Altinok A., Afik E., Durand-Smet P., Tarr P.T., Schroeder J.I., Heisler J.I.* Calcium signals are necessary to establish auxin transporter polarity in a plant stem cell niche // *Nat. Commun.* 2019. V. 10: 726. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08575-6>
18. *Raja V., Majeed U., Kang H., Iqbal K., John R.* Abiotic stress: interplay between ROS, hormones and MAPKs // *Env. Exp. Bot.* 2017. V. 137. P. 142. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>
19. *Tognetti V.B., Muhlenbock P., Van Breusegem F.* Stress homeostasis: the redox and auxin perspective // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02324.x>
20. *Nawas F., Shabbir R.N., Shahbaz M., Majeed S., Raheel M., Hassan W., Sohail M.A.* Cross talk between nitric oxide and phytohormones regulate plant development during abiotic stresses // *Phytohormones and signalling mechanisms and crosstalk in plant development and stress responses* / Ed M. El-Esawi. IntechOpen, 2017. P. 117. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68812>
21. *Liu N., Song F., Zhu X., You J., Yang Z., Li X.* Salicylic acid alleviates aluminum toxicity in soybean roots through modulation of reactive oxygen species metabolism // *Front. Chem.* 2017. V. 5: 96. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00096>
22. *Kai K., Kasa S., Sakamoto M., Aoki N., Watabe G., Yuasa T., Iwaya-Inoue M., Ishibashi Y.* Role of reactive oxygen species produced by NADPH oxidase in gibberellin biosynthesis during barley seed germination // *Plant Signal. Behav.* 2016. V. 11: e1180492. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1180492>
23. *Mamaeva A.S., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Moshkov I.E., Mur L.A.J., Hall M.A., Novikova G.V.* Regulatory role of nitric oxide in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 427. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040135>

24. Liu W., Li R., Han T., Cai W., Fu Z., Lu Y. Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2015. V. 168. P. 343. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00030>
25. Kuromori T., Seo M., Shinozaki K. ABA transport and plant water stress responses // Trends in Plant Sci. 2018. V. 23. P. 513. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.001>
26. Wani S.H., Kumar V., Shriram V., Sah S.K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants // The Crop J. 2016. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>
27. Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold and heat // Front. Plants Sci. 2014. V. 5: 170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00170>
28. Harrison M.A. Cross-talk between phytohormone signaling pathways under both optimal and stressful environmental conditions // Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants / Eds N. Khan et al. Springer-Verlag, 2012. P. 49. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25829-9>
29. Liu S., Lv Z., Liu Y., Li L., Zhang L. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana* // Genet. Mol. Biol. 2018. V. 41. P. 624. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0229>
30. Xu L., Yue Q., Xiang G., Bian F., Yao Y. Melatonin promotes ripening of grape berry via increasing the levels of ABA, H₂O₂, and particularly ethylene // Horticulture Research. 2018. V. 5: 41. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0045-y>
31. Zhong R., Thompson J., Ottesen E., Lamppa G.K. A forward genetic screen to explore chloroplast protein import *in vivo* identifies Moco sulfurase, pivotal for ABA and IAA biosynthesis and purine turnover // The Plant J. 2010. V. 63. P. 44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04220.x>
32. Nishiyama R., Watanabe Y., Fujita Y., Tien L.D., Kojima M., Werner T., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kakimoto T., Sakakibara H., Schmuelling T., Lam-Son P.T. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 2169. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087395>
33. Zhang Q., Li J.J., Zhang W.J., Yan S.N., Wang R., Zhao J.F., Li Y.J., Qi Z.G., Sun Z.X., Zhu Z.G. The putative auxin efflux carrier OsPIN3t is involved in the drought stress response and drought tolerance // The Plant J. 2012. V. 72. P. 805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05121.x>
34. Ke Q., Wang Z., Ji C.Y., Jeong J.C., Lee H.S., Li H., Xu B., Deng X., Kwak S.S. Transgenic poplar expressing *Arabidopsis YUCCA6* exhibits auxin-overproduction phenotypes and increased tolerance to abiotic stress // Plant Physiol. Biochem. 2015. V. 94. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.003>
35. Zwack P.J., Rashotte A.M. Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 4863. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv172>
36. Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Kudryakova N.V., Kusnetsov V.V. Role of cytokinins in stress resistance of plants // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 15. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010162>
37. Pekarova B., Szmitkowska A., Houser J., Wimmerova M., Hejatko J. Cytokinin and ethylene signaling // Plant structural biology: hormonal regulations / Eds J. Hejatko, T. Hakoshima. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. P. 165. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0>
38. Wilkinson S., Kudoyarova G.R., Veselov D.S., Arkhipova T.N., Davies W.J. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 3499. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>
39. Tran L.S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. P. 148. <https://doi.org/10.4161/psb.5.2.10411>
40. Kosova K., Prasil I.T., Vitamvas P., Dobrev P., Motyka V., Flokova K. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra // J. Plant Physiol. 2012. V. 169. P. 567. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.013>
41. Lo S., Ho N.D., Liu Y., Jiang M., Hsieh K., Chen K., Yu L., Lee M., Chen C., Huang T., Kojima M., Sakakibara H., Chen L., Yu S. Ectopic expression of specific GA2 oxidase mutants promotes yield and stress tolerance in rice // Plant Biotech. J. 2017. V. 15. P. 850. <https://doi.org/10.1111/pbi.12681>
42. Takehara S., Ueguchi-Tanaka M. Gibberellin // Plant structural biology: hormonal regulations / Eds J. Hejatko, T. Hakoshima. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. P. 83. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0>
43. Llanes A., Andrade A., Alemanno S., Luna V. Alterations of endogenous hormonal levels in plants under drought and salinity // Am. J. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1357. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.79129>
44. Plaza-Wuthrich S., Blossch R., Rindisbacher A., Cannarozi G., Tadele Z. Gibberellin deficiency confers both lodging and drought tolerance in small cereals // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 643. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00643>
45. Shahnejat-Bushehri S., Tarkowska D., Sakuraba Y., Balazadeh S. *Arabidopsis* NAC transcription factor JUB1 regulates GA/BR metabolism and signalling // Nature Plants. 2016. V. 2: 16013. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.13>
46. Tofighi C., Khavari-Nejad R.A., Najafi F., Razavi K., Rejali F. Responses of wheat plants to interactions of 24-epibrassinolide and *Glomus mosseae* in saline condition // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2017. V. 23. P. 557. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0439-6>
47. Avalbaev A., Bezrukova M., Allagulova C., Lubyanova A., Kudoyarova G., Fedorova K., Shakirova F. Wheat germ

- agglutinin is involved in the protective action of 24-epibrassinolide on the roots of wheat seedlings under drought conditions // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 146. P. 420.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.038>
48. *Planas-Riverola A., Gupta A., Betegon-Putze I., Bosch N., Ibanes M., Cano-Delgado A.I.* Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress // *Development.* 2019. V. 146: dev151894.
<https://doi.org/10.1242/dev.151894>
 49. *Wang H., Tang J., Liu J., Hu J., Liu J., Chen Y., Cai Z., Wang X.* Abscisic acid signaling inhibits brassinosteroid signaling through dampening the dephosphorylation of BIN2 by ABI1 and ABI2 // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. P. 315.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.013>
 50. *Singh A., Breja P., Khurana J.P., Khurana P.* Wheat brassinosteroid-insensitive 1 (TaBRI1) interacts with members of *TaSERK* gene family and cause early flowering and seed yield enhancement in *Arabidopsis* // *PLoS ONE.* 2016. V. 11: e0153273.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153273>
 51. *Li Q.F., Lu J., Yu J., Zhang C., He J., Liu Q.* The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth // *Biochimic. Biophys. Acta – Gene Regulatory Mechanisms.* 2018. V. 1861. P. 561.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.003>
 52. *Li W., Nishiyama R., Watanabe Y., Ha C.V., Kojima M., An P., Tian L., Tian C., Sakakibara H., Tran L.P.* Effects of overproduced ethylene on the contents of other phytohormones and expression of their key biosynthetic genes // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 128. P. 170.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.013>
 53. *Ohri P., Bhardwaj R., Kaur R., Jasrotia S., Parihar R.D., Khajuria A., Sharma N.* Emerging trends on crosstalk of BRS with other phytohormones // *Brassinosteroids: plant growth and development* / Eds S. Hayat et al. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. P. 425.
<https://doi.org/10.1007/978-981-13-6058-9>
 54. *Unterholzner S.J., Rozhon W., Papacek M.* Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2015. V. 27. P. 2261.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00433>
 55. *Shakirova F.M., Bezrukova M.V., Allagulova C.R., Maslennikova D.R., Lubyanova A. R.* Wheat germ agglutinin and dehydrins as ABA-regulated components of SA-induced cadmium resistance in wheat plants // *Salicylic acid: a multifaceted hormone.* Springer, Singapore, 2017. P. 77.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6068-7_5
 56. *Westfall C.S., Sherp A.M., Zubieta C., Alvarez S., Schraft E., Marcellin R., Ramirez L., Jez J.M.* Arabidopsis thaliana GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis // *PNAS.* 2016. V. 113. P. 13917.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1612635113>
 57. *Gabrisko M., Janecek S.* Novel family GH3 β -glucosidases or β -xylosidases of unknown function found in various animal groups, including birds and reptiles // *Carbohydr. Research.* 2015. V. 408. P. 44.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.02.004>
 58. *Kohli S.K., Handa N., Sharma A., Gautam V., Arora S., Bhardwaj R., Wijaya L., Alyemeni M.N., Ahmad P.* Interaction of 24-epibrassinolide and salicylic acid regulates pigment contents, antioxidative defense responses and gene expression in *Brassica juncea* L. seedlings under Pb stress // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018. V. 25. P. 15159.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1742-7>
 59. *Chen J., Yin Y.* WRKY transcription factors are involved in brassinosteroid signaling and mediate the crosstalk between plant growth and drought tolerance // *Plant Signal Behav.* 2017. V. 12: e1365212.
<https://doi.org/10.1080.15592324.2017.1365212>
 60. *Li J., Brader G., Palva E.T.* The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 319.
<https://doi.org/10.1105/tpc.016980>
 61. *Khan M.I.R., Iqbal N., Masood A., Per T.S., Khan N.A.* Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8: e26374.
<https://doi.org/10.4161/psb.26374>
 62. *Holland C.K., Jez J.M.* Structural biology of jasmonic acid metabolism and responses in plants // *Plant structural biology: hormonal regulations* / Eds J. Hejatko, T. Hakoshima. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. P. 67.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_5
 63. *Javadipour Z., Dehnavi M.M., Yadavi A.* Roles of methyl jasmonate in improving growth and yield of two varieties of bread wheat (*Triticum aestivum*) under different irrigation regimes // *Agricultural Water Management.* 2019. V. 222. P. 336.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.06.011>
 64. *Shan C., Zhou Y., Liu M.* Nitric oxide participates in the regulation of the ascorbate-glutathione cycle by exogenous jasmonic acid in the leaves of wheat seedlings under drought stress // *Protoplasma.* 2015. V. 252. P. 1397.
<https://doi.org/10.1007/s00709-015-0756-y>
 65. *Qin Y., Wang M., Tian Y., He W., Han L., Xia G.* Overexpression of *TaMYB33* encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis* // *Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 39. P. 7183.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-1550-y>
 66. *Han Y.Y., Li A.X., Li F., Zhao M.R., Wang W.* Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation // *Plant Physiol. Biochem.* 2012. V. 54. P. 49.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.007>
 67. *Zhao Y., Dong W., Zhang N., Ai X., Wang M., Huang Z.* A wheat allene oxide cyclase gene enhances salinity tolerance via jasmonate signaling // *Plant Physiol.* 2014. V. 164. P. 1068.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.227595>
 68. *Avalbaev A., Yuldashev R., Fedorova K., Somov K., Vysotskay L., Allagulova Ch., Shakirova F.* Exogenous methyljasmonate regulates cytokinin content by modulating cytokinin oxidase activity in wheat seedlings under salinity // *J. Plant Physiol.* 2016. V. 191. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.11.013>

69. Pan G., Liu Y., Ji L., Zhang X., He J., Huang J., Qiu Z., Liu D., Sun Z., Xu T., Liu L., Wang C., Jiang L., Cheng X., Wan J. Brassinosteroids mediate susceptibility to brown planthopper by integrating with the salicylic acid and jasmonic acid pathways in rice // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 4433.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery223>
70. Gharbi E., Martinez J. P., Benahmed H., Lepoint G., Vanpee B., Quinet M., Lutts S. Inhibition of ethylene synthesis reduces salt-tolerance in tomato wild relative species *Solanum chilense* // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 210. P. 24.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.12.001>
71. Pekarova B., Szmítowska A., Houser J., Wimmerova M., Hejatkó J. Cytokinin and ethylene signaling // *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations* / Eds.: J. Hejatkó, T. Hakoshima. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018. P. 165.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0>
72. Rong W., Qi L., Wang A., Ye X., Du L., Liang H. The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat // *Plant Biotechnol.* 2014. V. 12. P. 468.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12153>
73. Liu M., Chen Y., Chen Y., Shin J., Mila I., Audran C., Zouine M., Pirrello J., Bouzayen M. The tomato Ethylene Response Factor Sl-ERF.B3 integrates ethylene and auxin signaling via direct regulation of Sl-Aux/IAA27 // *New Phytol.* 2018. V. 219. P. 631.
<https://doi.org/10.1111/nph.15165>
74. Yang W., Li Y., Yin Y., Qin Z., Zheng M., Chen J. Involvement of ethylene and polyamines biosynthesis and abdominal phloem tissues characters of wheat caryopsis during grain filling under stress conditions // *Sci. Rep.* 2017. V. 7: 46020.
<https://doi.org/10.1038/srep46020>
75. Chen H., Ma B., Zhou Y., He S., Tang S., Lu X., Xie Q., Chen S., Zhang J. E3 ubiquitin ligase SOR1 regulates ethylene response in rice root by modulating stability of Aux/IAA protein // *PNAS.* 2018. V. 115. P. 4513.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1719387115>
76. Zhu T., Deng X., Zhou X., Zhu L., Zou L., Li P., Zhang D., Lin H. Ethylene and hydrogen peroxide are involved in brassinosteroids-induced salt tolerance in tomato // *Sci. Rep.* 2016. V. 6: 35392.
<https://doi.org/10.1038/srep35392>
77. Shtark O.Y., Zhukov V.A., Povydysh M.N., Avdeeva G.S., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Strigolactones as regulators of symbiotrophy of plants and microorganisms // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 151.
<https://doi.org/10.1134/S1021443718020073>
78. Ma N., Hu C., Wan L., Hu Q., Xiong J., Zhang C. Strigolactones improve plant growth, photosynthesis and alleviate oxidative stress under salinity in rapeseed (*Brassica napus* L.) by regulating gene expression // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8: 1671.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01671>
79. Sedaghat M., Sarvestani Z.T., Emam Y., Bidgoli A.M. Do phytohormones influence the grain quality and yield of winter wheat under drought conditions? // *J. Adv. Agric. Technol.* 2017. V. 4. P. 151.
<https://doi.org/10.18178/joaat.4.2.151-158>
80. Baena-Gonzalez E., Hanson J. Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2017. V. 35. P. 152.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.004>
81. Shinozawa A., Otake R., Takezawa D., Umezawa T., Komatsu R., Tanaka K., Amagai A., Ishikawa S., Hara Y., Kamisugi Y., Cuming A.C., Hori R., Ohta H., Takahashi F., Shinozaki R., et al. SnRK2 protein kinases represent an ancient system in plants for adaptation to a terrestrial environment // *Commun. Biol.* 2019. V. 2: 30.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0281-1>
82. Phan T., Sun H.B., Niu J., Tan Q., Li J., Yang L., Li Y. Overexpression of sugarcane gene *SoSnRK2.1* confers drought tolerance in transgenic tobacco // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1891.
<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2004-0>
83. Szymanska K.P., Polkowska-Kowalczyk L., Lichočka M., Maszkowska J., Dobrowolska G. SNF1-related protein kinases SnRK2.4 and SnRK2.10 modulate ROS homeostasis in plant response to salt stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: 143.
<https://doi.org/10.3390/ijms20010143>
84. Dobrenel T., Caldana C., Hanson J., Robaglia C., Vincenz M., Veit B., Meyer C. TOR signaling and nutrient sensing // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2016. V. 67. P. 261.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>
85. Schepetilnikov M., Dimitrova M., Mancera-Martinez E., Geldreich A., Keller M., Ryabova L.A. TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h // *EMBO J.* 2013. V. 32. P. 1087.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>
86. Zhang Z., Zhu J., Roh J., Marchise C., Kim S., Meyer C., Sun Y., Wang W., Wang Z. TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. P. 1854.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.005>
87. Dong P., Xiong F., Que Y., Wang K., Yu L., Li Z., Ren M. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis* // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6: 677.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>
88. Bakshi A., Moin M., Kumar M.U., Reddy A.B.M., Ren M., Datla R., Siddiq E.A., Kirti P.B. Ectopic expression of *Arabidopsis* target of Rapamycin (AtTOR) improves water-use efficiency and yield potential in rice // *Sci. Rep.* 2017. V. 7: 42835.
<https://doi.org/10.1038/srep42835>
89. de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling // *Trends Plant Sci.* 2016. V. 21. P. 677.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.004>
90. Liu Y., Zhou J. MAPping kinase regulation of ICE1 in freezing tolerance // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 91.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.12.002>
91. Deng X., Zhu T., Peng T., Xi D., Guo H., Yin Y., Zhang D., Lin H. Role of brassinosteroid signaling in modulating *Tobacco mosaic virus* resistance in *Nicotiana benthami*

- ana* // Sci. Rep. 2016. V. 6: 20579.
<https://doi.org/10.1038/srep20579>
92. Ye Y., Ding Y., Jiang Q., Wang F., Sun J., Zhu C. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 235.
<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2084-x>
93. Wang J., Tao F., An F., Zou Y., Tian W., Chen X., Xu X., Hu X. Wheat transcription factor TaWRKY70 is positively involved in high-temperature seedling plant resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 18. P. 649.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12425>
94. Jiang J., Ma S., Ye N., Jiang M., Cao J., Zhang J. WRKY transcription factors in plant responses to stresses // J. Integrative Plant Biology. 2017. V. 59. P. 86.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12513>
95. Fan Q., Song A., Jiang J., Zhang T., Sun H., Wang Y., Chen S., Chen F. CmWRKY1 enhances the dehydration tolerance of chrysanthemum through the regulation of ABA-associated genes // PLoS ONE. 2016. V. 11: e0150572.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150572>
96. di Donato M., Geisler M. HSP90 and co-chaperones: a multitaskers' view on plant hormone biology // FEBS Letters. 2019. V.593. P. 1415.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13499>
97. Ichimura K., Shinzato T., Edaki M., Yoshioka H., Shirasu K. SGT1 contributes to maintaining protein levels of MEK2DD to facilitate hypersensitive response-like cell death in *Nicotiana benthamiana* // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2016. V. 94. P. 47. <https://doi.org/>
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.04.001>
98. Jacob P., Hirt H., Bendahmane A. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance // Plant Biotech. J. 2017. V. 15. P. 405.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12659>

УДК 581.1

ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА МЕМБРАННОГО РЕЦЕПТОРА ЦИТОКИНИНА АНК2 ВЫЗЫВАЕТ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНУЮ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ТРАНС-ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ СТАРЕНИЯ ЛИСТЬЕВ *ARABIDOPSIS THALIANA*¹

© 2021 г. Н. В. Кудрякова^{a, *}, М. Н. Данилова^a, А. А. Андреева^a, А. С. Дорошенко^a,
А. В. Клепикова^{b, c}, В. Ю. Штратникова^d, В. В. Кузнецов^a

^aИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^bСколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

^cИнститут проблем передачи информации Российской академии наук, Москва, Россия

^dНаучно-исследовательский институт им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: nvkudryakova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 02.04.2021 г.

Принята к публикации 02.04.2021 г.

Старение листьев инициируется дифференциальной экспрессией генов транскрипционных факторов и контролируется различными фитогормонами, среди которых важная роль принадлежит цитокининам (ЦК), осуществляющим негативную регуляцию данного процесса. Согласно результатам проведенного нами транскриптомного анализа и ПЦР в режиме реального времени избранных генов, задержка старения листьев у мутантов с инактивированным геном рецептора ЦК АНК2 была связана с измененной экспрессией генов *транс*-факторов, принадлежащих к семействам AP2-EREBP, bHLH, C2H2, GATA, MYB, NAC и WRKY. Наиболее значимые количественные изменения у мутантов *ahk2*, по сравнению с листьями растений дикого типа, наблюдались в профиле экспрессии генов *bHLH38*, *bHLH39* и *bHLH100* из пула регуляторов поглощения железа. Значительно повышенные уровни транскриптов этих генов были сопряжены с активацией генов *FEP2* (*AT1G47395*) и *FEP3* (*AT1G47400*), способных при дефиците железа индуцировать экспрессию *bHLH38* и *bHLH39*. Увеличенная экспрессия генов *DREB26*, *ESE3*, *GATA4*, *ETC2* и *F11O4.13* сопровождалась повышенным накоплением транскриптов гена арабиногалактанового белка *AGP17*, а также генов *IBL1*, *BEE2*, *Ole e 1* и *GDSL*, связанных с регуляцией белков клеточной стенки. Таким образом, рецептор АНК2, с которым принято отождествлять вспомогательную роль в восприятии сигнала ЦК листьями, ассоциирован со специфичным набором генов, вовлеченных в регуляцию оттока железа и деградации компонентов клеточной стенки на финальных стадиях онтогенеза листа.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, старение, мутанты, транскриптом, *транс*-факторы, цитокинины

DOI: 10.31857/S0015330321060087

ВВЕДЕНИЕ

Старение листьев – сложный и строго регулируемый процесс, который является неотъемлемой частью программы развития растений [1]. В его основе лежит ремобилизация питательных компонентов, накопленных в стареющем листе, в молодые

листья или запасающие органы растения. У монокарпических растений, к числу которых относится *Arabidopsis*, старение листьев строго подчинено репродуктивной программе, на реализацию которой, вместе с тем, оказывают влияние сигналы среды [2]. Эта цепь событий сопровождается перепрограммированием транскриптома, которое инициируется дифференциальной экспрессией транскрипционных факторов (ТФ). Связываясь с *цис*-элементами промоторной области целевых генов, *транс*-факторы изменяют их экспрессию, вызывая активацию и/или подавление.

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизированных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321060087

Сокращения: ЦК – цитокинины, ОТ ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени после обратной транскрипции, АНК – *Arabidopsis Histidine Kinase*, ТФ – *транс*-фактор, ДТ – дикий тип.

Известно, что гены *транс*-факторов составляют 5–6% (примерно 1250 генов) от общего ядерного генома *Arabidopsis*, а в регуляции старения принимают участие около 200 генов, принадлежащих преимущественно к семействам NAC, WRKY, MYB, C2H2, zinc-finger, bZIP и AP2/EREB [3]. Некоторые из этих генов возникли в результате дупликаций генома *Arabidopsis* в процессе эволюции, что имело следствием появление дублированных пар с частичной генетической избыточностью, способствующей поддержанию механизмов функциональной компенсации при реализации программ старения. К их числу, в частности, относится ряд генов транскрипционных факторов семейства NAC, WRKY и TCP [4]. В процессе эволюции некоторые из этих *транс*-факторов смогли полностью сохранить сети сопряженных с ними целевых генов и характер пространственно-временной регуляции, тогда как другие, в условиях низкого селективного давления, приобрели новые функции за счет нейтральных мутаций.

Принято считать, что *транс*-факторы, индуцируемые при старении листьев, являются активными участниками этого процесса, тогда как ингибируемые *транс*-факторы, экспрессия которых подавляется, могут отражать общее падение активности листа и не быть его непосредственными регуляторами. Однако часть ингибируемых регуляторов может функционировать в молодых листьях в качестве репрессоров старения [3]. Этот механизм позволяет избежать энергетически затратных деструктивных процессов в молодых листьях, даже при неблагоприятных условиях среды.

Инициация и развитие старения листа связаны с комплексной активностью сигнальных путей различных фитогормонов, которые могут быть его позитивными или негативными регуляторами. При этом рост содержания некоторых позитивных регуляторов на поздних стадиях старения листа (этилен, салициловая и жасмоновая кислоты) определяется не только их регуляторной функцией, но и ролью в защите растений от инфекций, к которым стареющие листья особо восприимчивы [2]. Цитокинины (ЦК) являются универсальными ретардантами старения. Они влияют на этот процесс, главным образом, через регуляцию транскрипционной сети, действуя ниже участка восприятия гормонального сигнала [5]. Известно, что из двух рецепторов ЦК, которым принадлежит основная роль в восприятии сигнала ЦК в листьях, АНК3 отвечает за ЦК-зависимую задержку старения через специфичное фосфорилирование транскрипционного фактора ARR2 [6]. АНК2, напротив, является позитивным регулятором старения [7], однако молекулярные механизмы действия этого рецептора не вполне ясны. В процессе старения, безусловно, происходит также значительное изменение экспрессии пластидного генома. В предыдущей работе мы показали,

что регуляторное влияние рецепторов ЦК на геном пластид при старении может быть связано с изменением экспрессии ядерных генов, кодирующих аппарат транскрипции хлоропластов [7]. В представленном исследовании, опираясь на данные транскриптомного профилирования, мы предприняли попытку выяснить, какие транскрипционные факторы, участвующие в контроле старения листа, интегрированы с рецептором АНК2. Анализ предполагаемых мишеней таких *транс*-факторов позволит в дальнейшем выявить специфичные последовательности генов, регулируемые АНК2, которые вовлечены в сферу влияния этого рецептора в процессе старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования транскриптомов были выбраны одинарный и два двойных мутанта *Arabidopsis thaliana* (*ahk2*, *ahk2ahk3* и *ahk2ahk4*), несущих гомозиготную мутацию в гене АНК2, которая делает соотвествующий рецептор нефункциональным, а также исходный экотип Columbia-0 (дикий тип, ДТ). Мутанты имели пролонгированный период вегетации, что подтверждалось результатами анализа содержания хлорофилла, значений максимального квантового выхода ФСП F_v/F_m и экспрессии генов *SAG* [8]. Кроме того, в анализ включили двойной мутант *ahk3ahk4* с ускоренным старением, где АНК2 является единственным активным рецептором. Растения выращивали в почве при температуре 22°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль/(м² с). Для экспериментов использовали шестой лист 7-недельных растений.

Библиотеки мРНК для RNA-seq анализа получали на основе тотальной РНК, выделенной с помощью Trizol (Invitrogen) из шестого листа 7-недельных растений *Arabidopsis* [7]. Библиотеки готовили набором NEBNext Ultra II RNA Library Prep, с использованием NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module ("New England Biolabs", США) согласно инструкциям производителя (метод более подробно описан в статье [8]). Секвенирование проводили с использованием платформы Illumina HiSeq4000 ("Illumina Inc.", США) с получением не менее 25 миллионов одноконцевых чтений длиной 50 нуклеотидов. Дальнейшая обработка чтений проводилась с помощью программы CLC Genomics Workbench 7.0.3 ("Qiagen", Нидерланды). Полученные чтения были отфильтрованы по качеству с удержанием только тех позиций, которые имели качество больше 20 и чтений с длиной более 25 нуклеотидов и картированы на референсный геном *A. thaliana* (TAIR10) со следующими установками: доля выравненного участка – 100%, порог по уровню сходства – 94%, штраф за несовпадение – 2, штраф за индель – 3, допускаются только уникальные картирования. В результате было получено в среднем 22.5 миллионов высоко-

Таблица 1. Гены ТФ семейства *NAC*, которые изменяли свою экспрессию в два и более раза в листьях стареющих мутантных растений *A. thaliana*.

Название гена	Локус	FC*			
		<i>ahk2</i> /ДТ	<i>ahk2ahk3</i> /ДТ	<i>ahk2ahk4</i> /ДТ	<i>ahk3ahk4</i> /ДТ
<i>NAC3/ANAC055</i>	<i>AT3G15500</i>	–	–4.012	–	–3.925
<i>ORE1(NAC6)</i>	<i>AT5G39610</i>	–	–2.848		
<i>NAC046</i>	<i>AT3G04060</i>	–2.486	–4.660		
<i>AtNAP</i>	<i>AT1G69490</i>		–3.51		–4.67
<i>ATAF1</i>	<i>AT1G01720</i>				
<i>ORS1</i>	<i>AT2G41230</i>				
<i>VNI2</i>	<i>AT5G13180</i>		–2.120		
<i>JUB1</i>	<i>AT2G43000</i>		–3.582		
<i>NAC019</i>	<i>AT1G52890</i>		–6.134		
<i>RD26/ANAC07</i>	<i>AT4G27410</i>		–3.405		
<i>ANAC087</i>	<i>AT5G18270</i>		–10.588		
<i>NAC084</i>	<i>AT5G14000</i>	–5.924	–6.510	–4.529	–4.579
<i>NAC060</i>	<i>AT3G44290</i>				42.991
<i>NAC047</i>	<i>AT3G04070</i>	–3.333	–2.941	–9.090	

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

кокачественных уникально картированных чтений для каждого образца.

Для последующего подтверждения данных RNA-seq анализа относительный уровень транскриптов, обнаруживших наиболее значимые изменения в экспрессии, оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ ПЦР РВ) на приборе LigthCyclerR96 (“Roche”, Швейцария) согласно протоколу, описанному ранее [8]. Специфичные пары праймеров к исследуемым генам подбирали с помощью программы Vector NT11 (Дополнительные материалы табл. S1). В качестве референсного гена использовали *UBQ10*.

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. Достоверность различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью критерия Стьюдента. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференциальная экспрессия генов транс-факторов при старении листьев мутантов по гену АНК2

Из общего пула генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые выявили дифференциальную экспрессию у мутантов с инактивированным рецептором АНК2 (50 – у *ahk2*, 128 – у *ahk2ahk3* и 24 – у *ahk2ahk4*) мы выделили гены ТФ, участвующие в регуляции старения [1,

3, 4]. Далее эти гены, были классифицированы по семействам с использованием списка генов ТФ сайта AtTFDB (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB/>).

Центральными участниками в модуляции транскрипционных изменений при старении принято считать семейства *NAC* и *WRKY* [3]. Максимальное число генов *NAC*, обнаруживших пониженную по сравнению с диким типом экспрессию, отмечено у мутанта *ahk2/3* (табл. 1), для которого характерны наиболее замедленные темпы старения [8]. В их число входили не только позитивные (*ORE1/6*, *ANAC046*, *NAP*, *NAC019*), но и негативные (*VNI2/83*, *JUB1/42*) регуляторы старения [9, 4]. Возможной причиной подавления экспрессии негативных регуляторов может быть их одновременное участие в регуляторных сетях, не связанных со старением. При этом пониженная экспрессия, выявленная для *NAC084* у всех исследованных мутантов, не зависела от типа или числа инактивированных рецепторов. Можно предполагать, что регуляция экспрессии этого гена определяется скорее нарушениями в нормальном восприятии цитокининового сигнала, чем пролонгированным или укороченным периодом вегетации листьев. Более предсказуемой оказалась реакция позитивного регулятора старения *NAC060*. У мутанта *ahk3/4* уровень транскриптов *NAC060* был повышен более, чем в 40 раз по сравнению с диким типом (табл. 1). *NAC060* в свою очередь, способен регулироваться абсцизовой кислотой через фактор транскрипции *ABI4* и ослаблять ее эф-

Таблица 2. Гены ТФ семейства *WRKY*, которые изменяли свою экспрессию в два и более раза в листьях стареющих мутантных растений *A. thaliana*.

Название гена	Локус	FC*			
		<i>ahk2</i> /ДТ	<i>ahk2ahk3</i> /ДТ	<i>ahk2ahk4</i> /ДТ	<i>ahk3ahk4</i> /ДТ
<i>WRKY6</i>	<i>AT1G62300</i>	—	–2.809	—	
<i>WRKY18</i>	<i>AT4G31800</i>	—			3.297
<i>WRKY54</i>	<i>AT2G40750</i>	5.807		5.214	4.576
<i>WRKY70</i>	<i>AT3G56400</i>			4.053	
<i>WRKY75</i>	<i>AT5G13080</i>		–15.123		
<i>WRKY45</i>	<i>AT3G01970</i>		–3.276		
<i>WRKY53</i>	<i>AT4G23810</i>		–3.426		
<i>WRKY16</i>	<i>AT5G45050</i>		2.654		

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

фект, определяя тем самым нечувствительность к сахарам [10].

Семейство *WRKY*, так же, как и семейство *NAC*, включает позитивные и негативные регуляторы старения. Сниженная экспрессия была отмечена лишь у линии *ahk2ahk3* и только для позитивных регуляторов старения в соответствии с пролонгированным онтогенезом этого мутанта (табл. 2). Наиболее сильно (до 15 раз) была подавлена экспрессия гена *WRKY75*, который ускоряет старение, стимулируя, образование салициловой кислоты и частично подавляет транскрипцию *CATALASE2* [11]. Несколько слабее оказалась ингибирована экспрессия позитивного регулятора *WRKY45*, который стимулирует старение за счет взаимодействия с *DELLA* белком *RGL1* [12], а также позитивных регуляторов *WRKY6* и *WRKY53*, способных напрямую связываться с промоторами различных *SAG* генов, ассоциированных со старением [13, 14]. Негативный регулятор старения *WRKY54*, который одновременно является позитивным регулятором защитных реакций растений, продемонстрировал значительный рост экспрессии у всех мутантов за исключением *ahk2ahk3*, и, возможно, эта активация *WRKY54* была связана с защитой стареющих листьев растений от инфекций. Заметим в этой связи, что *WRKY54* коэкспрессируется с геном ответа на патогены и циркадные ритмы *PCC1*, увеличенный уровень транскриптов которого по сравнению с диким типом также был выявлен у всех изученных мутантов (9.72 – для *ahk2*/ДТ, 13.35 – для *ahk2ahk3*/ДТ и 6.19 – для *ahk3ahk4*/ДТ).

Помимо ТФ *NAC* и *WRKY* измененная экспрессия в транскриптомах стареющих листьев мутанта *ahk2ahk3* была характерна также для членов семейств *AP2-EREBP*, *bHLH*, *C2H2*, *MYB* и *GATA*. Однако дифференциальная экспрессия генов этих *транс*-факторов, как и членов семейств *NAC* и *WRKY*, выявляемая только у мутанта

ahk2ahk3, могла быть обусловлена его пролонгированным онтогенезом, не интегрированным напрямую с рецептором АНК2, через компенсаторный механизм, связанный с экспрессией генов семейства *SAUR (SMALL AUXIN UP RNAs)* и пула генов транспорта и сигналинга ауксинов [8]. При этом особенностью транскрипционного профиля мутанта *ahk3/4* с активным рецептором АНК2 было отсутствие значимых изменений в экспрессии каких-либо генов ТФ, вовлеченных в контроль естественного старения, за исключением *NAC060*. Основываясь лишь на профиле транскриптов этого мутанта, предполагать состав транскрипционной регуляторной сети, определяющей его ускоренное старение за счет рецептора АНК2, довольно сложно.

В этой связи мы сосредоточили наше внимание на транскрипционных факторах, которые выявили дифференциальную экспрессию по меньшей мере у двух мутантов с инактивированным геном рецептора АНК2. Среди членов семейств *NAC* и *WRKY* только позитивные регуляторы старения *ANAC046* и *ANAC047* продемонстрировали сниженную экспрессию одновременно у *ahk2* и *ahk2/3*. В списке генов ТФ с резко увеличенной экспрессией у обоих мутантов присутствовали два представителя семейства *ERF/AP2 DREB26* и *ESE3* (табл. 3). Семейство *ERF (ethylene-responsive element-binding factor family)* содержит у *Arabidopsis* 147 членов, сгруппированных в четыре подсемейства: *AP2*, *DREB*, *ERF* и *RAV*. В качестве транскрипционных факторов белки семейства играют ключевую роль во многих регуляторных процессах и интегрируют метаболические, гормональные и внешние сигналы, связанные с адаптацией к стрессам и ретроградным сигналингом [15].

Значимое превышение у мутантов по сравнению с диким типом (в 53.54 раза для *ahk2* и 53.01 для *ahk2ahk3*) отмечено в уровне транскриптов гена *ETC2 (AT2G30420)*, кодирующего *MYB транс*-фактор *R3*-типа (табл. 3). Белок *ETC2* участвует в дифференциации клеток эпидермиса *A. thaliana*,

Таблица 3. Гены ТФ, вовлеченные согласно списку Balazadeh et al. [3] в контроль старения листьев, которые изменяли свою экспрессию одновременно у двух мутантов по гену *АНК2*

Название ТФ	Семейство	Локус	FC*		
			<i>ahk2</i>	<i>ahk2ahk3</i>	<i>ahk2ahk4</i>
<i>T11P11.2</i>	C2H2	<i>AT2G28710</i>	-3.144	-5.984	
<i>bHLH38</i>	bHLH	<i>AT3G56970</i>	248.281	522.276	137.514
<i>DREB26</i>	AP2	<i>AT1G21910</i>	59.361	8.593	
<i>ESE3</i>	AP2	<i>AT5G25190</i>	30.682	26.118	
<i>F11O4.13</i>	bHLH	<i>AT4G01460</i>	35.049	47.868	
<i>GATA4</i>	GATA	<i>AT3G60530</i>	3.772	2.700	
<i>ETC2</i>	MYB	<i>AT2G30420</i>	53.54	53.01	

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена.

репрессировав образование трихом и индуцируя дифференциацию корневых волосков [16]. Помимо названных функций белки семейства могут оказывать плейотропный эффект на развитие растений и время цветения, одновременно взаимодействуя с регуляторными каскадами, интегрирующими взаимодействие фитогормонов, белков клеточной стенки и структур цитоскелета [17]. Определенный интерес с точки зрения возрастных изменений клеточной стенки представляет сохранение у *ahk2* и *ahk2/3* умеренно повышенной экспрессии гена *GATA4* (*At3g60530*) из одноименного семейства *транс*-факторов, который, согласно литературным данным, коэкспрессируется с генами сборки клеточной стенки, включая гены, кодирующие экспансины, арабиногалактановые белки и гликозилгидролазы [18].

Максимальный рост экспрессии у мутантов по сравнению с диким типом (от 137 до 522 раз) был характерен для транскриптов гена *bHLH38* (*basic helix-loop-helix 38*) из подгруппы 1b семейства *bHLH*, участвующего в регуляции генов поглощения железа [19]. При этом *bHLH38* оказался единственным геном из списка *транс*-факторов, активация или сохранение повышенной экспрессии которого были отмечены у всех трех нокаут мутантов по гену *АНК2* (табл. 3). Параллельно старение листьев у растений дикого типа сопровождалось существенным снижением (вплоть до нулевых значений) уровня транскриптов генов, относимых к функциональной подкатегории “iron” – железо.

Еще один член семейства *bHLH* *F11O4.13* с резко повышенным уровнем транскриптов у мутантов *ahk2* и *ahk2ahk3* (в 37 и 47 раз соответственно) относится к подгруппе *транс*-факторов bHLH, члены которого способны взаимодействовать с комплексом компонентов SWI/SNF. Этот комплекс обеспечивает ремодуляцию хроматина, лежащую в основе многих онтогенетических программ. *F11O4.13* физически связывается с

АТФ-азой Brahma (BRM) этого комплекса, которая за счет изменения нуклеосомной позиции или конформации открывает доступ специфичным ДНК связывающим белкам к геномной ДНК [20].

Пониженная экспрессия одновременно у мутантов *ahk2* и *ahk2ahk3* была выявлена для гена *T11P11.2*, кодирующего белок, относимый к подсемейству C2H2 семейства *транс*-факторов с доменами типа “цинковые пальцы” (табл. 3). Белки, содержащие домены цинкового пальца, играют важную роль в эукариотических клетках, регулируя различные пути передачи сигналов и контролируя развитие и программируемую гибель клеток [21].

Избирательная проверка методом ОТ ПЦР РВ относительного уровня транскриптов генов, обнаруживших наиболее значимые изменения в экспрессии, подтвердила данные, выявленные при секвенировании транскриптомов, хотя значения, полученные при использовании ОТ ПЦР РВ, были, как правило, ниже, чем следовало из результатов RNA-seq анализа. На рисунке 1 приведены графики полученных результатов. По сравнению с растениями дикого типа у мутантов с инактивированным геном *АНК2* была достоверно увеличена экспрессия генов семейства *bHLH* (*bHLH38* и *F11O4.13*), а также генов семейства *ERF/AP2* (*ETC2*, *DREB26* и *ESE3*). Следует, однако, отметить, что уровень транскриптов гена *DREB26* был существенно повышен лишь у мутанта *ahk2ahk3*, а накопление транскриптов *F11O4.13*, *ETC2* и *ESE3* оказалось, кроме того, достоверно выше у мутанта *ahk2ahk4*.

Подводя итоги проведенного анализа, следует заключить, что транскрипционные факторы с дифференциальной экспрессией у мутантов по гену *АНК2* различались по своим функциям. Все они могли участвовать в контроле продолжительности жизненного цикла мутантов и подчинялись прямой или опосредованной регуляции со стороны рецепторов ЦК.

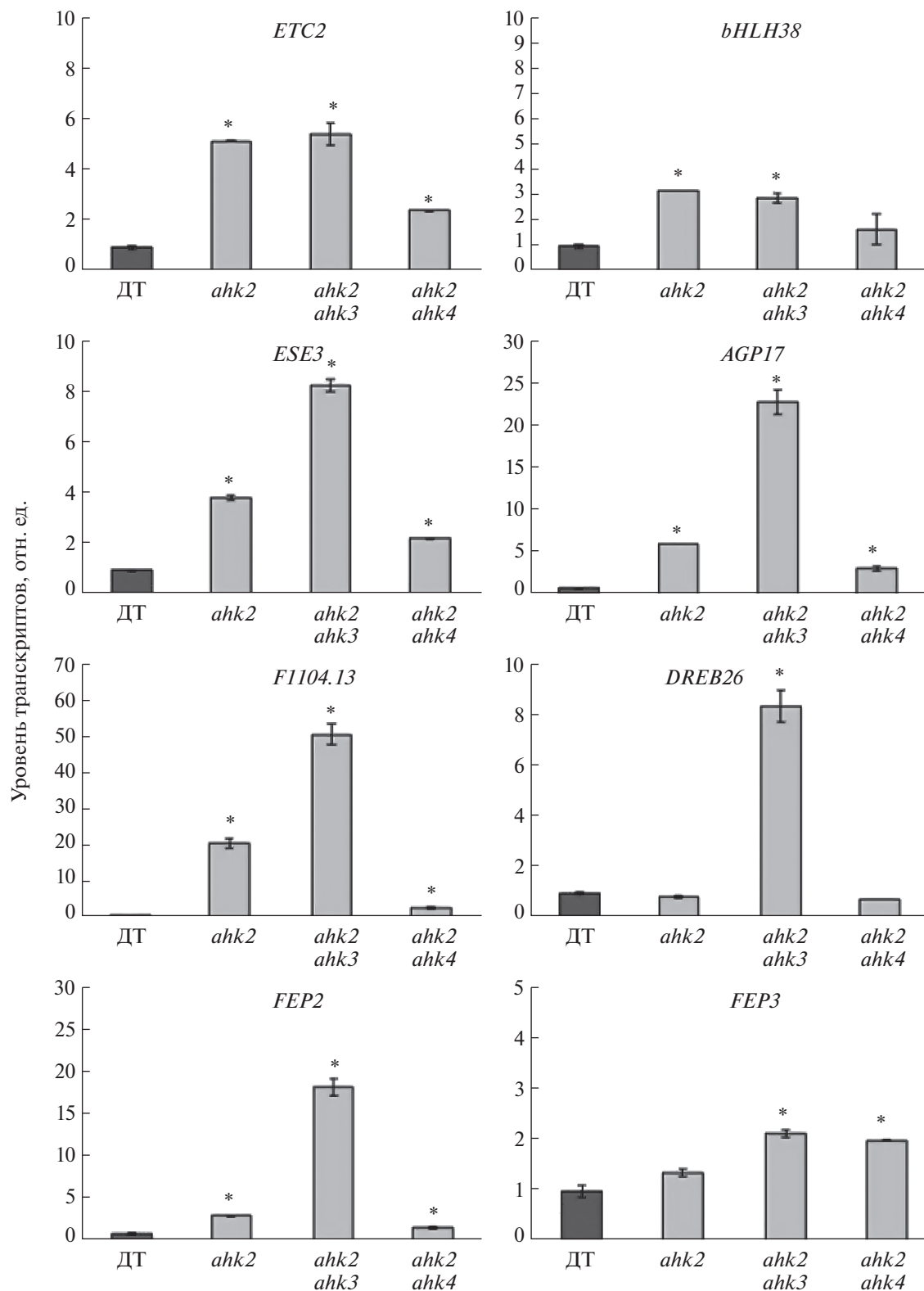


Рис. 1. Избирательная проверка методом ОТ ПЦР РВ относительного уровня транскриптов генов, обнаруживших значимые изменения в экспрессии у мутантов с инактивированным геном АНК2 по сравнению с растениями дикого типа. РНК выделяли из шестого листа 7-недельных растений *A. thaliana*. Данные представлены в виде средних значений трех биологических повторов и ошибки среднего. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента. * $P \leq 0.05$.

Таблица 4. Гены, коэкспрессирующиеся с генами АНК2-зависимых транскрипционных факторов при старении листьев *Arabidopsis*

Название гена	Локус	FC*		
		<i>ahk2</i>	<i>ahk2ahk3</i>	<i>ahk2ahk4</i> **
<i>AGP 17</i>	<i>AT2G23130</i>	20.83	41.58	
<i>IBL1</i>	<i>AT4G30410</i>	9.18	10.78	
<i>BEE2</i>	<i>AT4G36540</i>	5.91	12.12	
<i>Ole e 1</i>	<i>AT5G13140</i>	14.10	46.69	
<i>GDSL</i>	<i>AT4G01130</i>	4.61	7.31	
<i>bHLH39</i>	<i>AT3G56980</i>	119.29	191.17	
<i>bHLH100</i>	<i>AT2G41240</i>		44.29	
<i>FEP2</i>	<i>AT1G47395</i>	5.90	12.11	
<i>FEP3</i>	<i>AT1G47400</i>	9.07	14.4	

Примечание: * FC (fold change) – изменение уровня экспрессии гена. ** В мутанте *ahk2ahk4* значимых различий не обнаружено по данным RNA-seq анализа, однако при анализе отдельных генов ОТ ПЦР РВ были получены некоторые различия.

Анализ генов, коэкспрессирующихся с генами АНК2-зависимых транскрипционных факторов, при старении листьев A. thaliana

Для выявления возможных функций транскрипционных факторов в регуляции старения нами был проведен анализ *in silico* коэкспрессирующихся с ними генных сетей (*bar.utoromto.ca*) и последующее сопоставление баз данных с транскриптомными профилями мутантов. Повышенный уровень экспрессии двух представителей семейства ERF/AP2 *DREB26* и *ESE3* сопровождался активацией гена *AGP17* (*AT2G23130*), который кодирует арабиногалактановый белок, локализованный в плазматических мембранах и нитях Гекта (Hechtian strands) [22]. AGP участвуют в различных процессах, например, в пролиферации клеток, передаче клеточных сигналов, нацеливании на пыльцевые трубки во время прогамной фазы развития растений, а также в запрограммированной гибели клеток, опадении органов и во взаимодействиях с микробами и регуляторами растений. Резко повышенный уровень транскриптов *AGP17* в листьях мутантов (табл. 4), подтвержденный данными ОТ ПЦР РВ (рис. 1), свидетельствует о несомненной роли рецептора АНК2 в ускоренной деградации клеточной стенки. Таким образом, ЦК могут влиять на процесс старения, контролируя не только донорно-акцепторные отношения за счет активности инвертазы клеточной стенки и гексокиназы [23], но и регулируя синтез арабиногалактановых белков.

Среди генов, корегулируемых с геном семейства *bHLH F1104.13*, выраженное изменение уровня транскриптов отмечалось для гена негативного ответа на брассиностероиды и удлинение клеток *IBL1* (*INCREASED LEAF INCLINATION1 BINDING bHLH1, AT4G30410*) и гена *BEE2* (*BR-ENHANCED EXPRESSION 2, AT4G36540*), коди-

рующего компонент передачи сигнала брассиностероидов и также участвующего в регуляции удлинения клеток (табл. 4) [24, 25]. Увеличенный уровень транскриптов выявлен, кроме того, для гена *AT5G13140* (табл. 4). *AT5G13140* кодирует белок аллергена пыльцы и семейства экстензинов *Ole e 1* (*Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein*) [26]. Можно заключить, что *F1104.13* наряду с *GATA4*, *DREB26* и *ESE3* входит в сеть регуляторов модификации компонентов клеточной стенки при участии цитокининов и брассиностероидов, однако детали функционирования этой системы нуждаются в дополнительных исследованиях. К этой системе может также относиться MYB *транс*-фактор R3-типа ETC2, который, как отмечалось выше, способен интегрировать взаимодействие фитогормонов и белков клеточной стенки [17]. Коэкспрессия этого *транс*-фактора с геном липазы *GDSL* (*GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein, AT4G01130*) у мутантов (табл. 4) позволяет предполагать участие рецепторов ЦК в регуляции липидного обмена при старении листьев.

В сети генов, корегулируемых с *bHLH38*, мы нашли два гена *bHLH39* и *bHLH100* из подгруппы 1b *bHLH* с дифференциальной экспрессией в листьях мутантов по гену *АНК2* (табл. 4). Все эти *транс*-факторы, принимают участие в обеспечении поглощения железа и поддержания его гомеостаза. Совместно с ключевым *bHLH* белком FIT (*FER-LIKE DEFICIENCY INDUCED*) они активируют гены *FRO2* и *IRT1*, кодирующие Ферредуктооксидазу и транспортер железа, соответственно [19]. Однако, согласно данным RNA-seq анализа библиотек стареющих листьев, названные гены (*FIT, FRO2* и *IRT1*), а также еще ряд генов, связанных с метаболизмом железа, не отличались по уровню экспрессии у мутантов и дикого типа.

Вместе с тем, два гена из пула регуляторов ответа на дефицит железа *FEP2* (*AT1G47395*) и *FEP3* (*AT1G47400*) (FE-UPTAKE-INDUCING PEPTIDE 2 и 3) оказались существенно ингибированы у растений дикого типа по сравнению с нокаут мутантами *ahk2* и *ahk2ahk3* (табл. 4). Эти особенности экспрессии генов, регулирующих метаболизм железа, соответствовали данным ОТ ПЦР РВ анализа, но изменения в уровне их относительной экспрессии у мутантов (рис. 1), были, как правило, ниже, чем следовало из результатов RNA-seq анализа. Как и для генов *F11O4.13*, *ETC2* и *ESE3*, уровень транскриптов *FEP2* и *FEP3* оказался достоверно выше у мутанта *ahk2ahk4*, по сравнению с растениями дикого типа.

Полученные нами данные в определенной степени согласуются с работой Нугауама и коллег [27], которые впервые обнаружили участие продуктов генов *FEP* в регуляции экспрессии ответа на недостаточность железа. Эти исследователи установили, что три гена *FEP* кодируют короткие полипептиды (менее 100 аминокислот), способные при дефиците железа индуцировать экспрессию *bHLH38* и *bHLH39* независимо от FIT. При этом у мутанта *sep1* и только в побегах активировались *bHLH38*, *bHLH39* и *FEP2*, но не *FRO2* и *IRT1*. Параллелизм в характере регуляции генов метаболизма железа в стареющих листьях *Arabidopsis* и у мутанта с недостаточностью пептида, индуцирующего поглощение железа, свидетельствует, что FEP-зависимый регуляторный механизм ответа на обеспеченность железом функционирует и при ремобилизации питательных компонентов, накопленных в стареющем листе. При этом уровень экспрессии генов *FEP* может определяться уровнем гема или других молекул, координирующих содержание железа.

Физиологическая взаимосвязь между рецептором ЦК АНК2 и метаболизмом железа в стареющих листьях несомненна, хотя она может быть не прямой. Не исключено, что она связана с влиянием этого рецептора на возрастные параметры листа, детерминирующие отток железа, однако конкретные цепочки, объединяющие эти взаимозависимые сигналы, нуждаются в дополнительных исследованиях. Ранее было показано, что при регуляции поглощения железа корнями экзогенный цитокинин репрессирует гены *FIT*, *FRO2* и *IRT1* на уровне накопления транскриптов, и это подавление опосредовано рецепторами АНК3 и АНК4 [28]. Однако сигналы ЦК и дефицита железа действовали через различные метаболические пути, поскольку негативная регуляция цитокининами гена *IRT1* не зависела от доступности железа. Цитокинины, по мнению авторов исследования, косвенно воздействовали на аппарат поглощения железа, модифицируя архитектуру корней.

Реализация сигнала ЦК при участии рецепторов происходит с помощью двух групп ТФ – ARR типа В (MYB-подобных ДНК-связывающих белков) и CRF (Cytokinin Response Factors) из семейства ERF/AP2. Важно заметить, что анализ промотора гена *bHLH38* выявил в пределах последовательности в 500 п.н. вверх от стартового кодона ATG *cis*-элементы для таких *транс*-факторов как ARR1, ARR2, ARR11 и ARR14 (AthaMap server). Таким образом, ЦК через рецептор АНК2 может напрямую влиять на метаболизм железа при старении листьев, что не исключает, однако, существование механизмов опосредованной регуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты секвенирования транскриптомов и их последующая выборочная оценка методом ПЦР в режиме реального времени показали, что цитокинин-зависимый контроль продолжительности жизни листьев, регулируемый рецептором АНК2, интегрирован с изменением профилей экспрессии генов ряда *транс*-факторов семейств NAC, AP2-EREBP, bHLH, MYB и GATA. Задержка естественного старения листьев у мутантов с инактивированным геном АНК2 сопровождалась резко повышенной экспрессией генов семейства ERF/AP2 *DREB26* и *ESE3* и корегулируемого с ними гена арабиногалактанового белка *AGP17*. Помимо *DREB26* и *ESE3* в сеть сопряженных с АНК2 регуляторов модификации компонентов клеточной стенки могли входить ген *GATA4* (*AT3G60530*), коэкспрессирующийся с генами экспансинов, арабиногалактановых белков и гликозилгидролазы [18], а также гены *ETC2* (семейство MYB) и *F11O4.13* (семейство bHLH), участвующие во взаимодействии brassinостероидов и генов белков клеточной стенки. Таким образом, непосредственными мишенями рецептора АНК2 в стареющих листьях являются гены компонентов клеточных стенок и связанных с ними регуляторов. Наряду с этим, *F11O4.13* через комплекс компонентов SWI/SNF мог влиять на ремодуляцию хроматина, лежащую в основе реализации многих онтогенетических программ [20].

Наиболее значимые количественные изменения у мутантов с инактивированным рецептором АНК2 наблюдались в профиле экспрессии генов *bHLH38*, *bHLH39* и *bHLH100* из пула регуляторов поглощения железа. Увеличение их экспрессии у мутантов по гену АНК2 сопровождалось повышенным накоплением транскриптов генов *FEP2* и *FEP3*, кодирующих короткие полипептиды, которые при дефиците железа способны индуцировать экспрессию *bHLH38* и *bHLH39* [27]. Хотя анализ *in silico* промотора гена *bHLH38* свидетельствовал о возможном присутствии в нем *cis*-элементов для *транс*-факторов ARR1, ARR2, ARR11 и ARR14 из цепи трансдукции сигнала ЦК, непо-

средственные механизмы взаимодействия генов сигналинга ЦК и регуляции оттока железа в стареющих листьях требуют дополнительных исследований, включающих анализ связывания ЦК-зависимых *транс*-факторов с промоторами генов-регуляторов метаболизма железа.

Полученные в настоящей работе данные об особенностях экспрессии генов *транс*-факторов у мутантов по рецепторам ЦК могут служить стартовым звеном в расшифровке модулей, связывающих рецептор АНК2 и реализацию программы старения листьев. Суммируя результаты проведенного исследования, следует подчеркнуть, что этот рецептор, с которым принято отождествлять вспомогательную роль в восприятии сигнала ЦК [29] листьями, ассоциирован со специфичным набором генов, вовлеченных в регуляцию оттока железа и деградации компонентов клеточной стенки на финальных стадиях онтогенеза листа. Таким образом, несмотря на частичную генетическую избыточность и перекрывающиеся функции, рецепторы ЦК АНК2 и АНК3 могут действовать независимо, регулируя при старении листа различные сети целевых генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00065. Результаты, представленные на рис. 1, получены за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0106-2019-0001). Секвенирование и биоинформатический анализ данных секвенирования проводили в ЦКП геномики Сколковского института науки и технологии.

Авторы выражают благодарность руководителю ЦКП геномики Сколковского института науки и технологии к.б.н. Логачевой М.Д. за оказанную помощь при проведении данного исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach // *Plant Biotechnol. J.* 2003. V. 1. P. 3. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00004.x>.
2. Jibrán R., Hunter D.A., Dijkwel P.P. Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 82. P. 547. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0043-2>.
3. Balazadeh S., Riaño-Pachón D.M., Mueller-Roeber B. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Biol.* 2008. V. 10 P. 63. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00088.x>.
4. Li Z., Woo H.R., Guo H. Genetic redundancy of senescence-associated transcription factors in *Arabidopsis*. // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 811. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx345>
5. Raines T., Shanks C., Cheng C.Y., McPherson D., Argueso C.T., Kim H.J., Franco-Zorrilla J.M., López-Vidriero I., Solano R., Vaňková R., Schaller G.E., Kieber J.J. The cytokinin response factors modulate root and shoot growth and promote leaf senescence in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2016. V. 85. P. 134. <https://doi.org/10.1111/tpj.13097>.
6. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by ANK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 2006. V. 103. P. 814. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>.
7. Danilova M.N., Kudryakova N.V., Doroshenko A.S., Zabrodin D.A., Rakhmankulova Z.F., Oelmüller R., Kusnetsov V.V. Opposite roles of the *Arabidopsis* cytokinin receptors ANK2 and ANK3 in the expression of plastid genes and genes for the plastid transcriptional machinery during senescence // *Plant Mol. Biol.* 2017. V. 93. P. 533. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0580-6>
8. Данилова М.Н., Дорошенко А.С., Кудрякова Н.В., Клепикова А.В., Штратникова В. Ю., Кузнецов В.В. Взаиморегуляция сигнальных путей цитокинина и ауксина в контроле естественного старения листьев *Arabidopsis thaliana* // *Физиология растений.* 2020. Т. 67. С. 616. <https://doi.org/10.31857/S0015330320060032>
9. Podzimska-Sroka D., O'Shea C., Gregersen P.L., Skriver K. NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops // *Plants.* 2015. V. 4. P. 412. <https://doi.org/10.3390/plants4030412>
10. Li P., Zhou H., Shi X., Yu B., Zhou Y., Chen S., Wang Y., Peng Y., Meyer R.C., Smeekens S.C., Teng S. The ABI4-induced *Arabidopsis* ANAC060 transcription factor attenuates ABA signaling and renders seedlings sugar insensitive when present in the nucleus. // *PLoS Genet.* 2014. V. 13. e1004213. <https://doi.org/10.1371>
11. Guo P., Li Z., Huang P., Li B., Fang S., Chu J., Guo H. A tripartite amplification loop involving the transcription factor WRKY75, salicylic acid, and reactive oxygen species accelerates leaf senescence // *The Plant Cell.* 2017. V. 29. P. 2854. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00438>
12. Chen L., Xiang S., Chen Y., Li D., Yu D. *Arabidopsis* WRKY45 interacts with the DELLA protein RGL1 to positively regulate age triggered leaf senescence // *Molecular Plant.* 2017. V. 10. P. 1174. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.008>
13. Robatzek S., Somssich I.E. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense // *Genes & Development.* 2002. V. 16. P. 1139. <https://doi.org/10.1101/gad.222702>
14. Miao Y., Laun T., Zimmermann P., Zentgraf U. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis* // *Plant Mol Biol.* 2004. V. 55. P. 853. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-2142-6>

15. Dietz K.J., Vogel M.O., Viehhauser A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling // *Protoplasma*. 2010. V. 245. P. 3. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0142-8>
16. Yamada K., Sasabe M., Fujikawa M., Wada T., Tomimaga-Wada R. Amino acid substitutions in CPC-LIKE MYB reveal residues important for protein stability in *Arabidopsis* roots // *PLoS One*. 2018. V. 13 (10) e0205522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205522>
17. Tominaga R., Iwata M., Sano R., Inoue K., Okada K., Wada T. *Arabidopsis* CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to trichome and root hair formation // *Development*. 2008. V. 135. P. 1335. <https://doi.org/10.1242/dev.017947>
18. Manfield I.W., Devlin P.F., Jen C.-H., Westhead D.R., Gilmartin P.M. Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the *Arabidopsis* GATA gene family // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 941. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090761>
19. Cui Y., Chen C.L., Cui M., Zhou W.J., Wu H.L., Ling H.Q. Four IVa bHLH transcription factors are novel interactors of FIT and mediate JA inhibition of iron uptake in *Arabidopsis* // *Mol. Plant*. 2018. V. 11. P. 1166. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.005>
20. Efroni I., Han S. K., Kim H. J., Wu M. F., Steiner E., Birnbaum K. D., Hong J.C., Eshed Y. Wagner D. Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses // *Dev. Cell*. 2013. V. 24. P. 438. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.019>
21. Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. V. 65. P. 1150. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7473-4>
22. Yoneda A., Ohtani M., Katagiri D., Hosokawa Y., Demura T. Hechtian strands transmit cell wall integrity signals in plant cells // *Plants*. 2020. V. 9. P. 604. <https://doi.org/10.3390/plants9050604>
23. Zwack P.J., Rashotte A.M. Cytokinin inhibition of leaf senescence // *Plant Signal Behav.* 2013. V. 8 (7): e24737. <https://doi.org/10.4161/psb.24737>
24. Zhiponova M.K., Morohashi K., Vanhoutte I., Machemer Noonan K., Revalska M., Van Montagu M., Grotewold E., Russinova E. Helix-loop-helix/basic helix-loop-helix transcription factor network represses cell elongation in *Arabidopsis* through an apparent incoherent feed forward loop // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 2824. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400203111>
25. Friedrichsen D.M., Nemhauser J., Muramitsu T., Maloof J.N., Alonso J., Ecker J.R., Furuya M., Chory J. Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth // *Genetics*. 2002. V. 162. P. 1445.
26. Fernández-González M., González-Fernández E., Fernández-González D., Rodríguez-Rajo F.J. Secondary outcomes of the Ole e 1 proteins involved in pollen tube development: impact on allergies // *Frontiers in Plant Science*. 2020. V. 11. Article 974. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00974>
27. Hirayama T., Lei G.J., Yamaji N., Nakagawa N., Ma J.F. The putative peptide gene FEP1 regulates iron deficiency response in *Arabidopsis*. // *Plant Cell Physiol*. 2018. V. 59. P. 1739. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy145>
28. Séguéla M., Briat J.F., Vert G., Curie C. Cytokinin negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway // *Plant J*. 2008. V. 55. P. 289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x>
29. Higuchi M., Pischke S.M., Mähönen P.A., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman R.M., Kakimoto T. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 8821. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101>

СОДЕРЖАНИЕ САХАРОВ В СПЕЛОМ ПЛОДЕ ТОМАТА КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМЫ *RIN2i* ГЕНА *Ripening inhibitor*¹

© 2021 г. М. А. Слугина^{а, *}, Е. А. Джос^{а, b}, А. В. Щенникова^а, Е. З. Кочиева^а

^аИнститут биоинженерии Федерального исследовательского центра

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Федеральный научный центр овощеводства”, п. ВНИИССОК, Московская обл., Россия

*e-mail: mashinmail@mail.ru

Поступила в редакцию 23.12.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 01.01.2021 г.

Транскрипционный фактор RIPENING INHIBITOR (ТФ RIN) — один из ключевых регуляторов каскада реакций созревания плода томата. Контролируя как этилен-зависимый, так и этилен-независимый пути созревания, ТФ RIN запускает работу множества структурных и регуляторных генов, от которых зависят такие аспекты созревания плода томата, как потеря хлорофилла, биосинтез каротиноидов, ароматических компонентов, органических кислот, модификация структуры клеточных стенок и накопление сахаров. В настоящей работе впервые клонированы и секвенированы ортологи гена *RIN* у семи сортов томата овощного (*Solanum lycopersicum* L.), образцов двух дикорастущих видов, используемых в селекционном процессе (*S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg), и дикорастущего образца *S. lycopersicum* L. Показано, что полиморфизм нуклеотидных и аминокислотных последовательностей RIN у группы исследуемых сортов выше, чем у анализируемых дикорастущих видов. В большинстве случаев переменные сайты в последовательности ТФ RIN оказались радикальными. Определен профиль экспрессии двух изоформ гена *RIN* — *RIN1i* и *RIN2i*, в процессе созревания плодов у пяти сортов *S. lycopersicum* и дикорастущего вида *S. cheesmaniae*. Выявлена положительная корреляция количества транскриптов *RIN2i* с содержанием сахаров в спелом плоде. Показана активация экспрессии обеих изоформ гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие сахарозы. Это предполагает не только влияние ТФ RIN на накопление сахаров в процессе созревания, но и обратное воздействие: повышение концентрации сахаров приводит к увеличению экспрессии гена *RIN*.

Ключевые слова: *Solanum* секция *Lycopersicon*, созревание сочного плода, метаболизм сахаров, сорта томата, RIPENING INHIBITOR, изоформы *RIN1i* и *RIN2i*

DOI: 10.31857/S0015330321050195

ВВЕДЕНИЕ

Основные этапы развития сочного плода последовательно включают закладку плода, интенсивное деление клеток зародыша (до 10 дней после цветения — days after anthesis, DAA), растяжение клеток (10–40 DAA) и финальную стадию — созревание [1]. Созревание сочного плода сопровождается изменением содержания и состава фитогормонов, накоплением сахаров, биосинтезом пигментов и ароматических соединений, а также модификацией структуры клеточных стенок [1]. Комплексные биохимические и физиологические

изменения, обуславливающие процесс созревания, происходят за счет скоординированной пространственно-временной экспрессии множества структурных и регуляторных генов [2]. Ключевые роли в регуляции и контроле данного сигнального каскада выполняют транскрипционные факторы (ТФ), в частности представители семейства MADS-домениных ТФ [3].

На сегодняшний день основным модельным растением для изучения процесса развития и созревания сочного плода является томат овощной (*Solanum lycopersicum* L.). Для данного вида определены три основных ТФ, без которых созревание сочного плода невозможно, — MADS-ТФ RIPENING INHIBITOR (RIN, или SIMADS-RIN), NAC-ТФ NON-RIPENING (NOR) и SPL-ТФ

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321050195.

COLORLESS NON-RIPENING (CNR) [4–6]. При этом показано, что ТФ RIN активирует экспрессию генов *NOR* и *CNR*, контролируя наиболее ранние этапы созревания плода [7]. Также ТФ RIN запускает гены биосинтеза этилена, тем самым инициируя этилен-зависимый путь созревания плода [8]. Более того, ТФ RIN положительно регулирует транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов и ароматических соединений и генов модификации клеточной стенки, тем самым контролируя и этилен-независимый путь созревания плода [9, 10]. Таким образом, можно заключить, что ТФ RIN является глобальным регулятором процесса созревания плода томата [11].

На сегодняшний день структура и функции ТФ RIN достаточно полно охарактеризованы у культивируемого вида томата *S. lycopersicum* [12]. Хорошо известен фенотип томата, мутантного по гену *RIN* – *ripening inhibitor (rin)*. У мутантных растений *rin* плоды не созревают, имеют зеленую окраску и твердую текстуру перикарпа. На физиологическом уровне для таких плодов характерны потеря синтеза этилена и климактерического усиления интенсивности дыхания, резкое снижение накопления пигментов и ароматических соединений [8].

Современные сорта томата овощного обладают большим разнообразием характеристик созревания плода. Существенно варьируют длительность фазы от всходов до созревания (105–120 сут) и период потребления плодов [13]. Сами плоды по размеру и форме делятся на несколько основных типов: черри (cherry), коктейльный (grape), сливовидный (plum), крупноплодный (largefruited) [14]. Текстура перикарпа (от очень мягкой до очень плотной) регулируется большим количеством генов ремоделирования клеточной стенки [2]. Разнообразная окраска спелого плода (кремовая, желтая, оранжевая, розовая, красная, коричневая, малиновая или фиолетовая [13]) определяется количеством и соотношением синтезируемых и накапливаемых в нем пигментов [15]. Плоды каждого сорта томата имеют свой неповторимый вкус и аромат, что, в свою очередь, зависит от содержания в них сахаров, органических кислот и ароматических соединений [16].

При изучении процесса созревания плода заслуживают внимания родственные дикорастущие красноплодные виды томата (*Solanum*, секция *Lycopersicon*). Образующие ими спелые плоды имеют свой уникальный биохимический состав, и образцы данных видов могут использоваться при скрещиваниях с *S. lycopersicum* для получения новых сортов с улучшенными потребительскими характеристиками плода [17].

Учитывая вышесказанное, большой интерес представляет идентификация и сравнительная характеристика ортологов гена основного регу-

лятора созревания ТФ RIN у культивируемых сортов томата и родственных дикорастущих красноплодных видов, различающихся морфофизиологическими и биохимическими характеристиками спелого плода.

В настоящей работе проведена идентификация и структурно-функциональная характеристика ортологов гена *RIN* у семи сортов томата овощного (*Solanum*, секция *Lycopersicon*) и трех родственных дикорастущих красноплодных образцов (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для проведения исследования выбраны образцы семи сортов томата овощного (*S. lycopersicum*) (табл. 1). Основанием для выбора послужили различия в биохимических (содержание сахаров и пигментов в спелом плоде), морфологических (размер и окраска спелого плода) и физиологических (сроки созревания) показателях (табл.1). Наряду с культурными растениями в исследовании использовались образцы двух дикорастущих родственных видов томата (*S. pimpinellifolium* и *S. cheesmaniae*) и дикорастущий образец *S. lycopersicum*, которые не культивируются, но используются при скрещивании с *S. lycopersicum* для получения новых гибридов. Образцы томата предоставлены ФГБНУ “ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова” (ГРП ВИР, Россия), Федеральным научным центром овощеводства (ФНЦО, Россия) и Tomato Genetics Resource Center (TGRC, США) (табл. 1). Семена проращивались на чашках Петри в стерильных условиях.

Выделение растительной ДНК. Из тканей молодых листьев анализируемых образцов томата выделяли геномную ДНК по протоколу [18] с дополнительной двойной депротеинизацией. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре “Qubit 4” (Thermo Fisher Scientific, США).

Аmplификация, клонирование и секвенирование ортологов гена *RIN*. Для амплификации и секвенирования генов разработали систему ген-специфичных праймеров на основе известной последовательности *RIN* (Gene ID: 543708), доступной в NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Амплифицированные фрагменты очищали с помощью набора реактивов Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) и клонировали в плазмиду pGEM-T (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega, США) согласно протоколам производителей. Полноразмерные последовательности клонов секвенировали с использованием сконструированных праймеров к внутренним и внешним участкам на платформе ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) в ЦКП “Биоинженерия”.

Таблица 1. Характеристики анализируемых образцов сортов *S. lycopersicum*, дикорастущего образца *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*.

Образец	Происхождение образца / каталожный номер	Окраска плода	Сроки созревания (дни)		Средние размеры и масса плода			Биохимические характеристики созревших плодов		
			от цветения до полного созревания	от посева до полного созревания	масса, г	длина, см	ширина, см	содержание сахаров (мг/г сырой массы)	содержание каротиноидов (мг/г сырой массы)	содержание хлорофилла (мкг/г сырой массы)
Сорта томата овощного <i>Solanum lycopersicum</i>										
Black Jack	ФНЦО	Коричневый	47	110	20	1.5	2	Глю – 12.40 Фру – 24.63 Сах – 1.89	Ликопин – 0.29 ± 0.06 β-кар – 0.06 ± 0.005 Кар – 0.56 ± 0.17	Хл а – 3.93 Хл б – 3.75
Long John	TGRC/LA0791	Красный	65	131	40	10	3	Глю – 10.67 Фру – 11.56 Сах – 0	Ликопин – 0.18 ± 0 β-кар – 0.04 ± 0 Кар – 0.07 ± 0	Хл а – 1.15 Хл б – 0
Silvestre Recordo	ВИГРР/1580	Красный	60	117	25	2.5	2.5	н / а	н / а	н / а
Viking	ФНЦО	Желтый	49	110	100	4.5	6	Глю – 18.40 Фру – 20.60 Сах – 0	Ликопин – 0.00 β-кар – 0.005 ± 0 Кар – 0.02 ± 0.01	Хл а – 4.6 Хл б – 3.7
Paul Robeson	TGRC/LA4450	Коричневый	64	121	220	6.5	7.5	Глю – 15.83 Фру – 18.00 Сах – 0.62	Ликопин – 0.10 ± 0.03 β-кар – 0.02 ± 0.001 Кар – 0.14 ± 0.07	Хл а – 6.62 Хл б – 0.56
White Beauty	TGRC/LA2464A	Кремовый	69	124	200	5	7	Глю – 10.62 Фру – 12.87 Сах – 0	Ликопин – 0 β-кар – 0.001 ± 0 Кар – 0.004 ± 0.001	Хл а – 1.75 Хл б – 0
Red Cherry	ФНЦО	Красный	56	109	20	2.5	3	н / а	н / а	н / а
Дикорастущие красноплодные виды томата <i>Solanum</i> sect. <i>Lycopersicon</i>										
<i>S. lycopersicum</i>	TGRC/LA1673	Красный	46	120	15	1.5	1.5	н / а	н / а	н / а
<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>rasemigerum</i>	ВИГРР/1018	Красный	41	111	10	1.5	2	н / а	н / а	н / а
<i>S. cheesmaniae</i>	TGRC/LA0421	Кремовый	64	134	0.5	0.5	0.5	Глю – 1.60 Фру – 1.94 Сах – 0	Ликопин – 0 β-кар – 0.01 ± 0.003 Кар – 0.02 ± 0.004	Хл а – 12.74 Хл б – 0

Примечание: β-кар – β-каротин, Кар – суммарное содержание каротиноидов, н / а – не анализировалось.

Таблица 2. Характеристика анализируемых последовательностей *RIN* томата

Образец	Номер доступа в GenBankNCBI	Ген, п.н.	кДНК, п.н.	Белок, а.о.	pI	Молекулярная масса, кДа
<i>S. lycopersicum</i> сорт Silvestre Recordo	MT228446	5258	660	219	7.72	25.446
<i>S. lycopersicum</i> сорт Long John	MT228454	5259	660	219	7.95	25.525
<i>S. lycopersicum</i> сорт Red Cherry	MT228447	5284	660	219	7.14	25.527
<i>S. lycopersicum</i> сорт Black Jack	MT228449	5261	660	219	7.97	25.553
<i>S. lycopersicum</i> сорт Paul Robeson	MT228451	5258	660	219	8.16	25.453
<i>S. lycopersicum</i> сорт Viking	MT228452	5258	660	219	7.95	25.525
<i>S. lycopersicum</i> сорт White Beauty	MT228453	5258	660	219	7.95	25.507
<i>S. lycopersicum</i> LA1673	MT228439	5279	660	219	7.95	25.525
<i>S. pimpinellifolium</i>	MT228440	5258	660	219	7.95	25.525
<i>S. cheesmaniae</i>	MT228455	5309	660	219	8.57	25.451

Анализ варибельности новых ортологов гена *RIN* томата. Сборку, выравнивание и анализ нуклеотидной и аминокислотной варибельности полученных последовательностей проводили в программе MEGA7.0 (<https://www.megasoftware.net>). Изoelectric point calculator (<http://isoelectric.org>). Доменную структуру белков определяли с помощью NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) и UniProt (<https://www.uniprot.org>). Влияние замещений аминокислотных остатков (а.о.) на структуру белка предсказывали с помощью PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Анализ экспрессии ортологов гена *RIN* томата. Для анализа экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) сконструировали специфичные праймеры на основе идентифицированных последовательностей. Из плодов на двух стадиях созревания выделяли препараты суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, ФРГ) и синтезировали кДНК (GoScript, Promega, США). РВ-ПЦР проводили в двух биологических и трех технических повторах ("Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX", Синтол, Россия) в следующих условиях: 95°C – 5 мин.; 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 40 с). Для нормализации экспрессии генов томата использовали референсные гены *Expressed* (SGN-U346908) и *ACTIN2* (NM_001330119.1) [19].

Биохимический анализ плодов томата. Для биохимического анализа использовали плоды томата финальной стадии созревания (Red Ripe, RR). Измерения проводили в двух биологических и трех технических повторах. Содержание глюкозы, фруктозы и сахарозы измеряли ферментативным методом (Sucrose/D-Glucose/D-Fructose, R-Biopharm, ФРГ). 1 г растительного материала гомогенизировали в 4 мл воды. Полученную суспензию филь-

тровали через Miracloth (Merck, США), 1 мл фильтрата дополнительно центрифугировали 5 мин при 10000 об./мин. Надосадочную жидкость разбавляли водой в 5 раз и измеряли абсорбцию согласно протоколу производителя. Содержание ликопина и β-каротина, а также суммарное количество каротиноидов (x + c; каротиноиды + ксантофиллы) определяли с использованием модифицированного протокола метода Фолча [19, 20].

Влияние сахарозы на экспрессию гена *RIN* определяли путем замачивания тканей плода томата на стадии смены окраски (Breaker, Br) в 4.38 мМ растворе сахарозы. Для этого в экваториальном регионе плода вырезали сегменты равного размера, содержащие все анатомические структуры (как представлено в http://tea.solgenomics.net/anatomy_viewer/microscopy/slm82_fruit). Для анализа экспрессии гена использовали временные точки 0, 30 и 180 мин.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов (вычисление стандартного отклонения) проводили с помощью программы Graph Pad Prism v. 7.02 (<https://www.graphpad.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для амплификации гена *RIN* томата разработана система специфичных праймеров (Дополнительные материалы, табл. 1). Впервые определены (амплифицированы, клонированы и секвенированы) полноразмерные последовательности 10 новых ортологов гена ТФ *RIN* у образцов семи сортов *S. lycopersicum*, различающихся характеристиками созревания плода, и трех дикорастущих красноплодных образцов (*S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*, *S. cheesmaniae*) (табл. 1). Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в NCBI GenBank (табл. 2).

Экзон-интронная структура новых ортологов гена *RIN* томата. Идентифицированные последова-

№ нуклеотида на кДНК	73	75	76	80	81	114	145	167	172	219	226	287	303	349	364	409	472	486	489	505	541	583	Аллельный вариант
Long John	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	A
<i>S. pimpinellifolium</i>	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	A
<i>S. lycopersicum</i>	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	T	G	A	C	C	A	G	A	T	C	B
Black Jack	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	G	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	C
<i>S. cheesmaniae</i>	A	A	A	G	A	T	T	A	C	T	A	A	G	A	A	A	T	A	A	A	T	T	D
Paul Robson	A	A	A	G	A	T	T	G	T	C	G	A	G	G	A	C	C	G	G	A	T	C	E
White Beauty	A	A	A	G	A	T	T	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	T	C	F
Red Cherry	A	A	G	G	T	T	T	A	T	C	G	A	G	G	G	C	C	A	G	A	T	C	G
Viking	G	A	A	C	A	T	T	A	T	C	C	A	C	A	C	C	A	C	A	G	T	C	H
Silvestre Recordo	G	A	A	G	A	T	C	A	T	C	G	A	G	G	A	C	C	A	G	A	T	C	I
Замещение аминокислоты в белке	R25G	N26D	G27A			S49P	E56G	C58F		G76S	K96R		G117R	K122E	Q137K			M163I	I169V		S181P		
	MADS-домен										I-область		K-область					C-область					

Рис. 1. Аллельные варианты анализируемых последовательностей гена *RIN* томата: показаны SNPs и соответствующие замещения а.о. (черным выделены радикальные замещения а.о. (R25G, N26D, G27A, S49P, E56G, C58F, G76S, G117R, K122E, Q137K, S181P), серым – нейтральные замещения а.о. (K96R, M163I, I169V), согласно PROVEAN.

тельности ортологов гена *RIN* всех исследуемых видов и сортов томата состояли из восьми экзонов. Протяженность последовательностей у сортов томата овощного варьировала от 5258 п.н. (Silvestre Recordo, Paul Robeson, Viking и White Beauty) до 5284 п.н. (Red Cherry). У дикорастущих видов томата разница в размерах гена была значительнее: от 5258 п.н. (*S. pimpinellifolium*) до 5309 п.н. (*S. cheesmaniae*) (табл. 2). Данное расхождение обусловлено наличием в интронах инсерций и делеций – в большинстве своем, однонуклеотидных инделей и/или поли-Т, поли-А и поли-АТ областей различной длины. Также в интронах обнаружено три протяженных индела, одна из которых (18-нуклеотидная инсерция ААТТГАТГС-ТАСАСТАТГ) присутствовала в гене *RIN* как томата овощного сорта Red Cherry, так и двух дикорастущих образцов *S. lycopersicum* и *S. cheesmaniae*. Другие две инделы (36-нуклеотидная инсерция АТАТТААААСГТАТАГТТГТСАГСТГАТАТССААТС и 9-нуклеотидная делеция ТГСАТТААГ) были характерны только для *RIN* вида *S. cheesmaniae*.

Длины всех кодирующих последовательностей одинаковы и составляют 660 п.н. (табл. 2). Наибольший размер имеет экзон I (185 п.н.), который кодирует высоко консервативный домен MADS, а наименьший – экзон VIII (16 п.н.), кодирующий часть наиболее вариабельной С-концевой области белка.

Интроны ортологов *RIN* значительно превышают по общей длине кодирующие последовательности. Наиболее протяженным является интрон I, размер которого варьирует от 2879 п.н. (у *S. lycopersicum* сортов Silvestre Recordo, Paul Robeson, Viking и White Beauty, и у *S. pimpinellifolium*) до 2930 п.н. (у *S. cheesmaniae*).

Нуклеотидный полиморфизм гена *RIN* томата. Всего в идентифицированных последовательностях ортологов *RIN* всех исследуемых образцов томата выявлено 203 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism; однонуклеотидный полиморфизм). Общий уровень вариабельности гена составил 3.78%. Ортологи *RIN* образцов дикорастущих красноплодных видов (дикорастущий образец *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*) содержат 91 SNPs (1.69%), в то время как внутри группы сортов то-

мата овощного *S. lycopersicum* найдено 132 SNPs (2.46%). Таким образом, общая вариабельность ортологов гена *RIN* сортов томата в полтора раза превосходит таковую у дикорастущих родственных красноплодных видов секции *Lycopersicon*.

В кодирующих последовательностях ортологов *RIN* выявлено 22 вариабельных сайта. Наибольшее их количество (14 SNPs) характерно для *RIN* сортов томата; остальные 8 SNPs – у *RIN* дикорастущих красноплодных видов.

Анализ аллельной вариабельности кДНК *RIN* в исследуемой выборке из 10 образцов томата обнаружил 9 аллельных вариантов (рис. 1). Показано, что сорт Long John и вид *S. pimpinellifolium* имеют общий аллельный вариант кДНК *RIN*, в то время как остальные образцы характеризуются индивидуальными аллельными вариантами кДНК *RIN* (рис. 1). Среди анализируемых образцов наибольшее количество уникальных замен (7 SNPs) выявлено в кДНК *RIN* вида *S. cheesmaniae*. По три сортоспецифичных SNPs в кДНК *RIN* найдено у сортов Red Cherry, Viking и Silvestre Recordo, по две – у сортов Paul Robeson и White Beauty, и по одной – у дикорастущего образца *S. lycopersicum* и сорта Black Jack (рис. 1).

Аминокислотная вариабельность выявленных ортологов ТФ *RIN* томата. кДНК идентифицированных ортологов гена *RIN* транслировали *in silico* (в программе MEGA7.0), и определили вариабельность полученных белковых молекул. Показано, что данная последовательность кодирует белок длиной 219 а.о. с молекулярной массой около 25.5 кДа (табл. 2).

Из 22 нуклеотидных замен, найденных в экзонах, 14 приводят к замещениям а.о. Общий уровень аминокислотной вариабельности у всех анализируемых образцов составил 6.39% (1.82% и 4.56% – вариабельность белка в группе дикорастущих видов и сортов соответственно).

В последовательности полученных ортологов ТФ *RIN* определены основные консервативные домены и мотивы. Согласно данным UniProt, позицию с 1 по 61 а.о. занимает высоко консервативный MEF2-like MADS-домен, а с 87 по 177 а.о. – консервативный кератин-подобный (К) домен. В MADS-домене выявлено шесть радикальных за-

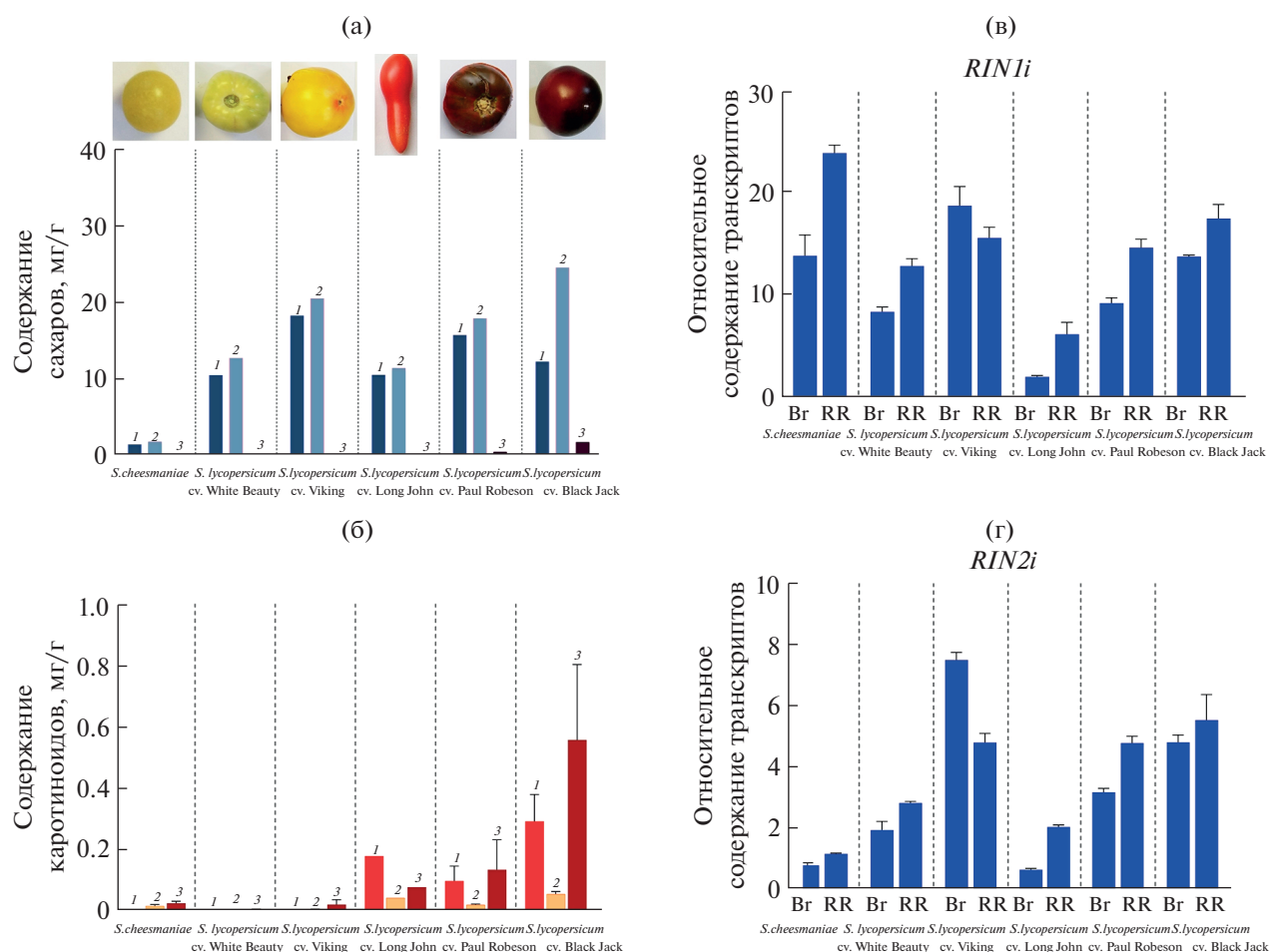


Рис. 2. Содержание сахаров (глюкозы – 1, фруктозы – 2 и сахарозы – 3) (а) и каротиноидов (ликопин – 1, бета-каротин – 2 и сумма каротиноидов – 3) (б) в спелых плодах анализируемых образцов томата. Профили экспрессии *RIN1i* (в) и *RIN2i* (г) в созревающем (стадия Br) и спелом (стадия RR) плодах анализируемых образцов томата.

мещений а.о., в I-области (с 62 по 86 а.о.) – одно радикальное замещение, в K-домене – шесть, три из которых радикальные, в C-области (с 178 по 219 а.о.) – одно радикальное замещение (рис. 1).

Анализ экспрессии ортологов гена *RIN* томата. Для сравнительного анализа экспрессии в исследуемой выборке из 10 образцов томата выбраны пять сортов (White Beauty, Viking, Long John, Paul Robeson и Black Jack) и дикорастущий вид *S. cheesmaniae*, характеристики созревания плода которых наиболее разнообразны. В первую очередь, данные образцы различаются сроками созревания: очень раннеспелые сорта (Viking, Black Jack), позднеспелые (White Beauty, Paul Robeson, *S. cheesmaniae*) и очень позднеспелый сорт (Long John). Размеры плодов варьируют от 0.5 г (*S. cheesmaniae*) до 220 г (сорт Paul Robeson). Окраска плода также различается: кремовая (*S. cheesmaniae*, сорт White Beauty), желтая (сорт Viking), красная (сорт Long John), темно-коричневая (сорта Paul Robeson и Black Jack) (табл. 1, рис. 2).

Чтобы дополнить характеристики созревания и провести дальнейшую оценку возможных корреляций варибельности и экспрессии *RIN* с признаками спелого плода, в спелых плодах исследуемых образцов определено содержание сахаров и каротиноидов. В результате для всех исследуемых образцов показано присутствие глюкозы и фруктозы, при этом общее количество данных гексоз у вида *S. cheesmaniae* значительно ниже, чем у сортов. Интересно отметить, что у сортов с коричневой окраской плода (Paul Robeson и Black Jack) присутствует также небольшое количество сахарозы (рис. 2а).

Анализ содержания каротиноидов показал отсутствие ликопина в плодах кремовой и желтой окраски (*S. cheesmaniae*, сорта White Beauty и Viking). При этом в спелых плодах *S. cheesmaniae* и сорта Viking обнаружены следовые количества β-каротина и общих каротиноидов (x + c). У красноплодного сорта Long John и коричневоплодных сортов Paul Robeson и Black Jack выявлено высо-

кое содержание ликопина и общих каротиноидов, а также незначительное количество β -каротина (рис. 2б).

Поскольку *RIN* является регулятором биосинтеза каротиноидов в плоде томата, в исследуемых образцах был проведен анализ экспрессии гена *RIN*. В базе данных NCBI представлены две формы транскриптов гена *RIN*, которые отличаются 3'-областью (NM_001247741.2 – транскрипт *RIN1i*; NM_001315495.1 – транскрипт *RIN2i*).

Основываясь на существовании двух форм транскриптов гена *RIN*, была разработана система праймеров, позволяющая дифференцировать экспрессию каждой формы отдельно (Дополнительные материалы, табл. 1). Согласно опубликованным данным [8] и данным Tomato Expression Atlas (<http://tea.solgenomics.net/>), максимальных значений экспрессия гена *RIN* достигает в созревающем (стадия Vg, замещение зеленой окраски) и полностью спелом плодах (стадия RR, окраска при спелости), поэтому в данной работе для анализа экспрессии *RIN* были использованы плоды стадий Vg и RR.

Согласно полученным данным РВ-ПЦР, в плодах обеих стадий созревания (Vg и RR) всех шести анализируемых образцов томата присутствуют обе формы транскриптов гена *RIN* (рис. 2в, г). Так как эффективность протекания ПЦР для пар праймеров, специфичных для обеих изоформ, была сопоставима, можно заключить, что относительный уровень накопления транскрипта *RIN1i* в 3 раза больше, чем транскрипта *RIN2i* (рис. 2в, г).

Было показано, что у всех анализируемых образцов уровень экспрессии обоих транскриптов *RIN1i* и *RIN2i* рос от стадии Vg к стадии RR, за исключением сорта Viking, где уровень снижался (рис. 2в, г). При этом в плодах именно сорта Viking зарегистрирован самый высокий уровень экспрессии обеих форм транскриптов *RIN*. Наименьший уровень (среди сортов) – у сорта Long John. У образца дикорастущего вида *S. cheesmaniae*, относительное количество транскриптов *RIN1i* выше, а транскриптов *RIN2i* ниже, чем у всех исследуемых сортов (рис. 2в, г).

Анализ полученных данных в сопоставлении с характеристиками образцов сортов и вида *S. cheesmaniae* показал, что профили экспрессии гена *RIN* не соотносятся ни со сроками созревания, ни с размером плода, ни с содержанием каротиноидов. Тем не менее, прослеживается некоторая корреляция между числом транскриптов *RIN2i* и содержанием фруктозы и глюкозы в спелом плоде (рис. 2, рис. 3). При этом более достоверной является корреляция с содержанием фруктозы ($R^2 = 0.9228$) (рис. 3а), корреляция же с концентрацией глюкозы меньше ($R^2 = 0.6585$) (рис. 3б).

Важно отметить, что найденная корреляция может быть как следствием влияния ТФ *RIN* на

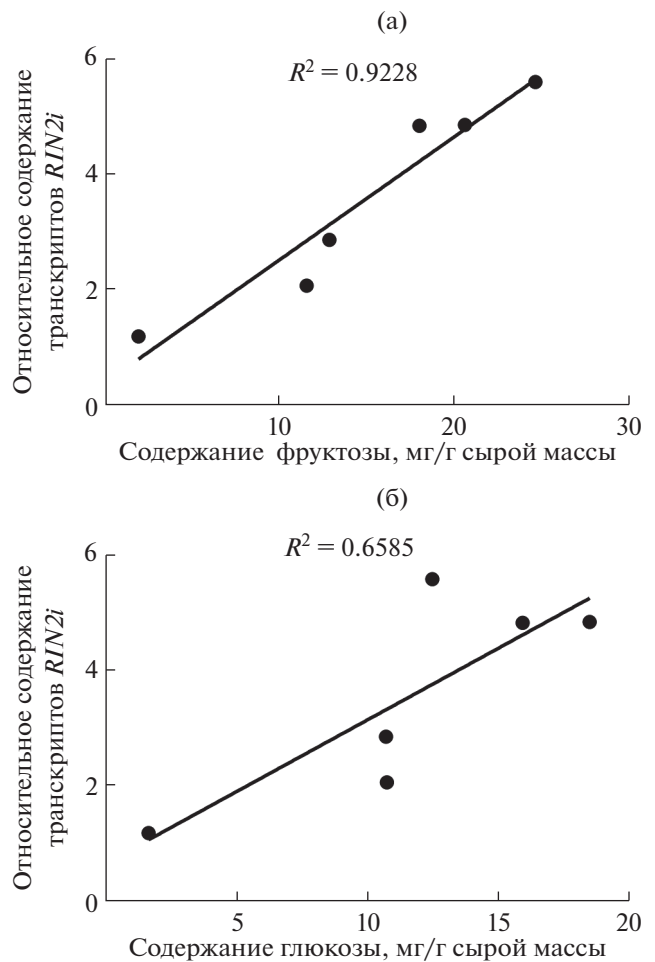


Рис. 3. Положительная корреляция между содержанием фруктозы (а) и глюкозы (б) и количеством транскриптов *RIN2i* в спелых плодах (стадия RR) анализируемых образцов томата.

активность ферментов углеводного метаболизма, так и, наоборот, активность гена *RIN* может увеличиваться в ответ на накопление в клетке сахаров. Чтобы проверить это, был изучен профиль экспрессии гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие сахарозы (предшественника глюкозы и фруктозы) на плоды стадии Vg сорта White Beauty, для которого характерно среднее содержание сахаров. В результате было показано, что через 30 мин инкубации количество обоих транскриптов гена *RIN* вырастает примерно в 3 раза, а через 2 ч – в 20 раз (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Вариабельность гена ТФ *RIN* у сортов *S. lycopersicum* превышает уровень полиморфизма гена у анализируемых дикорастущих образцов. Культивирование томата осуществляется на протяжении более 400 лет, и на сегодняшний день получено уже более

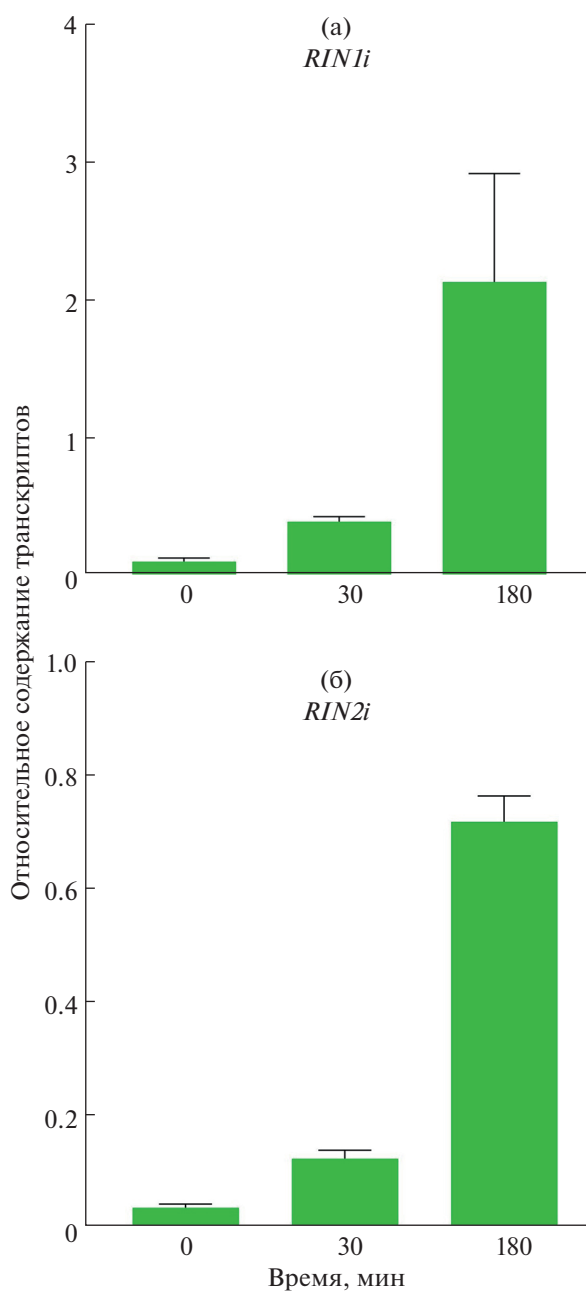


Рис. 4. Изменение экспрессии изоформ *RINi* (а) и *RIN2i* (б) гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие 0.15% раствора сахарозы в ткани созревающего плода (Br).

10000 различных сортов [14]. Такой длительный процесс одомашнивания томата привел к значительным ограничениям его генетического полиморфизма [14]. Современные сорта томата содержат лишь менее 5% от генетической вариабельности их дикорастущих сородичей [21] и, несмотря на огромное морфофизиологическое разнообразие сортов, считается, что дикорастущие образцы *S. lycopersicum* и родственные виды томата (секция *Lycopersicon*) превосходят современные сорта по разнообразию

физиологических и биохимических характеристик [22]. По этой причине селекционеры все чаще обращаются к межвидовым скрещиваниям с целью интрогрессии в сорта хозяйственно ценных признаков дикорастущих видов [14].

В противоположность сказанному, данные, полученные в настоящей работе, показывают, что по гену *RIN* и кодируемой им аминокислотной последовательности ТФ *RIN* внутривидовой полиморфизм между сортами *S. lycopersicum* в 1.5 и 2.5 раза, соответственно, превосходит полиморфизм дикорастущих видов.

Подобное расхождение может, в первую очередь, объясняться тем, что в работе рассматривались только дикорастущие виды, формирующие красный или оранжевый плод. Именно они представляют интерес для изучения гена *RIN* как основного регулятора процесса созревания плода. В то же время наиболее полиморфными являются зеленоплодные, более древние виды томата [23], у которых, однако, отсутствуют признаки созревания плода, свойственные сортам.

Кроме того, напомним, что ген *RIN* определяет именно те морфофизиологические характеристики плода, которые максимально интересны для селекционеров и потребителей. Поэтому отбор сортов на разнообразие данных признаков, очевидно, должен приводить к повышению вариабельности основного их регулятора – гена *RIN*, тогда как геном в целом остается консервативным.

В этом аспекте важно заметить, что в большинстве случаев выявленные замещения аминокислотных остатков в последовательности ТФ *RIN* являются радикальными. В случае сортов, радикальные замещения присутствуют во всех структурных единицах *RIN*, начиная от высококонсервативных MADS- и К-доменов и заканчивая междоменной I-областью и С-концевой последовательностью. Потенциально такие замещения могут приводить к изменению структуры и, как следствие, функции ТФ. К примеру, известно, что MADS-домен отвечает за связывание ТФ с промотором гена-мишени [24], К-домен определяет белок-белковые взаимодействия ТФ и формирование мультимерных комплексов MADS-ТФ, в составе которых они осуществляют свои функции [25], а С-область определяет способность MADS-ТФ активировать транскрипцию гена-мишени [26]. Следовательно, радикальные замещения в данных участках ТФ *RIN* могут изменять связывание ТФ с ДНК-мишенью, его способность объединяться в функциональные комплексы и активировать транскрипцию генов-мишеней.

Уровень экспрессии гена *RIN* не коррелирует с размером плода и с содержанием каротиноидов в спелом плоде. Известно, что плоды меньшего размера быстрее достигают созревания [14]. В настоящей работе использовались образцы томата,

формирующие плоды разного размера и веса (0.5–220.0 г), при этом корреляция данного признака с уровнем экспрессии гена *RIN* отсутствует. Также, согласно полученным результатам, такой зависимости не наблюдалось и для признаков содержания и состава каротиноидов, длительности созревания и степени размягчения и лежкости спелых плодов.

Содержание сахаров в спелом плоде положительно коррелирует с уровнем экспрессии изоформы транскрипта *RIN2i*. На всем протяжении репродуктивного развития томата сахара играют важнейшую роль в определении количества и сроков роста и созревания сочных плодов, поставляя энергию для всех этих процессов; от сахаров во многом зависят характеристики спелого плода (сахаристость, размер и др.) [1, 27]. На поздних этапах развития плод томата становится полностью гетеротрофным органом, зависимым от поступления из фотосинтезирующих тканей сахарозы, гидролиз которой приводит к максимально возможному накоплению глюкозы и фруктозы [1, 27].

В плодах томата гидролиз сахарозы и продукты ее распада находятся под контролем инвертаз и их ингибиторов (VI, VIF, LIN7, LIN8, CIF1, NI2, NI4, др.), сахарозосинтаз (SS3, SS4, др.), сахарозофосфатсинтаз (SPSA1, SPSB, др.), фруктокиназ (FK-Like1, FK-like2, др.) и гексокиназ (HK3, HK4, HK6, др.) [27]. Экспериментально показано, что ТФ RIN напрямую связывается с регуляторными элементами (CARG-box) в промоторах кодирующих данные белки генов, регулируя тем самым их экспрессию и метаболизм сахарозы [27].

В настоящей работе показана зависимость между уровнем экспрессии изоформы транскрипта *RIN2i* и содержанием фруктозы и глюкозы в спелом плоде (рис. 2, 3). Можно предположить, что именно изоформа *RIN2i* осуществляет основную регуляцию метаболизма сахарозы в плоде томата по мере его созревания. В данном аспекте изоформа *RIN1i* может рассматриваться как дополняющий функцию партнер *RIN2i*, что было недавно продемонстрировано [28].

Рост содержания сахаров положительно воздействует на уровень экспрессии изоформы *RIN2i*. Известно, что сахара могут выступать, аналогично гормонам, в качестве первичных мессенджеров, запуская каскады реакций [29]. Также, регуляторная роль сахарозы, предположительно, заключается в регуляции клеточного метаболизма путем изменения экспрессии генов [27]. Продукты распада сахарозы, глюкоза и фруктоза, фосфорилируются, что предполагает их участие в передаче сигнала [27].

Положительная корреляция между уровнем экспрессии *RIN2i* и содержанием гексоз в плоде томата не отвечает на вопрос, что первично: экспрессия ли *RIN2i* приводит к росту концентрации

гексоз, или же, наоборот, большое содержание гексоз активирует транскрипцию *RIN2i*. Действительно, помимо воздействия гена *RIN* на работу ферментов углеводного метаболизма, показана и обратная связь между степенью активности ферментов углеводного метаболизма и уровнем экспрессии *RIN* [27]. Таким образом, сахара могут выступать в качестве сигнальных молекул, активирующих транскрипцию гена *RIN*.

В настоящей работе проведена экспериментальная проверка данного предположения с помощью оценки изменения экспрессии гена *RIN* в ответ на экзогенное воздействие сахарозы. В результате показано, что инкубация созревающих плодов в 0.15% растворе сахарозы активирует экспрессию обеих изоформ гена *RIN* (рис. 4). Таким образом, с одной стороны, ТФ RIN влияет на обмен сахаров в клетках плода томата при созревании за счет активации ферментов метаболизма сахарозы, фруктозы и глюкозы. С другой стороны, концентрация сахаров в клетке оказывает регулирующее воздействие на экспрессию гена *RIN*.

Чем больше белка ТФ RIN накапливается в клетке, тем активнее инвертазы разрушают сахарозу. При этом корреляция между уровнем экспрессии *RIN2i* и содержанием глюкозы не такая строгая, как в отношении фруктозы (рис. 3), хотя при работе инвертаз обе гексозы образуются в равном количестве. Это можно объяснить существованием дополнительного источника глюкозы — крахмала, гены деградации которого не являются мишенями *RIN*. Кроме того, фруктоза слаще других сахаров, и при селекции сортов томата усилия направлены на увеличение в спелых плодах именно ее содержания [1]. При этом желаемый сдвиг равновесия в сторону фруктозы может происходить за счет ферментативной изомеризации глюкозы с образованием молекул фруктозы [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день неоспоримой является важнейшая роль ТФ RIN и его гомологов в процессе созревания сочного плода не только томата, но и растений из других семейств. Четкое понимание особенностей работы ТФ RIN имеет теоретическое значение для прояснения молекулярных механизмов регуляции созревания сочного плода. Более того, практический интерес к описанию гена *RIN* обусловлен возможностью его дальнейшего использования для биотехнологии, так как многие подконтрольные ТФ RIN гены ассоциированы с хозяйственно ценными признаками (цвет плодов, их вкус и аромат, сроки созревания и хранения). Для возможности дальнейшего практического применения гена *RIN* с целью улучшения сортов томата необходима оценка его природной вариабельности и профилей экспрессии у современных сортов с различными морфологическими и био-

химическими характеристиками созревших плодов и поиск возможных корреляций с отдельными признаками.

Результаты оценки аллельной и аминокислотной вариабельности гена *RIN* у семи современных сортов томата овощного, приведенные в данной работе, выявили превосходящий уровень полиморфизма последовательностей *RIN* у группы сортов по сравнению с группой дикорастущих родственных видов томата, используемых в селекционном процессе. Вероятно, это связано с тем, что ген *RIN*, как считается, определяет именно те морфофизиологические характеристики плода, которые максимально интересны для селекционеров и потребителей, и в процессе селекции сортов отбирались максимально разнообразные аллели данного гена. Проведенный функциональный анализ показал, что профиль экспрессии *RIN* коррелирует с содержанием сахаров. Более того, согласно представленным результатам, найденная корреляция может являться не только результатом активации ТФ *RIN* генов-мишеней гидролизующих сахарозу ферментов, но и следствием обратной зависимости: экспрессия гена *RIN* может усиливаться в ответ на увеличение концентрации сахаров, что показано в результате опыта с экзогенной обработкой плодов сахарозой. Несмотря на то, что мишени гена *RIN* достаточно хорошо описаны, в настоящий момент крайне мало сведений о том, какой фактор в свою очередь может запускать экспрессию самого гена *RIN*.

Таким образом, полученные данные вносят вклад в понимание разнообразия структуры и функций ортологов ТФ *RIN* томата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-76-00006 и, частично, Министерства науки и высшего образования РФ, с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК, Федерального исследовательского центра Биотехнологии РАН).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Quinet M., Angosto T., Yuste-Lisbona F.J., Blanchard-Gros R., Bigot S., Martinez J.P., Lutts S.* Tomato Fruit Development and Metabolism // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10:1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>
2. *Karlova R., Chapman N., David K., Angenent G.C., Seymour G.B., de Maagd R.A.* Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 4527. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru316>
3. *Li S., Chen K., Grierson D.* A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 1724. <https://doi.org/10.1111/nph.15545>
4. *Robinson R., Tomes M.* Ripening inhibitor: a gene with multiple effect on ripening Tomato // *Genet. Coop.* 1968. V. 18. P. 36.
5. *Tigchelaar E., Tomes M., Kerr E., Barman R.* A new fruit ripening mutant, non-ripening (nor) // *Rep. Tomato Genet. Coop.* 1973. V. 23. P. 33.
6. *Thompson A.J., Tor M., Barry C.S., Vrebalov J., Orfila C., Jarvis M.C., Giovannoni J.J., Grierson D., Seymour G.B.* Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. P. 383.
7. *Zhong S., Fei Z., Chen Y.R., Zheng Y., Huang M., Vrebalov J., McQuinn R., Gapper N., Liu B., Xiang J., Shao Y., Giovannoni J.J.* Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 154.
8. *Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J.* A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus // *Science.* 2002. V. 296. P. 343.
9. *Fujisawa M., Nakano T., Shima Y., Ito Y.* A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 371.
10. *Qin G., Wang Y., Cao B., Wang W., Tian S.* Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor *RIN* in fruit ripening // *Plant J.* 2012. V. 70. P. 243.
11. *Osorio S., Alba R., Damasceno C.M., Lopez-Casado G., Lohse M., Zanor M.I., Tohge T., Usadel B., Rose J.K., Fei Z., Giovannoni J.J., Fernie A.R.* Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 405.
12. *Ito Y.* Regulation of Tomato Fruit Ripening by MADS-Box Transcription Factors // *Horticulture.* 2016. V. 50 P. 33.
13. *Бондарева Л.Л.* Методические указания по апробации овощных и бахчевых культур. Москва. ФГБНУ ФНЦО, 2018. 224 с.
14. *Bhattarai K., Sharma S., Panthee D.R.* Diversity among Modern Tomato Genotypes at Different Levels in Fresh-Market Breeding // *International Journal of Agronomy.* 2018. V. 2018: 4170432. <https://doi.org/10.1155/2018/4170432>
15. *Kang S.I., Hwang I., Goswami G., Jung H.J., Nath U.K., Yoo H.J., Lee J.M., Nou I.S.* Molecular Insights Reveal *Psy1*, *SGR*, and *SIMYB12* Genes are Associated with Diverse Fruit Color Pigments in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // *Molecules.* 2017. V. 22: 2180. <https://doi.org/10.3390/molecules22122180>

16. *D'Angelo M., Zanor M.I., Sance M., Cortina P.R., Boggio S.B., Asprelli P., Carrari F., Santiago A.N., Asís R., Peralta I.E., Valle E.M.* Contrasting metabolic profiles of tasty Andean varieties of tomato fruit in comparison with commercial ones // *J. Sci. Food Agric.* 2018. V. 98. P. 4128.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8930>
17. *Pratta G.R., Rodriguez G.R., Zorzoli R., Valle E.M., Picardi L.A.* Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* // *J. Genet.* 2011. V. 90. P. 229.
<https://doi.org/10.1007/s12041-011-0063-0>
18. *Edwards K., Johnstone C., Thompson C.* A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19: 1349.
<https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
19. *Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* Differential Regulation of Phytoene Synthase *PSYI* During Fruit Carotenogenesis in Cultivated and Wild Tomato Species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9: 1169.
<https://doi.org/10.3390/plants9091169>
20. *Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z.* Dependence of Pepper Fruit Colour on Basic Pigments Ratio and Expression Pattern of Carotenoid and Anthocyanin Biosynthesis Genes // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 1054.
<https://doi.org/10.1134/S1021443720050040>
21. *Henareh M., Dursun A., Mandoulakani B.A.* Genetic diversity in tomato landraces collected from Turkey and Iran revealed by morphological characters // *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus.* 2015. V. 14. P. 87.
22. *Cebolla-Cornejo J., Roselló S., Nuez F.* Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces // *Scientia Horticulturae.* 2013. V. 162. P. 150.
23. *Lin T., Zhu G., Zhang J., Xu X., Yu Q., Zheng Z., Zhang Z., Lun Y., Li S., Wang X., Huang Z., Li J., Zhang C., Wang T., Zhang Y., et al.* Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. P. 1220.
<https://doi.org/10.1038/ng.3117>
24. *Aerts N., de Bruijn S., van Mourik H., Angenent G.C., van Dijk A.D.J.* Comparative analysis of binding patterns of MADS-domain proteins in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biol.* 2018 V. 18:131.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1348-8>
25. *Kaufmann K., Melzer R., Theissen G.* MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants // *Gene.* 2005. V. 347. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.014>
26. *Immink R.G., Tonaco I.A., de Folter S., Shchennikova A., van Dijk A.D., Busscher-Lange J., Borst J.W., Angenent G.C.* SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation // *Genome Biol.* 2009. V. 10: R24.
<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-2-r24>
27. *Qin G., Zhu Z., Wang W., Cai J., Chen Y., Li L., Tian S.* A Tomato Vacuolar Invertase Inhibitor Mediates Sucrose Metabolism and Influences Fruit Ripening // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 1596.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01269>
28. *Ito Y., Sekiyama Y., Nakayama H., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Shima Y., Nakamura N., Kotake-Nara E., Kawasaki S., Hirose S., Toki S.* Allelic Mutations in the Ripening-Inhibitor Locus Generate Extensive Variation in Tomato Ripening // *Plant Physiol.* 2020. V. 183. P. 80.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00020>
29. *Rolland F., Moore B., Sheen J.* Sugar sensing and signaling in plants // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. S185.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010455>
30. *Beaujean A., Ducrocq-Assaf C., Sangwan R.S., Lilius G., Bülow L., Sangwan-Norreel B.S.* Engineering direct fructose production in processed potato tubers by expressing a bifunctional alpha-amylase/glucose isomerase gene complex // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 70. P. 9.
[https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<9::aid-bit2>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<9::aid-bit2>3.0.co;2-7)

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ И ДЫХАТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ТАЛЛОМОВ КРУПНОЛИСТОВАТОГО ЛИШАЙНИКА *Lobaria pulmonaria* В ГОДИЧНОМ ЦИКЛЕ

© 2021 г. М. А. Шелякин^а, *, И. Г. Захожий^а, И. В. Далькэ^а, О. В. Дымова^а,
Р. В. Малышев^а, Т. К. Головкин^а

^аИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: shelyakin@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 25.02.2021 г.

После доработки 25.03.2021 г.

Принята к публикации 25.03.2021 г.

Лишайники – уникальные фототрофные организмы, физиология устойчивости которых привлекает большое внимание. Исследовали показатели фотосинтеза и дыхания эпифитного крупнолистоватого лишайника *Lobaria pulmonaria* с целью выявления реакций на сезонные изменения условий среды. Максимум накопления хлорофиллов, 2.3 мг/г сухой массы таллома, отмечали осенью (октябрь), к весне (апрель) количество зеленых пигментов уменьшалось в 2.5 раза. Соотношение хлорофиллы/каротиноиды варьировало в пределах 3.1–4.4. Уровень дезоксидации пигментов ксантофиллового цикла зимой составлял 34%, летом был вдвое ниже. Гидратированные и кратковременно акклимированные в стандартных условиях талломы *L. pulmonaria* проявляли сравнительно высокую фотохимическую активность и способность к фиксации CO₂ на протяжении всего годового цикла. Интенсивность нетто-поглощения CO₂ талломами при оптимальных свето-температурных условиях варьировала в пределах 3–5 мкмоль CO₂/м² с, наибольшие значения регистрировали весной. Не выявили значимых сезонных изменений дыхания талломов. Изменение соотношения дыхательных путей и повышение скорости метаболического тепловыделения весной и осенью было следствием активации энергетически мало эффективного альтернативного пути дыхания. Полученные данные свидетельствуют о роли функциональной адаптации фото- и микобионта в устойчивости лишайника как целостной системы к сезонным изменениям условий среды.

Ключевые слова: *Lobaria pulmonaria*, фотосинтетические пигменты, ксантофилловый цикл, флуоресценция хлорофилла, фотосистемы, CO₂-газообмен, дыхание, дыхательные пути, тепловыделение, устойчивость, лишайник

DOI: 10.31857/S001533032106018X

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники – устойчивая ассоциация гетеротрофного организма (микобионта) и фотосинтезирующего организма (фотобионта). Присутствие фотобионта (зеленые водоросли и/или цианобактерии) превращает лишайник в автотрофную систему. Зеленые водоросли поставляют клеткам микобионта сахароспирты, цианобактерии – глюкозу и продукты биологической азотфиксации [1]. Большой вклад в развитие представлений о симбиотической природе лишайников внес выдающийся русский ботаник, один из основоположников отечественной физиологии растений А.С. Фа-

минцын [2]. Он фактически положил начало физиологическим исследованиям этих уникальных фототрофных организмов и получил ценный материал для понимания их биологии.

Лишайники вызывают большой интерес своей устойчивостью к обезвоживанию, гипо- и гипертермии, ионизирующему излучению и действию других неблагоприятных факторов [3]. Они доминируют в крайних местообитаниях (Арктика, Антарктида, пустыни, высокогорья), но наиболее благоприятны для обитания лишайников леса, о чем свидетельствует высокое биологическое разнообразие лишайников в бореальной зоне [4]. Полагают, что в основе устойчивости лишайников лежат конститутивные механизмы поддержания структурно-функциональной целостности и индуцибельные процессы, обеспечивающие репарацию повреждений, возникающих при воздействии стресса или выходе из него [5]. Однако

Сокращения: АП – альтернативный путь дыхания; ВКЦ – виолаксантиновый цикл; Кар – каротиноиды; ОВВ – относительная влажность воздуха; ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофиллы; ЦП – цитохромный путь дыхания; DEPS – уровень дезоксидации пигментов ВКЦ; PPFD – плотность потока квантов ФАР.

Таблица 1. Микроклиматические условия в местообитании лишайника *Lobaria pulmonaria* в разное время года

Месяц	Интенсивность ФАР, мкмоль квантов/м ² с			Температура воздуха, °С			Относительная влажность воздуха, %		
	мин.	макс.	средняя	мин.	макс.	средняя	мин.	макс.	средняя
Апрель	57	1300	306 ± 48	0.3	10	5.2 ± 0.5	45	79	61 ± 2
Июнь	11	1300	234 ± 32	23	30	27.3 ± 0.3	36	69	52 ± 2
Октябрь	8	137	25 ± 4	5	18	12.0 ± 0.8	58	88	70 ± 2
Январь	23	78	48 ± 4	–13	–12	–12.5 ± 0.2	43	60	51 ± 5

Примечание. При обработке результатов учитывали весь массив данных, полученных в дни отбора проб за период 2012–2017 гг.

наши знания о физиологических механизмах устойчивости лишайников как целостной системы – микобионта, на долю которого приходится свыше 90% биомассы, и фотобионта, обеспечивающего всю ассоциацию восстановленным углеродом, все еще остаются неполными.

Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. (лобария легочная) – эпифитный крупнолистоватый лишайник. Вид распространен в бореальных, умеренных, горных и океанических районах северного полушария и тропических лесах Восточной и Южной Африки. Охраняется в большинстве стран северной и центральной Европы [6]. Основным фотобионтом лобарии является зеленая водоросль *Symbiochloris reticulata*. В цефалодиях внутри таллома заключены цианобактерии рода *Nostoc*, осуществляющие азотфиксацию. Водоросли образуют хорошо выраженный альгальный слой, который располагается под верхним коровым, состоящим из плотно прилегающих друг к другу грибных гиф. По нашим данным, толщина альгального слоя у зрелых талломов составляет 45–50 мкм, а клетки зеленой водоросли имеют диаметр около 5 мкм [7]. Под слоем водоросли рыхло расположены грибные гифы, формирующие сердцевину, которая определяет толщину всего таллома. Нижний коровый слой сложен плотно упакованными гифами и имеет выросты (ризиды), обеспечивающие прикрепление таллома к субстрату.

Цель работы – выявление сезонных изменений функциональной активности процессов фотосинтеза и дыхания *Lobaria pulmonaria*, связанных с энерго-пластическим метаболизмом и устойчивостью лишайника к внешним воздействиям.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2012–2017 гг. Талломы (слоевища) лишайника *Lobaria pulmonaria* отбирали вблизи г. Сыктывкара (61°34′ с.ш., 50°33′ в.д.) в старовозрастном осиннике с примесью ели и пихты. Сбор слоевищ осуществляли со стволов деревьев на высоте 1–3 м от земли. Район исследований характеризуется умеренно-континентальным климатом, со среднегодовой темпера-

турой воздуха около +1°С. Среднесуточная температура самого теплого месяца (июля) около 17°С, самого холодного (января) – около –16°С. Годовое количество осадков составляет 600–700 мм. Наибольшее их количество выпадает летом и осенью, 60–80 мм за месяц; зимой и весной месячная норма осадков в 1.5–2 раза меньше. Переход средней суточной температуры через 0°С весной происходит во второй декаде апреля, осенью – в начале октября. Длительность безморозного периода составляет 180–190 дней, а продолжительность периода со среднесуточной температурой >5°С около 160 дней [8].

Во время отбора талломов измеряли освещенность, температуру и относительную влажность воздуха в местообитании лишайника с помощью регистрирующего устройства LI-1400 (“LI-COR”, США) с набором метеорологических датчиков. Микроклиматические параметры среды изменялись в широких пределах в зависимости от погодных условий и времени года (табл. 1). В весенне-летний период интенсивность ФАР составляла в среднем 250–300 мкмоль квантов/м² с, но при наличии солнечных бликов и “окон” в древесном пологом достигала 1000 и более мкмоль квантов/м² с. Осенью и зимой освещенность была существенно ниже. Средние значения относительной влажности воздуха (ОВВ) варьировали в зависимости от сезона года в пределах 50–70%.

Фотосинтетические пигменты экстрагировали из периферийной части свежесобранных талломов смесью ацетона с диметилсульфоксидом в соотношении 1 : 2 [9]. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически на приборе UV-1700 (“Shimadzu”, Япония) при длинах волн 662, 644 нм (хлорофиллы *a* и *b*) и 478 нм (каротиноиды). Для анализа состава каротиноидов использовали зафиксированные в жидком азоте и лиофильно высушенные образцы. Разделение индивидуальных каротиноидов (Кар) проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографической системе серии Smartline (“Knauer”, Германия) с использованием колонки Диасфер-110-С18-NT (“БиоХимМак СТ”, Россия). Для построения градуировочных зависимостей исполь-

зовали стандарты пигментов (“Sigma” и “Fluka”, США). Уровень дезоксидации пигментов (DEPS) виолаксантофиллового цикла (ВКЦ) характеризовали по соотношению $(Zea + 0.5 \text{ Ант}) / (\text{Вио} + \text{Ант} + Zea)$, где: Zea – зеаксантин, Ант – антераксантин и Вио – виолаксантин. Определение содержания и состава фотосинтетических пигментов проводили в 4–6-кратной биологической повторности.

Спектры низкотемпературной флуоресценции хлорофилла a изучали у собранных в январе и хранящихся до конца апреля при температуре -18°C и свежесобранных в апреле талломоов. Измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi-850 (“Hitachi”, Япония) при 77K (-196°C). Для возбуждения флуоресценции применяли излучение с длиной волны 435 нм . Спектры флуоресценции регистрировали в области $650\text{--}780\text{ нм}$ и нормировали по интенсивности флуоресценции при $\lambda = 735\text{ нм}$.

Показатели индуцированной флуоресценции хлорофилла a ФСП измеряли с помощью флуориметра РАМ-2100 (“Walz”, Германия) после гидратации и кратковременной акклимации талломоов в лабораторных условиях (температура около 22°C , интенсивность ФАР $20\text{--}30\text{ мкмоль квантов/м}^2\text{ с}$, продолжительность $1.5\text{--}2\text{ ч}$). Уровень минимальной (F_0) и максимальной (F_m) флуоресценции измеряли после выдерживания талломоов $30\text{--}40\text{ мин}$ в темноте. Затем в течение $10\text{--}15\text{ мин}$ адаптировали таллом к актиничному свету различной интенсивности в диапазоне от 0 до $2000\text{ мкмоль квантов/м}^2\text{ с}$ и измеряли величины стационарного (F_t), фонового (F_0') и максимального (F_m') уровней флуоресценции. В качестве источника света использовали встроенную галогеновую лампу флуориметра. При оценке динамики восстановления функциональных параметров фотобионта талломоов, отобранных в зимний период, слоевища после отбора в природе хранили одни сутки при -16°C , измерения проводили при температуре 22°C через определенные промежутки времени.

Потенциальный квантовый выход ФСП рассчитывали согласно [10]:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m. \quad (1)$$

Реальный квантовый выход ФСП (Φ_{PSII}) у адаптированных к действующему свету талломоов рассчитывали по формуле:

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t)/F_m'. \quad (2)$$

Значения коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла a ФСП (NPQ) определяли по формуле:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'. \quad (3)$$

Относительную скорость транспорта электронов через ФСП рассчитывали как:

$$\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times 0.5, \quad (4)$$

где PPFD – плотность потока квантов ФАР. Для описания зависимости ETR от уровня PPFD применяли экспоненциальную функцию:

$$f(x) = a(1 - e^{-bx}) \quad (5)$$

и рассчитывали величину максимальной скорости транспорта электронов (ETR_{max}) и величину PPFD_{sat} , при которой ETR равна 90% от ETR_{max} [11]. Определения параметров индуцированной флуоресценции хлорофилла проводили в $5\text{--}10$ -кратной биологической повторности.

$\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ -газообмен измеряли с помощью поративной системы ADC LCPPro+ (“ADC BioScientific Ltd”, Англия) при температуре 20°C . Перед проведением измерений талломы адаптировали в условиях, аналогичных примененным при измерении показателей индуцированной флуоресценции хлорофилла. Лопасть таллома площадью $3\text{--}4\text{ см}^2$ заключали в листовую камеру-прищепку, выдерживали в течение 2 мин и проводили серию измерений газообмена с интервалом записи данных 1 мин . Зависимость скорости нетто-поглощения CO_2 (Φ_n) талломоов от освещенности определяли в диапазоне ФАР от 0 до $2000\text{ мкмоль квантов/м}^2\text{ с}$ при концентрации CO_2 около 0.04% . Для получения световой кривой использовали от 10 до 30 талломоов. Квантовый выход фотосинтеза (Φ) и световой компенсационный пункт (СКП) CO_2 -газообмена таллома находили по результатам регрессионного анализа начального участка световой кривой в диапазоне ФАР от 0 до $200\text{ мкмоль квантов/м}^2\text{ с}$.

Скорость дыхания талломоов определяли по поглощению O_2 при 20°C полярографически с использованием электрода Кларка на системе Oxutherm (“Hansatech Inst.”, Англия) и выражали в $\text{нмоль O}_2/\text{г сухой массы мин}$. Высечки из краевых функционально активных участков талломоов общей массой $15\text{--}20\text{ мг}$ помещали в реакционный сосуд объемом 4 мл , содержащий 1.5 мл буфера HEPES (“Helicon”, Россия), в концентрации 50 мМ , величина pH 7.2 . Измерения проводили при постоянном перемешивании образцов.

Активность дыхательных путей оценивали при помощи специфических ингибиторов [12]. Скорость поглощения кислорода выражали как сумму отдельных компонент:

$$V_t = V_{\text{alt}} + V_{\text{cyt}} + V_{\text{res}}, \quad (6)$$

где V_t – общее дыхание; V_{alt} – альтернативное дыхание, подавляемое ингибитором альтернативной оксидазы, V_{cyt} – цианидчувствительное (цитохромное) дыхание; V_{res} – остаточное дыхание, регистри-

Таблица 2. Содержание и соотношение фотосинтетических пигментов в талломах крупнолистоватого лишайника *Lobaria pulmonaria* в разные сезоны года

Месяцы	Хлорофиллы, мг/г сухой массы	Хл <i>a</i> , % суммы хлорофиллов	Каротиноиды, мг/г сухой массы	<u>Хлорофиллы</u> Каротиноиды
Апрель	0.86 ± 0.05 ^a	76.7	0.28 ± 0.01 ^a	3.1 ± 0.1 ^a
Июнь	1.89 ± 0.08 ^{cd}	72.0	0.40 ± 0.02 ^b	4.7 ± 0.3 ^b
Октябрь	2.30 ± 0.30 ^d	75.2	0.70 ± 0.07 ^c	3.3 ± 0.1 ^a
Январь	1.64 ± 0.21 ^{bc}	76.2	0.48 ± 0.05 ^{bc}	3.4 ± 0.7 ^a

Примечание. Приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки; разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра в течение года при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$ (дисперсионный анализ ANOVA, критерий Дункана, $n = 6$).

руемое в присутствии ингибиторов альтернативного и цитохромного дыхательных путей.

В качестве ингибитора альтернативной оксидазы использовали 6 мМ раствор салицилгидроксамовой кислоты (“Lancaster”, Англия). Активность цитохромоксидазы подавляли 2 мМ раствором KCN (“Sigma”, США). Оптимальные концентрации ингибиторов митохондриальных оксидаз были подобраны в предварительных экспериментах.

Скорость метаболического тепловыделения измеряли на изотермическом микрокалориметре Биотест-2 (Институт биологического приборостроения Российской академии наук, г. Пушкино, Россия) при 20°C. Краевые участки талломов массой около 100 мг помещали в контейнеры, герметично закрывали крышкой и устанавливали в рабочие ячейки. Для выравнивания различий тепловых потоков в ячейку сравнения устанавливали пустой контейнер. Интенсивность тепловыделения (Q , мкВт/мг сухой массы) рассчитывали по уравнению:

$$Q = [(q_1 - (q_{n1} + q_{n2})/2) \times 0.22] / m, \quad (7)$$

где q_1 – метаболическое тепловыделение от образца; q_{n1} и q_{n2} – нулевое значение теплового потока перед и после измерения тепловыделения объекта (отн. ед.); 0.22 – калибровочный коэффициент калориметра, мкВт, m – сухая масса образца, мг.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Значимость различий между средними значениями измеряемых показателей оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (критерий Дункана). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилкса. Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$. В таблицах и на рисунках приведены средние арифметические значения со стандартной ошибкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание фотосинтетических пигментов и уровень конверсии пигментов виолаксантинового цикла. В талломе лишайников фотосинтетические пигменты являются маркерами фотобионта. Согласно полученным данным, пигментный фонд *L. pulmonaria* подвергался сезонным изменениям (табл. 2). Наименьшее содержание зеленых пигментов было отмечено весной (апрель). К осени (сентябрь–октябрь) фонд хлорофиллов заметно возростал. На долю Хл *a* приходилось в среднем 75% суммы всех зеленых пигментов. Содержание каротиноидов (Кар) было в 3–4 раза меньше, чем хлорофиллов.

Пул Кар был представлен в основном ксантофиллами (табл. 3). Лютеин составлял около 50%, тогда как на долю неоксантина приходилось 10–12%. Пигменты виолаксантинового цикла (ВКЦ) – виолаксантин, зеаксантин и антраксантин – в сумме составляли 20–25% фонда Кар, большая их часть приходилась на виолаксантин. Уровень конверсии пигментов ВКЦ летом составлял в среднем 15%, зимой и весной повышался в 1.5–2 раза.

Анализ спектров *низкотемпературной флуоресценции хлорофилла* выявил, что у отобранных весной талломов соотношение интенсивностей интегрального сигнала флуоресценции при 735 и 685 нм, соответствующих максимумам флуоресценции светособирающих комплексов ФС I и ФС II, составляло 1.27 (рис. 1а). Длительное (с января по апрель) хранение талломов при –18°C приводило к повышению соотношения F_{735}/F_{685} до 1.98 (рис. 1б). После гидратации и 30-часовой акклимации этих же талломов при температуре 22°C отмечали снижение соотношения F_{735}/F_{685} до значений, близких к зарегистрированным у отобранных в весенний период талломов.

Показатели индуцированной флуоресценции хлорофилла а ФС II и CO₂ – газообмен талломов. Отобранные в зимний период образцы лишайника проявляли фотохимическую активность практически сразу же после их гидратации и акклимации при

Таблица 3. Сезонная динамика содержания индивидуальных каротиноидов в талломах *Lobaria pulmonaria*, ммоль/моль хлорофилла

Каротиноиды	Апрель	Июнь	Октябрь	Январь
Неоксантин	45.0 ± 3.0 ^a	15.0 ± 0.7 ^a	108.8 ± 43.2 ^b	20.3 ± 4.8 ^a
Виолаксантин	61.8 ± 1.1 ^a	27.0 ± 2.9 ^a	131.1 ± 57.9 ^b	21.0 ± 2.2 ^a
Антраксантин	10.6 ± 1.6 ^b	0.74 ± 0.1 ^a	9.1 ± 4.0 ^b	11.3 ± 2.2 ^b
Лютеин	215.5 ± 18.5 ^b	67.5 ± 3.4 ^a	408.8 ± 137.4 ^c	89.8 ± 21.7 ^a
Зеаксантин	15.9 ± 1.4 ^c	4.0 ± 0.1 ^a	19.6 ± 3.1 ^d	8.0 ± 0.7 ^b
β-каротин	66.5 ± 3.8 ^a	23.7 ± 1.9 ^a	135.4 ± 60.9 ^b	35.5 ± 7.8 ^a
Вио + Ант + Зеа	88.3 ± 1.6 ^b	31.8 ± 2.9 ^a	159.8 ± 52.1 ^c	40.3 ± 1.3 ^a
DEPS, %	24 ± 1 ^b	14 ± 1 ^a	17 ± 10 ^{ab}	34 ± 4 ^c

Примечание. Вио + Ант + Зеа – сумма компонентов ВКЦ (% от суммы Кар); DEPS – степень дезоксидации пигментов ВКЦ. Приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки, разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра в течение года при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$ (дисперсионный анализ ANOVA, критерий Дункана, $n = 4-6$).

22°C. В лабораторных условиях максимальный квантовый выход ФСП (F_v/F_m) возрастал в течение первого часа с 0.54 до 0.68 отн. ед. и в дальнейшем практически не изменялся (табл. 4). Динамика изменения величины реального квантового выхода (Φ_{PSII}) имела сходный характер, однако временной период, необходимый для достижения стационарного уровня, был несколько больше. При умеренной освещенности (200 мкмоль квантов/м² с) величина Φ_{PSII} после 4 ч акклимации талломов в лабораторных условиях составила около 0.4 отн. ед. Величина коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ФСП (NPQ),

характеризующего уровень тепловой диссипации поглощенной энергии светового потока, практически не изменялась во времени и варьировала в пределах 0.8–1.2 отн. ед., проявляя тенденцию к снижению после 4 ч акклимации. Скорость фотохимического транспорта электронов через ФСП (ETR) в процессе акклимации талломов изменялась незначительно. Зарегистрированная в первые минуты после перенесения талломов в контролируемые условия величина ETR была всего на 25% меньше, чем спустя 20 ч акклимации. По сравнению с показателями ФСА, характеризующими фотохимическую активность, изменения процессов, связанных с ассимиляцией CO₂, были более выражены. Скорость нетто-поглощения CO₂ (Φ_n) неуклонно возрастала, и спустя 20 ч с начала акклимации талломов превысила 4 мкмоль CO₂/м² с.

Чтобы выявить влияние сезонных изменений факторов среды на состояние фотосинтетического аппарата, сравнивали функциональные показатели у отобранных в разные периоды года талломов. Талломы предварительно гидратировали и акклимировали в течение 1.5 ч при 22°C.

Величина F_v/F_m в течение года варьировала незначительно, в пределах 0.6–0.7 отн. ед. Показатели, характеризующие реальный квантовый выход, нефотохимическое тушение и скорость потока электронов через фотосистемы, сильно зависели от освещенности, но мало изменялись в зависимости от сезона года (рис. 2, 3). В то же время можно отметить тенденцию к снижению величины Φ_{PSII} и повышению NPQ у талломов, отобранных в зимне-весенний период. На сильном свете величина NPQ, отражающая активность процессов тепловой диссипации энергии, у “зимних” талломов достигала 4–5 отн. ед., а у “летних” и “осенних” не превышала 3 отн. ед.

Показатель ETR зависит от реального квантового выхода и плотности светового потока. В диапазоне

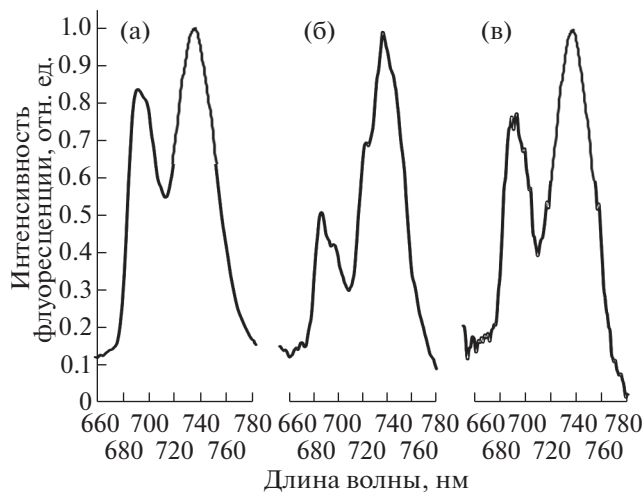


Рис. 1. Спектры излучения флуоресценции хлорофилла *a* фотобионта *Lobaria pulmonaria*. $\lambda_{(возб.)} = 435$ нм, $T = 77$ К. Спектры нормированы по интенсивности флуоресценции при 735 нм. Измерения проводили на собранных в апреле талломах (а), талломах, содержащихся в течение 5 месяцев при -18°C (б), и этих же талломах спустя 30 ч акклимации в условиях лаборатории (в).

Таблица 4. Динамика изменений функциональных параметров ФСII фотобионта *Lobaria pulmonaria* после перенесения талломов из природных в контролируемые условия зимой (январь)

Показатели	5 мин	60 мин	120 мин	240 мин	20 ч
F_v/F_m , отн. ед.	0.54 ± 0.02 ^a	0.68 ± 0.01 ^b	0.69 ± 0.01 ^b	0.70 ± 0.01 ^b	0.72 ± 0.01 ^b
Φ_{PSII} , отн. ед.	0.32 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.02 ^{ab}	0.39 ± 0.02 ^{ab}	0.43 ± 0.02 ^b
NPQ, отн. ед.	1.18 ± 0.14 ^a	1.16 ± 0.17 ^a	1.23 ± 0.19 ^a	0.84 ± 0.10 ^a	0.94 ± 0.17 ^a
ETR, мкмоль/м ² с	31 ± 2 ^a	32 ± 1 ^a	37 ± 2 ^{ab}	37 ± 2 ^{ab}	41 ± 2 ^b
Φ_n , мкмоль CO ₂ /м ² с	Не измеряли	1.51 ± 0.47 ^a	2.65 ± 0.39 ^{ab}	3.18 ± 0.47 ^{bc}	4.29 ± 0.52 ^c

Представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Измерения показателей флуоресценции Хл *a* и нетто-поглощения CO₂ (Φ_n) выполнены при интенсивности PPFD ~ 200 мкмоль квантов/м²с на гидратированных талломах при 18–22°C. Разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра в течение года при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$ (дисперсионный анализ ANOVA, критерий Дункана, $n = 5-10$).

Таблица 5. Результаты моделирования световой зависимости скорости транспорта электронов через ФСII фотобионта *Lobaria pulmonaria* в разные сезоны года

Параметр	Апрель	Июнь	Октябрь	Январь
ETR _{max} , мкмоль/м ² с	88 ± 5	95 ± 4	80 ± 3	66 ± 3
ETR _{sat} , мкмоль/м ² с	79	86	72	59
PPFD _{sat} , мкмоль/м ² с	678	562	470	476

Примечание. Для описания зависимости ETR от интенсивности PPFD применяли экспоненциальную функцию $f(x) = a(1 - e^{-bx})$, расчет основных параметров (ETR_{max}, PPFD_{sat}, ETR_{sat}) проводили согласно [11]. Значения независимых параметров *a* ($P \leq 0.001$) и *b* ($P \leq 0.001$) были статистически значимы для выбранной функции.

PPFD от 0 до 400 мкмоль/м² с скорость переноса электронов через ФСII увеличивалась линейно ($N = 85, F(1,83) = 445, P < 0.001, R^2 = 0.84$). Как следует из данных табл. 5, более высокие величины ETR_{max} (88–95 мкмоль/м² с), были зарегистрированы у талломов в теплое время года. В зимний период отмечено достоверное ($t_{st} = 3.3, P \leq 0.05$) снижение значений ETR_{max} на 30%. Для талломов, собранных в апреле–июне, насыщение скорости транспорта электронов через ФСII происходило при PPFD 600–700 мкмоль квантов/м² с (рис. 3, табл. 5). Осенью и зимой световое насыщение фотохимических реакций ФСII достигалось при более низкой освещенности, величина PPFD_{sat} составляла менее 500 мкмоль квантов/м² с.

Определения CO₂-газообмена показали, что скорость выделения CO₂ в темноте составляла 1–2 мкмоль CO₂/м² с, причем отмечали тенденцию к увеличению дыхания талломов, отобранных в холодное время года (рис. 4, табл. 6). Переход талломов от выделения к нетто-поглощению CO₂ наблюдался при сравнительно высокой PPFD (20–70 мкмоль квантов/м² с). Скорость нетто-поглощения CO₂ талломов возрастала с повышением уровня освещенности. В области светового насыщения скорость Φ_n “летних” талломов была почти вдвое ниже, чем у талломов, отобранных весной, осенью и даже зимой.

Активность и соотношение дыхательных путей в талломах лишайника. Талломы *L. pulmonaria* характеризовались довольно высокой дыхательной способностью во все сезоны года (табл. 7). Скорость поглощения O₂ при 20°C варьировала в пределах 700–900 нмоль/г сухой массы мин. Более высокие значения данного показателя были зарегистрированы весной и осенью, чем летом и зимой. Однако различия были статистически незначимы. Интенсивность общего поглощения O₂ была обусловлена митохондриальным дыханием, доля остаточного (не связанного с митохондриями) дыхания составляла не более 15%. Активность дыхательных путей и их вклад в общее дыхание изменялись в течение года. Доля цитохромного пути (ЦП) варьировала от 30 (октябрь) до 56% (июнь), а на дыхание по альтернативному пути (АП) приходилось от 29 (июнь) до 56% (октябрь). В среднем за год вклад ЦП и АП в общее поглощение O₂ составил 45 и 40%, соответственно. Величина соотношения активности цитохромного и альтернативного путей дыхания (V_{cyt}/V_{alt}) изменялась от 0.5 (октябрь) до 1.9 (июнь).

Интенсивность тепловыделения (*Q*), отражающая общую метаболическую активность, изменялась в пределах 1.7–4.4 мкВт/мг сухой массы, более высокие значения данного показателя регистрировали весной и осенью. Следует отметить

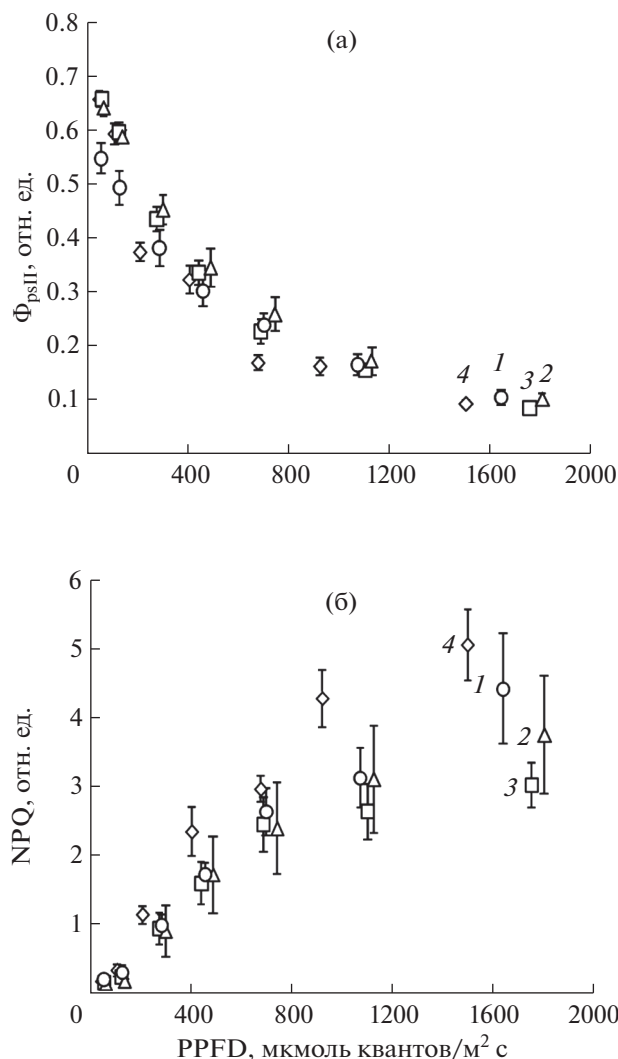


Рис. 2. Зависимость реального квантового выхода ФСII (а) и коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (б) от плотности потока фотонов у талломов *Lobaria pulmonaria*, отобранных в разные месяцы года: 1 – апрель, 2 – июнь, 3 – октябрь, 4 – январь. Представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки измеряемых показателей. Измерения проводились в течение 2012–2014 гг. ($n = 5–7$ для каждого уровня PPFD в каждый год исследований).

сходство сезонных изменений величины Q и активности альтернативного дыхания.

ОБСУЖДЕНИЕ

Лишайники являются пойкилогидрическими организмами, неспособными удерживать воду. Наиболее благоприятными для роста *L. pulmonaria* считаются весенний и осенний периоды с умеренной температурой и высокой влажностью [13]. Летом талломы часто подсыхают и становятся физиологически неактивными. Проведенные на-

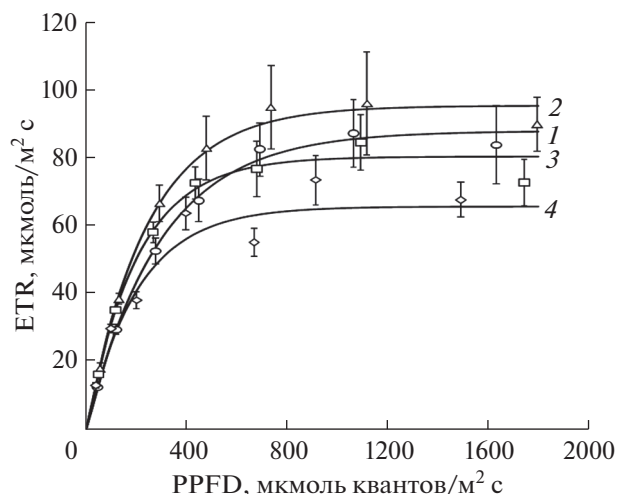


Рис. 3. Зависимость скорости транспорта электронов через ФСII от плотности потока фотонов у талломов *Lobaria pulmonaria*, отобранных в разные месяцы года: 1 – апрель, 2 – июнь, 3 – октябрь, 4 – январь. Маркерами представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки ETR для талломов *L. pulmonaria*, отобранных в разные месяцы в течение 2012–2014 гг. ($n = 5–7$ для каждого уровня PPFD в каждый год исследований). Сплошные кривые отражают результаты моделирования зависимости ETR от PPFD с помощью экспоненциальной функции $f(x) = a(1 - e^{-bx})$ [11]. Значения независимых параметров a ($P \leq 0.001$) и b ($P \leq 0.001$) были статистически значимы для выбранной функции.

ми ранее исследования показали, что при потере влаги площадь талломов лобарии уменьшалась, края их скручивались, а сложенный грибными гифами верхний коровый слой уплотнялся и плохо пропускал свет к водорослям [7]. Поэтому для получения сопоставимых данных, характеризующих сезонные изменения фотосинтетической и дыхательной активности, свежеобранные талломы *L. pulmonaria* предварительно гидратировали и акклимировали в стандартных условиях в течение 1.5–2 ч. Целесообразность такой подготовки талломов была отмечена и другими авторами [10].

Нами установлено, что фотобионт зимующих талломов лишайника способен достаточно быстро восстанавливать функциональную активность ФСА в лабораторных условиях (табл. 4). Одночасовой адаптации гидратированных талломов при 22°C было достаточно для достижения величины F_v/F_m , близкой к максимальной для хлоробионтных лишайников [10]. Величины Φ_{psII} и NPQ талломов *L. pulmonaria* в зимний период были сопоставимы с типичными для лета значениями этих показателей уже после 4-часовой акклимации. При этом скорость нетто-поглощения CO_2 у акклимированных в течение 2–4 ч в лабораторных условиях талломов составила около 3 $\mu\text{mole}/\text{m}^2 \cdot \text{с}$.

Эти результаты свидетельствуют о сохранности структуры ФСА фотобионта при перезимовке лишайника, что подтверждается также данными, полученными при измерении спектров низкотемпературной флуоресценции хлорофилла *a* (рис. 1). Их анализ показал, что длительное воздействие низкой отрицательной температуры не приводило к деградации пигмент-белковых комплексов ФСА фотобионта. У талломов, длительное время хранившихся при отрицательной температуре, отмечали небольшое изменение соотношения F_{735}/F_{685} по сравнению с образцами, отобранными весной, а после 30-часовой акклимации этих талломов в условиях лаборатории разница практически нивелировалась. Подобные закономерности наблюдали у *L. pulmonaria* при десикации и в условиях осмотического стресса [14]. Вероятно, быстрое перераспределение потока энергии между ФСII и ФСI может способствовать сохранению целостности пигмент-белковых комплексов фотосистем в периоды с частыми изменениями условий влагообеспеченности или в условиях повторяющихся переходов температуры воздуха через 0°C, сопровождающихся изменением состояния воды в талломах.

В опытах с листоватым лишайником *Umbilicaria aprina* было показано наличие в талломах трех фракций воды: слабо, сильно и очень сильно связанной [15]. При постепенном охлаждении слоевищ до -20°C слабо связанная вода диффундировала из клеток на поверхность гиф и в межклетники медуллярного и альгального слоев [16]. В результате образующийся в межклетниках лед не повреждал таллом. При оттаивании таллома клетки водоросли и гриба поглощали талую воду из межклетников и вновь становились тургесцентными. Ранее с использованием метода биологической калориметрии нами было показано, что фазовый переход вода-лед в талломах *L. pulmonaria* зимой происходит при температуре -10 °C, при этом замерзает около 30% содержащейся в них воды [7].

Несмотря на устойчивость ФСА лишайника к действию неблагоприятных факторов среды в зимнее время, весной отмечали двукратное со-

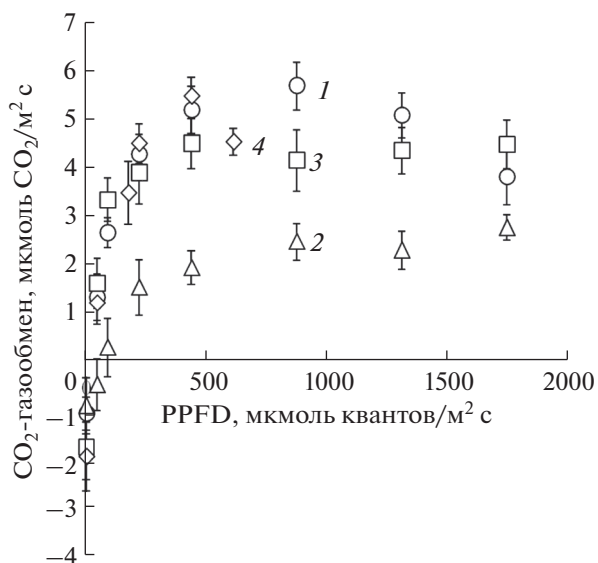


Рис. 4. Зависимость скорости нетто-поглощения CO₂ от плотности потока фотонов в талломах *Lobaria pulmonaria*, отобранных в разные месяцы года: 1 – апрель, 2 – июнь, 3 – октябрь, 4 – январь. Маркерами представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки для талломов *L. pulmonaria*, отобранных в разные месяцы в течение 2012–2014 гг. (n = 5–7 для каждого уровня PPFD в каждый год исследований).

кращение фонда хлорофиллов (табл. 2). Уменьшение содержания зеленых пигментов можно считать адаптивной реакцией, так как это снижает поглощение световой энергии в период, когда температуры ограничивают ее использование для ассимиляции CO₂, а избыточная инсоляция может привести к фотодеструкции ФСА. Некоторые авторы связывают изменение пигментного фонда лишайников в течение вегетационного периода с изменением количества клеток фотобионта [17]. Видимо, сезонная регуляция численности клеток фотобионта позволяет лишайникам адаптироваться к изменению условий освещения и обеспечивать поступление необходимого количества органического углерода к микобионту в течение вегетации.

Таблица 6. Характеристики световой зависимости CO₂-газообмена талломов *Lobaria pulmonaria* в разные сезоны года

Показатели	Апрель	Июнь	Октябрь	Январь
Квантовый выход, φ	0.043 ± 0.008 ^a	0.011 ± 0.003 ^b	0.056 ± 0.009 ^a	0.029 ± 0.006 ^c
СКП, мкмоль квантов/м ² с	20 ± 14 ^a	77 ± 59 ^a	24 ± 13 ^a	33 ± 22 ^a
Φ _н , мкмоль CO ₂ /м ² с	5.7 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.4 ^b	4.5 ± 0.5 ^a	5.5 ± 0.4 ^a
Д _т , мкмоль CO ₂ /м ² с	-1.1 ± 0.5 ^a	-0.9 ± 0.6 ^a	-1.8 ± 0.7 ^a	-1.9 ± 0.7 ^a

Примечание: φ – квантовый выход фотосинтеза, СКП – световой компенсационный пункт, Φ_н – максимальные значения нетто-поглощения CO₂, Д_т – темновое дыхание. Разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра в течение года при заданном уровне значимости P ≤ 0.05 (дисперсионный анализ ANOVA, критерий Дункана, n = 5–10).

Таблица 7. Сезонная динамика интенсивности общего (V_t), цитохромного (V_{cyt}), альтернативного дыхания (V_{alt}) и метаболического тепловыделения (Q) в талломах лишайника *Lobaria pulmonaria* в разные сезоны года

Сроки отбора образцов	Поглощение O_2 , нмоль/(г сухой массы мин)				Тепловыделение (Q), мкВт/мг сухой массы
	V_t	V_{cyt}	V_{alt}	$V_{\text{cyt}}/V_{\text{alt}}$	
Апрель	885 ± 58 ^a	382 ± 56 ^a	382 ± 25 ^{bc}	1.0 ± 0.2 ^{ab}	4.4 ± 0.3 ^c
Июнь	688 ± 47 ^a	387 ± 33 ^a	201 ± 31 ^a	2.4 ± 0.5 ^b	1.7 ± 0.3 ^a
Октябрь	945 ± 61 ^a	265 ± 43 ^a	534 ± 76 ^c	0.5 ± 0.1 ^a	3.4 ± 0.4 ^{bc}
Январь	796 ± 82 ^a	387 ± 63 ^a	287 ± 31 ^{ab}	1.5 ± 0.4 ^{ab}	2.8 ± 0.2 ^{ab}

Примечание. Представлены средние арифметические значения данных нескольких серий независимых измерений, выполненных с 2012 по 2017 гг. ($n = 5-11$ для каждого месяца). Измерения проводили при температуре 20°C. Разные надстрочные символы обозначают статистическую значимость изменений параметра в течение года при заданном уровне значимости $P \leq 0.05$ (дисперсионный анализ ANOVA, критерий Дункана).

Основным механизмом, предотвращающим фотодеструкцию ФСА, является зеаксантин-зависимое тушение избыточной энергии в ФСII зеленой водоросли. Светозависимая конверсия виолаксантина с образованием зеаксантина осуществляется ксантофилловым циклом [18], но, в отличие от высших растений, регуляторным белком здесь служит LHCSR [19], а не PSBS. У *L. pulmonaria* более высокие значения DEPS (24–34%) были зарегистрированы в зимне-весенний период (табл. 3). Летом уровень DEPS составлял около 15%. Повышение DEPS зимой согласуется с наблюдаемым в этот период увеличением параметра нефотохимического тушения, связанного с тепловой диссипацией энергии (рис. 2б) и тенденцией к снижению реального квантового выхода ФСII (рис. 2а). Ранее сходные сезонные изменения в активности фотопротекторных механизмов были показаны для талломов *L. pulmonaria* в условиях листопадных лесов [20] и эпилитного лишайника *Xanthoria parietina* при изучении механизмов адаптации ФСА к световым условиям среды [21].

Анализ динамики сезонных изменений зависимости ETR от PPFD указывает на сохранение высокой эффективности фотохимических процессов ФСII фотобионта в широком диапазоне освещенности в течение всего года. Более высокие значения ETR_{max} отмечены для талломов летом, а в весенний и осенний периоды величина ETR_{max} снижалась незначительно (табл. 5). Световое насыщение ETR наблюдалось при PPFD от 470 до 680 мкмоль/м² с, в несколько раз превышающей средний уровень освещенности в естественных условиях обитания лишайника. По всей видимости, сезонные изменения фотохимической активности ФСА не ограничивают интенсивность фотосинтеза, а реализация способности ассимилировать CO₂ определяется на уровне тем-

новых стадий связывания углерода и зависит от условий среды и состояния самого лишайника.

Принято относить лишайники к фототрофным организмам с низкой фотосинтетической активностью. Судя по полученным нами данным, гидратированные талломы крупнолистоватого лишайника *L. pulmonaria* при насыщающей интенсивности света способны ассимилировать CO₂ со скоростью до 5 мкмоль/м² с (рис. 4, табл. 6). Снижение скорости Φ_n , увеличение СКП и уменьшение квантового выхода в июне, скорее всего, были обусловлены сильной потерей влаги талломами. Установлено, что в природных условиях летом при высокой температуре и низкой влажности воздуха талломы *L. pulmonaria* быстро теряли влагу, и в дневные часы у них наблюдалось выделение CO₂ [7]. Положительный газообмен регистрировали только рано утром, когда талломы частично гидратировались за счет поглощения атмосферной влаги. В результате большую часть суток углеродный баланс лишайника был отрицательным. Наши результаты подтверждают мнение ряда авторов [13, 17] о том, что наиболее благоприятными для лишайников лесной зоны являются переходные (весенний и осенний) периоды с умеренно теплой и влажной погодой, когда складывается положительный углеродный баланс и активизируется рост талломов.

С другой стороны, CO₂-газообмен *L. pulmonaria* в летний период может зависеть от количества рибулозобифосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско). По имеющимся в литературе данным [22], снижение освещенности в древостое с доминированием листопадных видов летом привело к уменьшению содержания в талломах *L. pulmonaria* большой субъединицы Рубиско. Увеличение количества субъединиц Рубиско в осенне-зимний период авторы связывали с адаптацией лишайника к ожидаемому предстоящей весной повышению

уровня освещенности в пологе. Это отчасти может объяснить наблюдаемую нами высокую потенциальную активность фотосинтеза талломов в зимний период. Важно отметить, что насыщение нетто-фотосинтеза *L. pulmonaria* световой энергией наблюдалось при PPFD не менее 500 мкмоль квантов/м² с (рис. 4), тогда как большую часть времени освещенность в природных условиях была существенно (в 2–5 раз) ниже (табл. 1).

В листьях растений темновое дыхание не превышает 15–20% видимого фотосинтеза. Превалирование гетеротрофного микобионта в биомассе лишайника сказывается на соотношении поглощения и выделения CO₂ в талломах (табл. 6). По данным литературы [23], в природных условиях дыхание лишайников повышается в летне-осенний период и сильнее реагирует на изменение температуры, чем зимой. Мы не выявили значимых сезонных изменений дыхательной способности гидратированных талломов *L. pulmonaria*, измеренной при температуре 20°C по скорости темнового выделения CO₂ и поглощения O₂ (табл. 6, 7). При этом весной и осенью наблюдали активацию дыхания через цианидустойчивую альтернативную оксидазу (АОХ), что приводило к изменению соотношения дыхательных путей. Известно, что АОХ присутствует в митохондриальной ЭТЦ клеток растений, водорослей, грибов, а транспорт электронов через АОХ при дыхании клеток не сопряжен с образованием энергии и приводит к ее тепловой диссипации [24]. До последнего времени сведения о функционировании дыхательных путей у лишайников практически отсутствовали. У *L. pulmonaria* способность к дыханию по основному энергетически эффективному цитохромному пути (ЦП) значимо не изменялась в течение сезона. Индукция альтернативного пути (АП) дыхания у растений рассматривается как один из основных физиологических маркеров стресса [25]. Ранее нами было отмечено повышение активности АП в талломах лишайников при действии УФ-В облучения и кратковременном действии высокой температуры [26, 27]. Возможно, что активация АП дыхания в талломах лишайника весной и осенью направлена на предотвращение перевосстановления пула убихинона и, следовательно, избыточного образования АФК. Роль АП дыхания как компонента антиоксидантной системы показана для высших растений и нелихенизированных грибов [28, 29]. С другой стороны, весна и осень – наиболее благоприятное время для роста лишайников. Высокая скорость транспорта электронов по АП могла способствовать интенсивному обороту цикла ди- и трикарбоновых кислот и поддержанию стабильной активности энергетически эффективного ЦП дыхания без перевосстановления митохондриальной ЭТЦ. В этом случае АП может служить индикатором повышения уровня метаболизма лишайников.

О повышении активности метаболизма в талломах *L. pulmonaria* весной и осенью свидетельствует также усиление метаболического тепловыделения (табл. 7). Причем увеличение Q совпадало с активацией АП. По мнению авторов работы [30], причиной наблюдаемого существенного повышения скорости тепловыделения в талломах *Peltigera polydactylon* после регидратации было увеличение интенсивности дыхания по АП. Однако прямых определений дыхания лишайника в данной работе не проводили.

Итак, многолетние исследования функциональных показателей крупнолистоватого лишайника *L. pulmonaria* выявили, что в оптимальных свето-температурных условиях гидратированные талломы способны ассимилировать CO₂ со скоростью 3–5 мкмоль/м² с в течение всего годового цикла. Во время перезимовки фотобионт лишайника проявляет фотохимическую активность и способность ассимилировать CO₂ сразу же после перенесения из природы в лабораторные условия, что свидетельствует о поддержании структурно-функциональной целостности ФСА. В сохранении метаболической активности участвует комплекс адаптивных физиологических механизмов. На уровне фотобионта происходят сезонные изменения содержания и соотношения пигментов, наблюдаются сезонные модуляции уровня конверсии пигментов ВКЦ, активности фотохимических процессов и энергодиссипации в ФСЦ. Микобионт доминирует в биомассе и дыхании лишайника, регулирует метаболизм вовлечением энергетически мало эффективного АП дыхания и поддержанием конститутивного уровня активности основного цитохромного дыхательного пути в течение годового цикла. Адаптивные механизмы активизируются в наиболее благоприятные для роста весенний и осенний периоды.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКР “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ АААА-А17-117033010038-7).

Авторы выражают благодарность к.б.н. М.С. Христину (Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушино) за помощь при измерении спектров низкотемпературной флуоресценции талломов *L. pulmonaria*.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Honegger R. Metabolic interactions at the mycobiont-photobiont interface in lichens // Plant Relationships /

- Eds. Carroll P.D.G.C., Tudzynski P.D.P. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997. P. 209.
2. Маноїленко К.В. Академик А.С. Фаминцын: от фундаментальной науки к запросам сельского хозяйства // Сельскохозяйственная биология. 2010. Т. 45. С. 117.
 3. Kappen L., Valladares F. Opportunistic growth and desiccation tolerance: The ecological success of poikilohydrous autotrophs // Handbook of Functional Plant Ecology / Eds. Pugnaire F., Valladares F. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. P. 9.
 4. Пыстина Т.Н. Лишайники таежных лесов Европейского Северо-Востока: подзоны южной и средней тайги. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2003. 239 с.
 5. Beckett R.P., Kranner I., Minibayeva F.V. Stress physiology and the symbiosis // Lichen Biology. 2nd ed. / Ed. Nash T.H.III. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. P. 134.
<https://doi.org/10.1017/SBO9780511790478.009>
 6. Yoshimura I. Lung lichens and their vegetation in Japan and the other regions // Lobarion lichens as indicators of the primeval forests of the Eastern Carpathians. / Eds. Kondratyuk S.Y., Coppins B.J. Kiev: Phytosociocentre, 1998. P. 53.
 7. Головки Т.К., Далькэ И.В., Дымова О.В., Мальшеев Р.В., Плюснина С.Н., Пыстина Т.Н., Семенова Н.А., Табленкова Г.Н., Шелякин М.А. Функциональная экология лишайника *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. в таежной зоне на Европейском Северо-Востоке России // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2018. Т. 3. С. 23.
 8. Атлас Республики Коми по климату и гидрологии / Отв. ред. Таскаев А.И. Москва: Издательский дом "Дрофа", Изд-во "ДиК", 1997. 115 с.
 9. Дымова О.В., Кузиванова О.А. Оптимизация способа экстракции фотосинтетических пигментов и их содержание в талломах лишайников // Химия растительного сырья. 2018. Т.2. С. 137.
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2018023013>
 10. Jensen M. Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens // Protocols in Lichenology: Culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring / Eds. Kranner I.S., Beckett R.P., Varma A.K. Berlin, Heidelberg: Springer, 2002. P. 135.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-56359-1_9
 11. Rascher U., Liebig M., Lüttge U. Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site in the field // Plant Cell Environ. 2000. V. 23. P. 1397.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00650.x>
 12. Bahr J.T., Bonner W.D. Cyanide-insensitive respiration I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. P. 3441.
 13. Muir P.S., Shirazi A.M., Patrie J. Seasonal growth dynamics in the lichen *Lobaria pulmonaria* // Bryologist. 1997. V. 100. P. 458.
<https://doi.org/10.2307/3244407>
 14. Chakir S., Jensen M. How does *Lobaria pulmonaria* regulate photosystem II during progressive desiccation and osmotic water stress? A chlorophyll fluorescence study at room temperature and at 77 K // Physiol. Plant. 1999. V. 105. P. 257.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105210.x>
 15. Harańczyk H., Baciór M., Olech M.A. Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm // Antarct. Sci. 2008. V. 20. P. 527.
<https://doi.org/10.1017/S0954102008001363>
 16. Schroeter B., Scheidegger C. Water relations in lichens at subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide exchange in the lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica // New Phytol. 1995. V. 131. P. 273.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb05729.x>
 17. Tretiach M., Bertuzzi S., Candotto Carniel F., Virgilio D. Seasonal acclimation in the epiphytic lichen *Parmelia sulcata* is influenced by change in photobiont population density // Oecologia. 2013. V. 173. P. 649.
<https://doi.org/10.1007/s00442-013-2654-3>
 18. Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin // BBA – Bioenergetics. 1990. V. 1020. P. 1.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L)
 19. Pinnola A. The rise and fall of light-harvesting complex stress-related proteins as photoprotection agents during evolution // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 5527.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz317>
 20. MacKenzie T.D., Król M., Huner N.P.A., Campbell D.A. Seasonal changes in chlorophyll fluorescence quenching and the induction and capacity of the photoprotective xanthophyll cycle in *Lobaria pulmonaria* // Can. J. Bot. 2002. V. 80. P. 255.
<https://doi.org/10.1139/b02-005>
 21. Vrábliková H., McEvoy M., Solhaug K.A., Barták M., Gauslaa Y. Annual variation in photoacclimation and photoprotection of the photobiont in the foliose lichen *Xanthoria parietina* // J. Photochem. Photobiol. B. 2006. V. 83. P. 151.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.019>
 22. MacKenzie T.D., MacDonald T.M., Dubois L.A., Campbell D.A. Seasonal changes in temperature and light drive acclimation of photosynthetic physiology and macromolecular content in *Lobaria pulmonaria* // Planta. 2001. V. 214. P. 57.
<https://doi.org/10.1007/s004250100580>
 23. Lange O.L., Green T.G.A. Lichens show that fungi can acclimate their respiration to seasonal changes in temperature // Oecologia. 2005. V. 142. P. 11.
<https://doi.org/10.1007/s00442-004-1697-x>
 24. MacDonald A.E., Vanlerberghe G.C. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase // Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics. 2006.

- V. 1. P. 357.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2006.08.001>
25. *van Dongen J.T., Gupta K.J., Ramírez-Aguilar S.J., Araújo W.L., Nunes-Nesi A., Fernie A.R.* Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 1434.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.004>
26. *Шелякин М.А., Захожий И.Г., Головка Т.К.* Изменение дыхания и соотношения дыхательных путей при адаптации лишайников к действию УФ-В радиации // *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2018. Т 3(5). С. 100.
27. *Shelyakin M., Zakhozhiy I., Golovko T.* The effect of temperature on Antarctic lichen cytochrome and alternative respiratory pathway rates // *Polar Biol.* 2020. V. 43. P. 2003.
<https://doi.org/10.1007/s00300-020-02758-4>
28. *Maxwell D.P., Wang Y., McIntosh L.* The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. V. 96. P. 8271.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8271>
29. *Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M.* Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components // *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2001. V. 1504. P. 179.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00251-6)
30. *Beckett R.P., Alyabyev A.J., Minibayeva F.V.* Patterns of heat production during desiccation and rehydration in lichens differing in desiccation tolerance // *Lichenologist.* 2011. V. 43. P. 178.
<https://doi.org/10.1017/S0024282910000769>

ДЕЙСТВИЕ ФУРОСТАНОЛОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ КЛЕТОК *Dioscorea deltoidea* НА РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ЛЮЦЕРНЫ *IN VITRO*

© 2021 г. Л. А. Волкова^{а, *}, В. В. Урманцева^а, А. Б. Бургутин^а, А. М. Носов^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: la-volkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.12.2020 г.

После доработки 14.02.2021 г.

Принята к публикации 15.02.2021 г.

Исследовали влияние экзогенных фураностаноловых гликозидов (ФГ) на активность редокс-ферментов в суспензионной культуре клеток люцерны (*Medicago sativa* L.). Показано, что в результате 60-минутной обработки клеток люцерны ФГ в концентрации 10^{-5} М включается запуск образования АФК и повышение активности ферментов антиоксидантного комплекса – супероксиддисмутазы и гваякол-зависимой пероксидазы, у последней наиболее высокая активность была свойственна ионно-связанной фракции. С использованием ингибитора НАДФ·Н-оксидазы дифенилиодоний хлорида установлено, что генератором АФК при действии ФГ является НАДФ·Н-оксидаза плазмалеммы. Установлено, что обработка ФГ способствовала повышению в клетках люцерны *in vitro* активности ключевого фермента пентозофосфатного пути – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), а также глутатионредуктазы. Показана связь между функционированием Г-6-ФДГ, НАДФ·Н-оксидазы и глутатионредуктазы. Предполагается, что вследствие ингибирования одного из основных потребителей НАДФ·Н НАДФ·Н-оксидазы увеличение активности глутатионредуктазы способно предотвратить ингибирование Г-6-ФДГ. В условиях гиперосмотического стресса воздействие ФГ приводило к повышению жизнеспособности клеток люцерны *in vitro* до 70%, в то время как в контрольном варианте она не превышала 24%. При этом в исходных клетках без воздействия жизнеспособность была около 90%. Проявление такого эффекта ФГ происходило вследствие повышения активности альдегиддегидрогеназы, снижения уровня перекисного окисления липидов (на 24%), а также увеличения активности антиоксидантных ферментов. Обсуждаются механизмы биохимической адаптации, осуществляемые на уровне редокс-ферментных систем.

Ключевые слова: суспензионная культура клеток *Medicago sativa* L., фураностаноловые гликозиды, НАДФ·Н-оксидаза, супероксиддисмутазы, пероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глутатионредуктаза, гиперосмотический стресс

DOI: 10.31857/S0015330321050237

ВВЕДЕНИЕ

При изменении внешних условий для обеспечения нормальной жизнедеятельности растительных клеток не всегда бывает достаточно эффективности эндогенных защитных механизмов. Применение высокоактивных экзогенных индукторов способно усилить адаптивные реакции при действии биотических и абиотических стрессовых факторов [1]. К таким индукторам относятся, фураностаноловые гликозиды (ФГ), выделенные из культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall, оценка биологиче-

ских эффектов которых играет ключевую роль в использовании их в качестве элиситоров. Ранее нами было показано, что действие ФГ может осуществляться через генерацию АФК и направлено на индуцирование естественной устойчивости, как у культивируемых клеток, так и целых растений [2]. При действии ФГ выявлялись множественные изменения на физиолого-биохимическом уровне, имеющие адаптогенную направленность в условиях абиотического стресса [3, 4].

Известно, что одним из первых событий, происходящих в клетках при действии элиситоров, является продукция АФК [5]. Обеспечение низких уровней АФК, участвующих в системной межклеточной передаче сигналов, способствует поддержанию метаболических процессов в расти-

Сокращения: ФГ – фураностаноловые гликозиды; Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ГР – глутатионредуктаза; СОД – супероксиддисмутазы; ПО – пероксидаза; АР – альдегидредуктаза; АДГ – альдегиддегидрогеназа; ДФИ – дифенилиодоний хлорид.

тельных клетках [5]. В норме метаболизм клеток во многом зависит от редокс-баланса, который, в свою очередь, определяется соотношением и активностью компонентов про- и антиоксидантных систем.

Многие окислительно-восстановительные процессы клетки сопряжены в единый, тонко регулируемый сложный механизм. Связь между разными процессами осуществляют особые соединения, главная функция которых заключается в переносе восстановительных эквивалентов в цепи последовательных биохимических реакций. В последнее время все больше внимания в исследованиях обращается на регуляцию основных редокс-систем, таких как НАДФ⁺/НАДФ·Н редокс-пары и отношение окисленный/восстановленный глутатион (GSSG/GSH), в которых от значения соотношения восстановленных и окисленных форм зависят многие важнейшие процессы клетки. Известно, что в растительных клетках главным поставщиком восстановленной формы НАДФ·Н является окислительная ветвь пентозофосфатного цикла, ключевой фермент которого – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ) – рассматривается как основной поставщик НАДФ·Н, необходимого для работы НАДФ·Н-оксидазы, являющейся генератором супероксид-аниона [6]. Увеличение уровня последнего может происходить разными путями: в результате активации НАДФ·Н-оксидазы плазмалеммы, а также в результате проявления пероксидазами оксидазной активности с передачей электронов от восстановителей (например, НАДФ·Н) на молекулярный кислород [7]. Сигнальный потенциал O₂⁻ связан в первую очередь с его последующим превращением в H₂O₂, трансдукция сигнала которой исследована наиболее детально, что связано с ее относительной стабильностью [8].

Как уже отмечалось, GSSG/GSH – редокс-пара является важным клеточным редокс-показателем, участвующим в регуляции многих клеточных реакций. Равновесие редокс-пары GSSG/GSH внутри клетки регулируется разными метаболическими процессами, в том числе и активностью ферментов системы функционирования глутатиона, который находится преимущественно в восстановленном состоянии [9]. Большая часть биологических функций глутатиона осуществляется путем превращения его восстановленной формы (GSH) в окисленную (GSSG) с помощью фермента глутатионпероксидазы и последующего возвращения в восстановленную форму при участии НАДФ·Н-зависимой глутатионредуктазы (ГР), которая использует НАДФ·Н, синтезируемый в пентозофосфатном пути [10].

В настоящей работе исследовали адаптогенное действие ФГ с использованием в качестве объекта культуры клеток люцерны, имеющей ряд специфических функциональных особенностей, – в частности, активность гваякол-пероксидазы (ПО) в ней

на много порядков выше, чем в других исследуемых нами объектах. После длительного криогенного хранения популяция исследуемых клеток люцерны возобновляла рост, несмотря на низкий уровень выживаемости. Через 35 циклов роста в возобновленной популяции установилось динамическое равновесие клеток с цитогенетическими и физиологическими характеристиками, сходными с таковыми до замораживания [11]. Основным повреждающим фактором в результате процедуры замораживания-оттаивания является гиперосмотический стресс, к действию которого клетки люцерны были довольно чувствительны (погибало около 80% преимущественно полиплоидных клеток) [11]. В связи с этим клетки люцерны *in vitro* являются хорошей моделью для изучения защитного эффекта экзогенных фурастаноловых гликозидов на клетки растений в условиях гиперосмотического стресса. Кроме того, в задачу настоящего исследования входило изучение механизма действия ФГ в регуляции активности редокс-ферментов, с помощью которых происходит защита и обеспечение выживаемости клеток растений в стрессовых условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на восстановленной после 27 лет хранения в жидком азоте суспензионной культуре клеток люцерны (*Medicago sativa* L.) в условиях выращивания, описанных в работе Волковой с соавт. [11]. Для проведения экспериментов по изучению воздействия фурастаноловых гликозидов использовали фракцию ФГ, выделенную из водного экстракта лиофильно высушенной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall штамм ИФР ДМ-0.5, представляющую собой смесь ФГ – дельтозида и протодиосцина, в соотношении 2 : 3 с уровнем очистки 85%, как описано в работах [2, 3]. Для изучения действия ФГ клетки отбирали в течение цикла роста в заданные сутки и проводили 60-минутную экспозицию ФГ в концентрации 10⁻⁵ М [2, 3], при этом контролем служили клетки без воздействия. В качестве ингибитора НАДФ·Н-оксидазы был использован дифенилиодоний хлорид (ДФИ 100 мкМ, 60 мин) [3], оптимальные концентрация и экспозиция которого были определены в предварительных экспериментах.

Определение активности ферментов. После гомогенизации осажденных клеток суспензии (150–200 мг) в 0.1М трис-НСI-буфере (рН 7.5) и последующего центрифугирования гомогената при 10000 g в течение 10 мин (центрифуга erpendorf 5414) в супернатантах определяли активность ферментов.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49) определяли по увеличению светопоглощения при восстановлении НАДФ в среде, содержащей 80 мМ трис-НСI-буфер

(рН 7.5), 5 мМ MgSO₄, 2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0.2 мМ НАДФ. Для расчета активности фермента использовали коэффициент экстинкции, равный 6.22 мМ⁻¹ см⁻¹ [12]. Активность выражали в мкмоль/(мг белка мин).

Общую активность супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.11) определяли с использованием нитросинего тетразолия (НСТ), конкурирующего с СОД за супероксид-анионы, образующиеся в результате взаимодействия метионина и рибофлавина при освещении в течение 30 минут по методу Beauchamp и Fridovich [13]. Оптическую плотность измеряли при 560 нм; активность фермента выражали в относительных единицах на мг белка. За единицу активности СОД принимали 50% ингибирование образования формазана.

Активность гваякол-зависимой формы пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по изменению оптической плотности реакционной смеси в 0.1М калий-фосфатном буфере (рН 5.5) при 470 нм [14]. Активность пероксидазы рассчитывали по количеству окисленного гваякола в ммоль/(мг белка мин) с учетом $\epsilon = 26.6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Определение активности гваякол-зависимой пероксидазы в отдельных фракциях осуществляли согласно [15]. Анализ активности фермента проводили в следующих фракциях: в среде культивирования, ионносвязанной (экстракция 1М KCl), свободной (растворимой) после удаления перечисленных первых двух фракций (в среде и ионносвязанной) и ковалентносвязанной (с помощью 2-кратной обработки 2% тритоном X-100). Определение и расчет активности ПО производили, как описано выше.

Снижение активности гваякол-зависимой пероксидазы, вызванное присутствием в реакционной среде второго субстрата НАД·Н, определяли по методу, описанному в работе [2]. Определение и расчет пероксидазной активности ПО производили, как описано выше. Для сравнения разных вариантов величину снижения активности ПО вычисляли по формуле и выражали в %:

$$A (\%) = 100 \times (1 - A1/A2),$$

где A1 – активность фермента (ммоль/(мг белка мин)) после внесения НАД·Н, A2 – исходная активность, без НАД·Н.

Активность НАД·Н-альдегидредуктазы (КФ.1.1.1.1.) определяли по скорости окисления НАД·Н при восстановлении пропионового альдегида по методу, описанному в работе [16].

Активность НАД-альдегиддегидрогеназы (КФ.1.2.1.3.) определяли по скорости восстановления НАД при окислении пропионового альдегида [17].

Активность альдегидутилизирующих ферментов рассчитывали в мкмоль НАД·Н/(мг белка мин) с учетом $\epsilon = 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли по скорости уменьшения оптической плотности реакционной смеси при длине волны 340 нм в результате окисления НАДФ·Н [18]. Снятие показаний осуществляли каждую минуту в течение 5 минут. Реакционная среда имела следующий состав: 50 мМ Трис-НСl-буфер (рН 7.8), содержащий 0.2 мМ НАДФ·Н, 0.2 мМ GSSG. Активность фермента с учетом $\epsilon = 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ выражали в мкмоль/(мг белка мин).

Образование супероксид-аниона регистрировали в клетках по образованию формазана при восстановлении нитросинего тетразолия по методу, описанному в работе [3]. Обработанные ФГ и контрольные клетки инкубировали в 0.3% нитросинем тетразолии в фосфатном буфере (рН 7.0) в течение 60 минут, при этом восстановление нитросинего тетразолия в контрольных клетках было спонтанным, без использования источника супероксида. После центрифугирования при 10000 g в течение 10 мин клетки дважды экстрагировали 96% этанолом для извлечения формазана. В объединенном экстракте определяли количество формазана при длине волны 510 нм с учетом $\epsilon = 3.0 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражали в мкмоль/(мг белка мин).

Жизнеспособность суспензионной культуры определяли с помощью окрашивания клеток 0.1%-ным раствором феносафранина, как описано в работах [2, 3]. При микроскопировании (световой микроскоп PZO (Poland)) учитывали процент неокрашенных (живых) клеток не менее чем в 200 клеточных агрегатах.

Содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов оценивали по ТБК-тесту [19] с образованием окрашенных комплексов тиобарбитуровой кислоты при высокой температуре в кислой среде. Содержание реагирующих с ТБК продуктов рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции малонового диальдегида, равного 155 мМ⁻¹ см⁻¹ и выражали в мкмоль/мг белка.

Определение осмоустойчивости проводили, воздействуя на клетки через каждые 5 минут раствором маннита с постепенно повышающейся концентрацией (0.3, 0.6, 0.8 и 1.1 М). При концентрации 1.1М клетки выдерживали в течение 1 часа. После ступенчатого деплазмолиза в течение 20 мин была определена их выживаемость.

Определение общего количества белка проводили по методу Lowry с соавт. [20].

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам с использованием программ статистического пакета Excel (MS Office 2007). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости $P \leq 0.05$.

Таблица 1. Активность СОД и образование супероксид-аниона при действии ФГ и ДФИ

Вариант	Активность СОД, усл.ед./мг белка	Количество формазана, мкмоль/мг белка
Контроль	7.3 ± 0.5	422 ± 26.5
ФГ	9.9* ± 0.6	506* ± 27.8
ДФИ	—	252* ± 15.8
ДФИ + ФГ	—	264 ± 18.2

Примечание: * Статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$. Образование супероксид-аниона определяли по образованию формазана при восстановлении нитросинего тетразолия, вступающего в реакцию с супероксид-анионом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность СОД и содержание супероксид-аниона в клетках люцерны при действии ФГ и ингибитора НАДФ·Н-оксидазы

При воздействии ФГ наблюдали превышение контрольного значения как активности СОД, так и образования супероксид-аниона, о котором судили по содержанию формазана, на 25 и 20% соответственно (табл. 1). Действие ДФИ (ингибитора НАДФ·Н-оксидазы) способствовало снижению уровня супероксид-аниона на 40%. При совместном действии ДФИ и ФГ по сравнению с действием одного ДФИ достоверного изменения образования супероксид-аниона не наблюдали.

Активность пероксидазы при действии ФГ

Действие фураностаноловых гликозидов приводило к повышению пероксидазной активности пероксидазы в цикле роста на 2 и 7 сутки на 22% в сравнении с контролем, однако в конце цикла (на 14 сутки) эффект от действия ФГ не наблюдали (рис. 1а). Изменение активности ПО в контрольном варианте в цикле роста носило фазный характер — регистрировали повышение активности на 2 и 14 и снижение на 7 сутки в фазу активного роста. Известно, что НАДФ·Н, один из субстратов ПО, вызывает снижение части пероксидазной активности ПО вследствие переключения ее на оксидазную. Использование в реакционной среде наряду с гваяколом второго субстрата ПО НАДФ·Н показало переключение части пероксидазной активности на оксидазную, что выражалось в снижении пероксидазной активности, субстратом которой являлся гваякол. Действие ФГ (вариант “ФГ + НАДФ·Н”) на 2 и 14 сутки не изменяло оксидазную активность, оставаясь на уровне варианта “НАДФ·Н”. На 7 сутки оксидазная активность ПО уменьшалась, о чем свидетельствует меньшая степень снижения пероксидазной активности по сравнению с вариантом “НАДФ·Н”.

При определении активности ПО в разных фракциях были показаны существенные различия (рис. 1б). Так, наибольшая активность была

обнаружена в свободной (растворимой) фракции фермента, которая в зависимости от фазы цикла роста клеток превышала таковую в ионносвязанной фракции и в среде культивирования в 9–30 и 7–40 раз соответственно. При действии ФГ (рис. 1в) наибольшее повышение активности было свойственно ионносвязанной фракции ПО. В зависимости от фазы цикла роста повышение ее активности по сравнению с контрольным уровнем (без ФГ) составляло от 30 до 80%. При действии ФГ не происходило изменение уровня активности ПО, экскретируемой в среду культивирования. Активность ПО в ковалентносвязанной фракции была очень низкой и не изменялась при действии ФГ, поэтому показателями ее активности можно было пренебречь.

Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при действии ФГ и ДФИ

Проведенные исследования по изучению активности Г-6-ФДГ — ключевого фермента окислительного звена пентозофосфатного пути, показали превышение контрольного уровня активности фермента при действии ФГ во всех фазах цикла роста (рис. 2). В цикле роста регистрировали постепенное повышение активности фермента как в контроле, так и при действии ФГ до конца наблюдения. Применение ДФИ на 2 и 7 сутки приводило к недостоверному снижению активности Г-6-ФДГ в сравнении с контролем.

Активность глутатионредуктазы при действии ФГ

Изучение динамики активности глутатионредуктазы показало фазное изменение активности фермента в цикле роста (рис. 3а), в котором было зарегистрировано снижение активности на 7 сутки. Воздействие ФГ приводило к увеличению активности ГР в течение цикла роста. Превышение контрольного уровня составляло от 24 до 43% в зависимости от фазы роста.

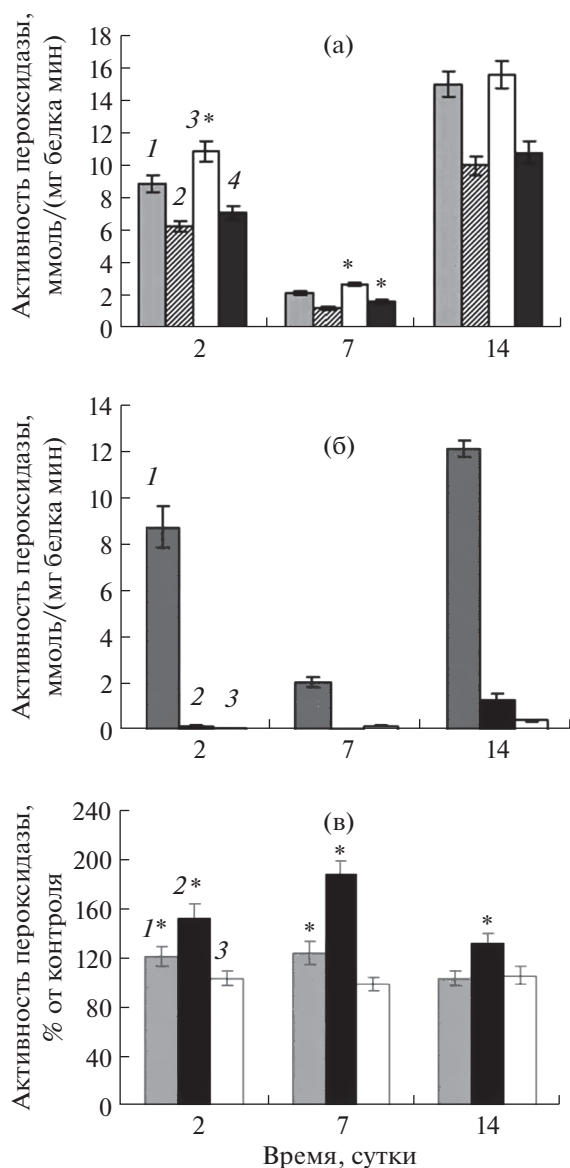


Рис. 1. Активность пероксидазы при действии фураностаноловых гликозидов: (а) – Пероксидазно-оксиданная активность пероксидазы при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ): 1 – контроль; 2 – НАД·Н; 3 – ФГ; 4 – ФГ + НАД·Н. (б) – Исходные значения активности пероксидазы в разных фракциях. (в) – Влияние фураностаноловых гликозидов на активность пероксидазы разных фракций: 1 – растворимая; 2 – ионно-связанная; 3 – в среде. * – Статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

Активность глутатионредуктазы при действии ДФИ и ФГ

В экспериментах по определению активности ГР было показано (рис. 3б) увеличение активности фермента при действии ФГ на 33 и 43% (2 и 7 сутки соответственно). При использовании ингибитора НАДФ·Н-оксидазы ДФИ фиксировали снижение активности ГР по сравнению с дей-

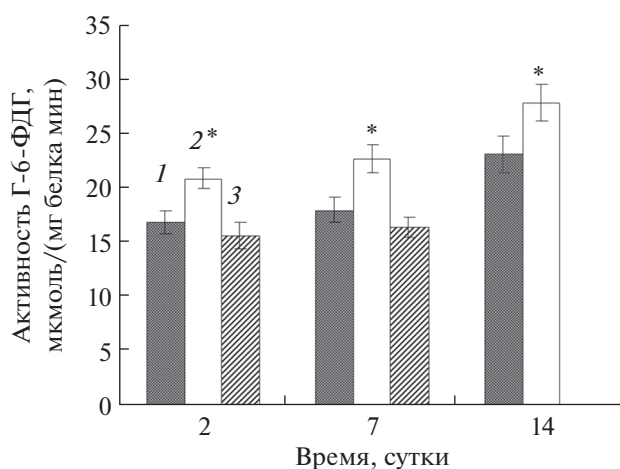


Рис. 2. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) и дифенилиодоний хлорида (ДФИ). 1 – контроль, 2 – ФГ, 3 – ДФИ. * – Статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

ствием ФГ на 15 и 21% (2 и 7 сутки соответственно). При совместном действии ДФИ и ФГ (вариант “ДФИ + ФГ”) активность ГР оставалась на уровне эффекта действия одного ДФИ, при этом превышение контрольного уровня составляло 20%.

Жизнеспособность клеток люцерны при действии ФГ в условиях гиперосмотического стресса

К действию гиперосмотического стресса клетки люцерны проявляли высокую чувствительность, наблюдали снижение уровня жизнеспособности с 90 до 24%. Экспозиция с ФГ способствовала повышению осмоустойчивости, жизнеспособность клеток увеличивалась до 70% (рис. 4).

Активность НАД·Н/НАД-зависимых альдегидутилизирующих ферментов при действии ФГ

Определение активности НАД-альдегиддегидрогеназы (АДГ), конечными продуктами которой являются карбоновые кислоты, показало, что действие ФГ способствовало достоверному повышению ее контрольного уровня на 2 и 7 сутки цикла роста (рис. 5). В эти же фазы роста активность альдегидредуктазного (АР) пути, в которых альдегиды подвергаются восстановительным превращениям с образованием спиртов, наоборот, существенно снижалась по сравнению с контрольным уровнем. На 14 сутки в фазу замедления роста активности обоих альдегидутилизирующих путей оставались без изменений, на уровне контрольного варианта. В контроле активность АДГ на 2, 7 и 14 сутки цикла роста составляла – 76 ± 5 , 152 ± 10.2 и 37 ± 2.7 мкмоль/(мг белка мин), ак-

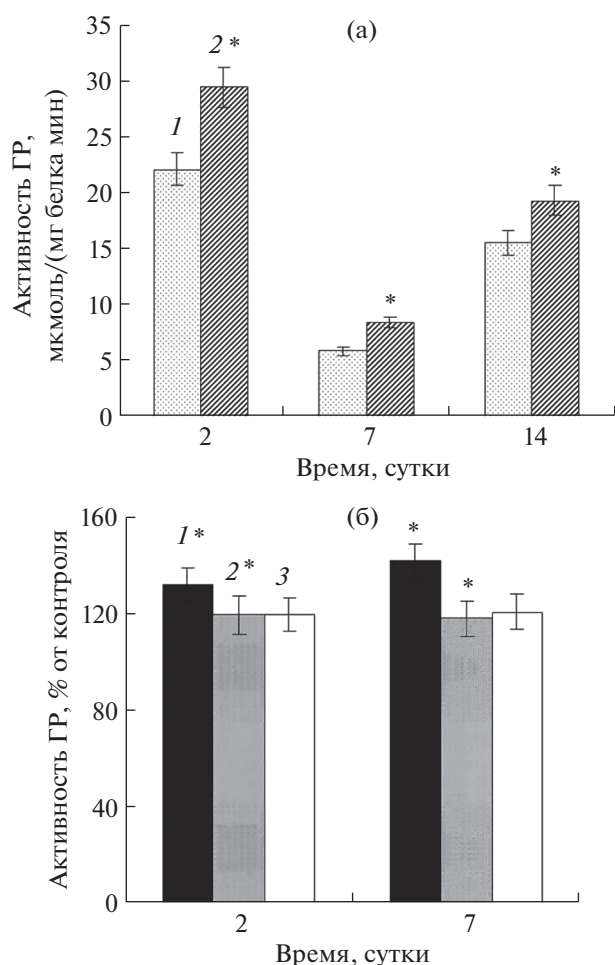


Рис. 3. Активность глутатионредуктазы при действии фураностаноловых гликозидов. (а) – Активность глутатионредуктазы в цикле роста при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ): 1 – контроль, 2 – ФГ. (б) – Активность глутатионредуктазы при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) и дифенилиодионий хлорида (ДФИ): 1 – ФГ; 2 – ДФИ; 3 – ДФИ + ФГ. * – Статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

тивность АР – 54 ± 3.6 , 147 ± 11.3 и 55 ± 3.9 $\mu\text{mol}/(\text{mg protein} \cdot \text{min})$ соответственно.

Определение содержания реагирующих с ТБК продуктов в фазу активного роста (7 сутки) показало, что ФГ способствовали снижению их уровня на 24%. Содержание реагирующих с ТБК продуктов в контроле составляло 138 ± 8.4 , а при действии ФГ – 105 ± 6.9 нмоль/мг белка.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований на клетках люцерны было показано, что при действии низких концентраций фураностаноловых гликозидов (ФГ) происходит образование первичных АФК, имеющих важное значение в процессе адаптации.

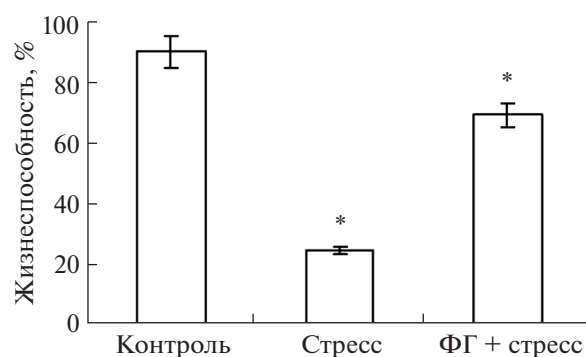


Рис. 4. Жизнеспособность клеток люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) в условиях гиперосмотического стресса. * – Статистически достоверные различия между вариантами “контроль” и “стресс” и между вариантами “стресс” и “ФГ + стресс” при $P \leq 0.05$.

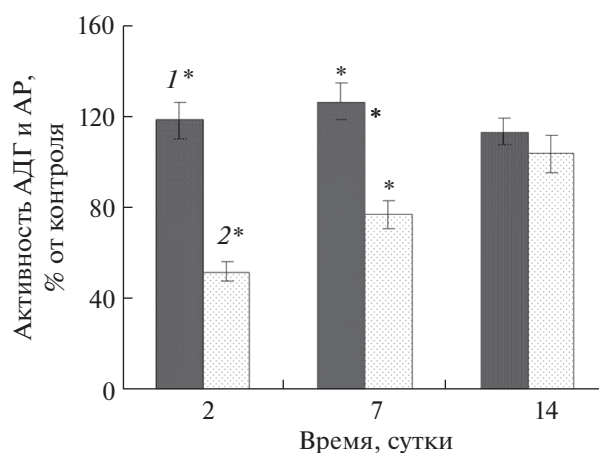


Рис. 5. Активность НАД \cdot Н/НАД альдегидутилизирующих ферментов при действии фураностаноловых гликозидов: 1 – альдегиддегидрогеназа (АДГ); 2 – альдегидредуктаза (АР). * – Статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

Известно, что первичные АФК, к которым относятся супероксид-анион и H_2O_2 , образуемые в ферментативных реакциях, выполняют, прежде всего, регуляторные функции и участвуют в процессах внутриклеточной и внеклеточной сигнализации [8].

Экспозиция ФГ с клетками люцерны способствовала как увеличению активности СОД, так и образованию супероксид-аниона, определенного по НСТ-тесту. Применение ингибитора НАДФ \cdot Н-оксидазы дифенилиодионий хлорида (ДФИ), который снижал уровень супероксид-аниона на 40%, позволило предположить участие НАДФ \cdot Н-оксидазы в усилении генерации супероксид-аниона при действии ФГ (табл. 1). НАДФ \cdot Н-оксидаза считается продуцентом АФК в растительных

клетках, основной пул которой локализован в плазмалемме [21]. На фоне ДФИ действие ФГ нивелировалось, что может указывать на взаимосвязь между экзогенным действием ФГ и активностью НАДФ·Н-оксидазы.

Увеличению уровня супероксид-аниона, являющегося исходным материалом для образования пероксида водорода наряду с НАДФ·Н-оксидазой, может способствовать и пероксидаза, проявляющая оксидазную активность, используя в качестве акцептора электронов молекулярный кислород [22]. В наших экспериментах измерение активности ПО в окислительном цикле (с использованием НАД·Н в качестве субстрата) при действии ФГ показало, что оксидазная активность или не изменялась, или была ниже контрольного уровня (рис. 1а). При этом превышение пероксидазной активности фермента составило более 20%. В конце наблюдения на 14 сутки в фазу замедления роста активность фермента была максимальной, в эту фазу эффект ФГ не наблюдали. Следует отметить довольно высокий (миллимолярный) уровень конститутивной пероксидазной активности ПО. Для генерации АФК пероксидазой в окислительном цикле необходимо присутствие сильного восстановителя. Ранее в работе на клетках диоскореи при использовании ингибиторов ПО, СОД и НАДФ·Н-оксидазы было показано, что действие ФГ приводит к увеличению образования O_2^- , генератором которого является именно НАДФ·Н-оксидаза, а не пероксидаза [3]. В данной работе на клетках люцерны уменьшение оксидазной и повышение пероксидазной активности ПО, а также снижение активности НАДФ·Н-оксидазы при действии ДФИ подтверждает участие НАДФ·Н-оксидазы, а не ПО в генерации O_2^- . Как показано в работе Волковой с соавт. [2] ФГ обладают слабыми восстановительными свойствами и не могут усиливать оксидазную активность ПО, следовательно, преимущественным источником супероксид-аниона при действии ФГ в клетках люцерны могла быть НАДФ·Н-оксидаза, а не ПО.

Следует обратить внимание на фазное изменение активности ПО в цикле роста. Повышенный уровень активности на 2 сутки по сравнению с 7, вероятно, связан со сменой условий выращивания клеток люцерны пересадкой их на свежую питательную среду. Последующее снижение активности на 7 сутки в фазу активного роста может быть связано с тем, что апопластная H_2O_2 , потребляемая в пероксидазных реакциях, в основном способствует разрыхлению и растяжению клеточных стенок [23]. При замедлении роста (14 сутки) происходит постепенное торможение растяжения, которое сопровождается значительным увеличением ПО активности. Апопластный пероксид в этот период потребляется в реакциях, приводящих к ригидификации клеточных стенок. В лите-

ратуре имеются сведения о частом обнаружении обратных корреляций между скоростью роста и активностью ПО клеточных стенок [24].

ПО принадлежит к числу ферментов, активно реагирующих на воздействие разных индукторов, принимая участие во многих процессах жизнедеятельности растений. Известно, что изоферменты ПО локализуются в разных компартментах растительной клетки. В зависимости от места локализации и уровня связи с другими компонентами клетки различают несколько фракций фермента – свободную (растворимую), ионносвязанную и ковалентносвязанную [25]. Согласно данным литературы, свободная фракция пероксидазы в основном локализована в межклеточном пространстве, цитоплазме, вакуолях и, частично, на клеточной стенке, связанные формы – на клеточной стенке и в мембранах. Часть слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в суспензионных культурах клеток может переходить в среду, образуя фракцию экскретируемых внеклеточных пероксидаз [25]. В клетках люцерны в разных фракциях фермента была обнаружена неодинаковая активность. Так активность ПО растворимой фракции значительно превосходила ионносвязанную и экскретируемую в среду культивирования во все фазы цикла роста (рис. 1б). Действие ФГ (рис. 1в) наибольший эффект оказывало на повышение активности ПО в ионносвязанной фракции фермента относительно контрольного уровня активности. По всей видимости, мембранные изменения являются наиболее ранней реакцией на действие ФГ.

Для образования АФК НАДФ·Н-оксидазой необходимо поступление в апопласт ее субстрата – НАДФ·Н, который образуется в цитозоле в окислительной ветви пентозофосфатного пути. Существенная роль в поддержании определенного уровня НАДФ·Н в клетке принадлежит активности главных регуляторных ферментов пентозофосфатного пути – Г-6-ФДГ и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, активаторами которых является НАДФ⁺, а ингибитором НАДФ·Н. Экспозиция с ФГ приводила к повышению активности НАДФ·Н-оксидазы. Известно, что вследствие этого происходит увеличение содержания окисленной формы НАДФ·Н, которая, являясь кофактором Г-6-ФДГ, могла способствовать повышению активности последней во всех фазах цикла роста (рис. 2). Ингибирование НАДФ·Н-оксидазы с помощью ДФИ не приводило к достоверному снижению активности Г-6-ФДГ в сравнении с контролем, поскольку этот фермент мог получать окисленный НАДФ·Н благодаря притоку из других метаболических источников. В предыдущих исследованиях, проведенных на клетках диоскореи, мы также регистрировали эффекты ФГ, которые были сопряжены с изменением активности Г-6-ФДГ и НАДФ·Н-оксидазы [4]. Следовательно, наблюдаемая связь между функ-

ционированием Г-6-ФДГ и НАДФ·Н-оксидазой, вероятно, осуществляется соотношением редокс-пары НАДФ⁺/НАДФ·Н, функция которой заключается в переносе восстановительных эквивалентов в цепи последовательных биохимических реакций [26].

Нормальная жизнедеятельность клеток зависит от определенного уровня восстановленности среды, обеспечивающей электрохимический перенос электрона. Пара НАДФ⁺/НАДФ·Н участвует в регуляции многих окислительно-восстановительных реакций, в том числе реакций глутатионзависимой системы, которая использует в качестве восстановительных эквивалентов молекулы НАДФ·Н для восстановления глутатиона. Одним из основных участников внутриклеточных редокс-процессов является восстановленный глутатион (γ -глутаминил-цистеинил-глицин). Окисленный глутатион, как известно, для клетки является токсичным, высокорекреационным соединением; он активно восстанавливается ГР, катализирующей обратимое НАДФ·Н-зависимое восстановление GSSG. Поскольку глутатион почти все свои функции реализует в восстановленной форме, главная биологическая роль ГР заключается в том, чтобы поддерживать высокий уровень GSH и низкий GSSG. Проведенное нами исследование активности ГР в цикле роста показало увеличение активности фермента при действии ФГ на 24–43% в зависимости от фазы роста (рис. 3а). Поскольку ГР – фермент, зависимый от НАДФ·Н, то увеличение активности этого фермента может быть связано с активацией Г-6-ФДГ, являющейся поставщиком НАДФ·Н как для НАДФ·Н-оксидазы, так и для ГР. Обращает на себя внимание фазное изменение активности ГР в цикле роста. Высокая активность фермента, вероятно, связана с митотической активностью клеток люцерны, пики которой на 3 и 14 сутки цикла роста были показаны нами ранее [11]. В литературе имеются сведения, что на протяжении всего процесса деления клетки в непосредственной близости от хроматина сохраняется высокий пул GSH. Снижение его уровня приводило к замедлению G1–S перехода и остановке клеток в фазе G2 [27].

Применение ДФИ способствовало повышению активности ГР (рис. 3б). Несмотря на то, что ГР является флавопротеиновой оксидоредуктазой, а ДФИ – ингибитором флавиновых ферментов, тем не менее, активность ее (в сравнении с контролем) не уменьшилась, а напротив, увеличилась, хотя и была ниже, чем при действии ФГ. Степень ингибирования ГР ДФИ в сравнении с действием ФГ составляла 15 и 21% на 2 и 7 сутки соответственно (рис. 3б), а НАДФ·Н-оксидазы – 48% на 7 сутки (табл. 1), что свидетельствует о большем ингибировании НАДФ·Н-оксидазы по сравнению с ГР. Это подтверждается имеющимися

в литературе сведениями о значительно большей чувствительности к этому ингибитору НАДФ·Н-оксидаз, чем некоторых ФАД-зависимых ферментов [28]. При действии ДФИ увеличение активности ГР произошло, вероятно, вследствие ингибирования одного из основных потребителей НАДФ·Н – НАДФ·Н-оксидазы. В результате повышение количества НАДФ·Н привело к возрастанию активности ГР, которая регулируется этим восстановленным пиридиннуклеотидом. Поскольку Г-6-ФДГ реакция чувствительна к концентрации НАДФ·Н, то, когда отношение НАДФ·Н/НАДФ⁺ увеличивается, активность Г-6-ФДГ может снижаться. Активация ГР способна предупредить ингибирование Г-6-ФДГ благодаря снижению уровня НАДФ·Н, а также поставке НАДФ⁺ в окислительную ветвь пентозофосфатного цикла для нормального функционирования Г-6-ФДГ.

Действие ДФИ связано с тем, что ингибитор забирает электрон из цепи переноса электронов, взаимодействуя с ФАД или группой гемов, и превращается в радикал, который ковалентно связывается с каталитической субъединицей на поверхности плазмалеммы, блокируя ее [28]. Более высокая чувствительность НАДФ·Н-оксидазы к ДФИ по сравнению с ГР, возможно, связана с пространственной разобщенностью трансмембранного переноса электронов от НАДФ·Н, окисляемого на цитоплазматической поверхности мембраны, на молекулярный кислород, который восстанавливается до супероксид-аниона на поверхности, обращенной к клеточной стенке [7]. ДФИ, вероятно, обладает большей возможностью перехвата электрона у НАДФ·Н-оксидазы. Действуя в микромолярных концентрациях, ФГ способствуют изменению в соотношении редокс-пары НАДФ⁺/НАДФ·Н, тем самым активизируя редокс-систему глутатиона для настройки сигнальных путей в клетке.

Минимальная цепь событий, индуцированная ФГ, включает запуск образования АФК, генератором которых является НАДФ·Н-оксидаза плазмалеммы, и индукцию ферментов антиоксидантной защиты. При этом активация НАДФ·Н-оксидазы играет роль редокс-сигнала, вызывая изменение в соотношении редокс-пары НАДФ⁺/НАДФ·Н, под контролем которой находится активность ключевых ферментов ПФП и ферментов метаболизма глутатиона.

В условиях гиперосмотического стресса критерием жизнеспособности клеток было определение сохранности избирательной проницаемости мембран с помощью не проникающего внутрь живых клеток красителя. Предобработка клеток ФГ способствовала улучшению барьерной функции мембран, что отразилось на повышении числа выживших клеток с 24 до 70% (рис. 4). Универ-

сальным механизмом нарушения барьерной функции является электрический пробой мембран. Согласно литературным данным, существует четыре основных процесса, которые непосредственно обуславливают нарушение целостности липидного бислоя, это перекисное окисление липидов, действие мембранных фосфолипаз, механическое (осмотическое) растяжение и сжатие мембраны, адсорбция на бислое полиэлектролитов. Повреждающее действие перечисленных факторов заключается в снижении потенциала пробоя, приводящего к уменьшению электрической прочности мембран [29]. Считается, что наиболее важным фактором является уровень липопероксидации, приводящий к уменьшению электрической стабильности липидного слоя [29]. Инкубация клеток люцерны с ФГ приводила к снижению уровня ПОЛ на 24% по сравнению с контрольным уровнем. Снижению уровня малонового диальдегида — продукта перекисного окисления липидов мембран, способствовало увеличение активности АДГ, утилизирующей продукты липопероксидации (рис. 5). Окислительный путь, который катализируется АДГ, играет важную роль в утилизации альдегидов. Конечными продуктами альдегидов в этом пути являются карбоновые кислоты. Они не обладают высокой реакционной способностью, свойственной альдегидам, и далее могут утилизироваться в процессе бета-окисления. Таким образом, снижение уровня ПОЛ может приводить к повышению барьерных свойств мембран, способствующих вододерживающей способности клеток, тем самым предотвращая превышение порогового уровня обезвоживания их при осмотическом стрессе.

Наблюдаемое повышение активности ГР также может способствовать выживаемости клеток люцерны в условиях гиперосмотического стресса. Наиболее чувствительны к перекисному окислению SH-группы мембранных белков. Окисление тиоловых групп приводит к появлению дефектов в мембранах [30]. Повышение активности ГР увеличивает количество GSH, что способствует смещению редокс-статуса в сторону восстановления. В результате может повышаться концентрация SH-групп посредством глутатионилирования, предотвращая необратимую структурную модификацию белков с потерей их функций [30].

Многие из наблюдаемых нами изменений редокс-ферментов являются относительно небольшими, но статистически значимыми, что указывает на важность физиологических исследований влияния низких концентраций ФГ на различные физиологические процессы в растительной клетке и возможный сигнальный механизм их действия.

Работы проводили с использованием оборудования “Научно-производственного комплекса на основе разработки природосберегающей Hi-Tech биотехнологии получения высококачественного

сырья фармацевтического и пищевого назначения с использованием культивируемых клеток и органов высших растений или микроводорослей” при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколов Ю.А. Элиситоры и их применение в растениеводстве // Минск: Бел. Наука, 2016. 201 с.
2. Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Носов А.М. Чувствительность антиоксидантного статуса растительных клеток к действию фураностаноловых гликозидов // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 804.
3. Волкова Л.А., Урманцева В.В., Бургутин А.Б., Носов А.М. Особенности элиситорного действия фураностаноловых гликозидов на культивируемые летки диоскореи // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 215.
4. Волкова Л.А., Урманцева В.В., Ключин А.Г., Бургутин А.Б., Носов А.М. Активность дыхательных путей в культуре клеток диоскореи при действии фураностаноловых гликозидов // Физиология растений. 2020. Т. 67. С. 188.
5. Jaspers P., Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // *Physiol. Plant.* 2010. V. 138. P. 405.
6. Pugin A., Frachisse J.M., Tavernier E., Bligny R., Gout E., Douce R., Guern J. Early events induced by the elicitor cryptogin in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 2077.
7. Kaur G., Sharma A., Guruprasad K., Pati P.K. Versatile roles of plant NADPH oxidases and emerging concepts // *Biotec. Adv.* 2014. V. 32. P. 551.
8. Waszczak C., Carmody M. and Kangasja J. Reactive oxygen species in plant signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018. V. 69. P. 209.
9. Morgan B., Ezeri a D., Amoako T.N., Riemer J., Seedorf M., Dick T.P. Multiple Glutathione Disulfide Removal Pathways Mediate Cytosolic Redox Homeostasis // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. P. 119.
10. Jones D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance // *Methods Enzymol.* 2002. V. 348. P. 93.
11. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Popova E.A., Nosov A.M. Physiological, Cytological and biochemical stability of *Medicago sativa* L. cell culture after 27 years of cryogenic storage // *Cryo Letters.* 2015. V. 36 (4). P. 252.
12. Su P.-H., Lin C.-H. Metabolic responses of *Luffa* roots to long-term flooding // *J. Plant Physiol.* 1996. V. 148. P. 735.
13. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276.

14. *Lin C.C. and Kao C.H.* NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings // *Plant Soil*. 1999. V. 216. P. 147.
15. Юсупова З.Р., Аруллин Р.М., Максимов И.В. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk // *Физиология растений*. 2006. Т. 53. С. 910.
16. Фомина Е.В., Давидов В.В. Альдегидредуктазная активность печени крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе // *Проблемы старения и долголетия*. 2004. Т. 13. С. 510.
17. Ли Н.Г., Осаковский В.Л. Альдегиддегидрогеназа хлоропластов листьев высших растений // *Сибирский биологический журнал*. 1991. Вып. 2. С. 20.
18. Радюк М.С., Доманская И.Н., Щербаков Р.А., Шалыго Н.В. Влияние низкой положительной температуры на содержание низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов в зеленых листьях ячменя // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. С. 193.
19. *Heath R.L., Packer L.* Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. V. 125. P. 189.
20. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265.
21. *Sagi M., Fluhr R.* Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 336.
22. *O'Brien J.A., Daudi A., Butt V.S., Bolwell G.P.* Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism // *Planta*. 2012. V. 236. P. 765.
23. *Francoz E., Ranocha, P., Nguyen-Kim H., Jamet E., Burlat V., and Dunand C.* Roles of cell wall peroxidases in plant development // *Phytochemistry*. 2015. V. 112. P. 15.
24. *Fry S.C.* Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking // *Phytochemistry Reviews*. 2004. V. 3. P. 97.
25. *Cosio C., Dunand C.* Specific function of individual class III peroxidase genes // *J. Exp. Botany*. 2009. V. 60. P. 391.
26. *Elmayan T., Simon-Plas F.* Regulation of plant NADPH oxidase // *Plant Signal Behavior*. 2007. V.2. № 6. P. 505.
27. *Vivancos P.D., Woleff T., Markovic J., Pallardo F.V., Foyer C.H.* A nuclear glutathione cycle within the cell cycle // *Biochem. J.* 2010. V. 431. P. 169.
28. *Bedard K., Krause K.H.* The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 245.
29. Евстигнеев М.П., Завьялова О.С., Савченко Е.В. Биофизика мембран: учеб. пособие // Севастополь: СевГУ. 2019. 59 с.
30. Степовая Е.А., Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Якушина В.Д., Носова А.И., Гулая В.С., Степанова Е.А., Чильчигашев Р.И., Новицкий В.В. Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы // *Биомедицинская химия*. 2016. Т.62. вып. 1. С. 64.

УДК 581.1

ВОЗМОЖНАЯ АКТИВАЦИЯ C₃-ПУТИ ФОТОСИНТЕЗА У C₄-ГАЛОФИТА *Kochia prostrata* ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ CO₂

© 2021 г. З. Ф. Рахманкулова^а, *, Е. В. Шуйская^а, **, М. Ю. Прокофьева^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: zulfirar@mail.ru

**e-mail: evshuya@gmail.com

Поступила в редакцию 05.02.2021 г.

После доработки 05.03.2021 г.

Принята к публикации 06.03.2021 г.

Исследовали влияние повышенной концентрации CO₂ (800 ppm) на интенсивность роста, эффективность фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II), содержание рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) и фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк), пролина, ионов натрия и калия в побегах C₄-галофита *Kochia prostrata* (L.) Schrad. В условиях повышенной концентрации CO₂ наблюдалось снижение накопления сухой биомассы (в 1.2 раза), увеличение содержания пролина (в 1.2 раза) и ионов калия (в 1.3 раза), а также уменьшение времени выхода на плато кинетической кривой P700 (ФС I) (в 1.7 раза). Содержание ионов натрия и воды в побегах, а также эффективность ФС II (F_v/F_m) не изменялись. С помощью иммуноблоттинга показано, что в условиях повышенной концентрации CO₂ соотношение содержания белков Рубиско/ФЕПк возрастало с 1.3 до 3.4. Уменьшение времени выхода на плато кинетической кривой ФС I косвенно свидетельствует о снижении активности циклического транспорта электронов, необходимого для эффективного функционирования C₄-углерод-концентрирующего механизма. Высказывается предположение, что высокая концентрация CO₂ активирует у C₄-галофита *K. prostrata* C₃-путь фотосинтеза.

Ключевые слова: *Kochia prostrata*, высокая концентрация CO₂, Рубиско, фосфоенолпируваткарбоксилаза, C₃-фотосинтез, C₄-фотосинтез, фотосистема I, фотосистема II

DOI: 10.31857/S0015330321060166

ВВЕДЕНИЕ

Цикл Кальвина-Бенсона, наиболее распространенный биохимический путь на Земле, является основой углеродной фиксации у подавляющего большинства фотосинтезирующих организмов. Он эволюционировал при очень высоких концентрациях CO₂ и очень низких концентрациях O₂. За последние 30 миллионов лет во время олигоцена произошел резкий рост атмосферной концентрации O₂ и снижение CO₂ (с ~1000 до < 300 ppm) [1–3]. Низкий уровень атмосферного CO₂ привел к развитию углерод-концентрирующих механизмов (УКМ), примером которых в наземных растениях является C₄-путь фотосинтеза, возникший независимо более чем в 65 линиях покрытосеменных растений [1, 3]. Большинство C₄-растений произрастают в аридной зоне, где они проявляют более высокие фотосинтетические и ростовые показатели, благодаря высоким значениям эффективности ис-

пользования воды, углерода и азота [4]. Можно сказать, что C₄-путь фотосинтеза является адаптацией C₃-пути к низкой концентрации CO₂, который за счет снижения оксигеназной функции рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско) ограничивает фотодыхание, способствуя повышению эффективности процесса фотосинтеза, и минимизирует потери воды в жаркой и сухой среде [5]. C₄-УКМ, по сути, является биохимическим CO₂ насосом, в котором диоксид углерода фиксируется при участии фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПк) в клетках мезофилла (КМ) в C₄-кислотах, которые диффундируют в клетки обкладки (КО) проводящего пучка, где содержатся Рубиско и другие компоненты цикла Кальвина-Бенсона. В КО C₄-кислоты декарбоксилируются, генерируя высокую внутриклеточную концентрацию CO₂ [1, 3].

В C₄-растениях функционально активны как C₃-, так и C₄-пути фотосинтеза. Это приводит к повышению энергетической стоимости ассимиляции CO₂, по сравнению с C₃-растениями. Как

Сокращения: УКМ — углерод-концентрирующий механизм; ФЕПк — фосфоенолпируваткарбоксилаза.

следствие, две дополнительные молекулы АТФ требуются для каждой молекулы CO₂, фиксированной в результате функционирования C₄-пути фотосинтеза. Предполагается, что дополнительные молекулы АТФ синтезируются с помощью циклического транспорта электронов фотосистемы I (ФС I), что способствует генерации градиента рН на тилакоидной мембране без образования НАДФ·Н [6]. Сравнительный анализ в пределах рода *Flaveria*, который включает как C₃-, так и промежуточные C₃-C₄ и C₄-виды, показал, что C₄-растения демонстрируют более высокую экспрессию генов белков, участвующих в циклическом транспорте электронов ФС I, а также изменения в тилакоидной структуре, способствующие высокой активности циклического потока электронов [6].

С помощью методов профилирования метаболитов и многофакторного анализа главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) было показано, что у C₄-видов, по сравнению с C₃-видами, более низкий уровень рибулозо-1,5-бисфосфата, а Рубиско характеризуется более низким сродством к CO₂ и более быстрым каталитическим оборотом, позволяющим данному ферменту эффективно функционировать при его более низких концентрациях [3].

Исследование регуляции экспрессии генов Рубиско (*rbcL* и *RbcS*) и ФЕПк (*ppcA*) показало, что для C₄-видов с Кранц-анатомией характерна экспрессия генов *rbcL* и *RbcS* только в КО [7], тогда как гены класса *ppcA* интенсивно экспрессируются только в КМ [8]. Однако на начальных этапах развития листьев у C₄-видов обычно экспрессируются гены Рубиско как в КО, так и в КМ (или в их предшественниках). В клетках зрелых C₄-растений гены Рубиско модифицируются и проявляют КО-специфичность и высокую чувствительность к экзогенным и эндогенным сигналам, в том числе к изменению климата [7].

Вопрос о влиянии высокой концентрации CO₂ на C₄-растения до сих пор открыт. С одной стороны, считается, что повышение парциального давления CO₂ в атмосфере может увеличить интенсивность фотосинтеза и прирост биомассы как у C₃-, так и у C₄-видов, причем у C₄-видов в меньшей степени. Так, удвоение текущей атмосферной концентрации CO₂ стимулировало рост C₃-растений на 40–45%, а у C₄-растений только на 10–20% [9]. Это может быть связано с тем, что у C₄-видов фотосинтетическая ассимиляция углерода насыщена или почти насыщена CO₂, благодаря наличию УКМ, а также с тем, что ФЕПк использует HCO₃⁻, а не CO₂ в качестве субстрата, и поэтому фермент не чувствителен к изменениям соотношения CO₂/O₂. Все это делает C₄-растения мало-

чувствительными к повышенному содержанию CO₂ [4]. С другой стороны, показано, что C₄-растения отрицательно реагируют на высокий уровень CO₂ [10]. На C₄-растениях (сорго) установлено, что выращивание их в условиях повышенной концентрации CO₂ (700 ppm) приводит к снижению эффективности карбоксилирования, скорости насыщения фотосинтеза, уменьшению содержания ФЕПк в листьях (на 49%, в пересчете на площадь), а также к 2-кратному уменьшению толщины клеточных стенок, при этом содержание Рубиско оставалось без изменений [11]. Противоречивая информация о реакции C₄-растений на повышенный уровень CO₂ свидетельствует о недостаточной изученности данного вопроса и может быть связана с различиями в экспериментальных технологиях, видом и возрастом растений, используемых в экспериментах [12].

Повышение атмосферной концентрации CO₂ сопровождается увеличением температуры, засухой, засолением и другими факторами. Галофиты – виды растений, которые обладают адаптационными механизмами, позволяющими им успешно произрастать в подобных неблагоприятных условиях. Эти качества делают их перспективными для активного использования в качестве кормовых и технических культур в условиях изменяющегося климата. Поэтому исследование влияния высокой концентрации CO₂ на фотосинтетический метаболизм C₄-галофитов представляет большой научный и практический интерес. Целью данной работы явилось сравнительное изучение влияния естественной (400 ppm) и повышенной (800 ppm) концентраций CO₂ на интенсивность роста, реакции световой фазы фотосинтеза, содержание ключевых фотосинтетических ферментов, пролина, ионов натрия и калия в побегах C₄-галофита *Kochia prostrata*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия выращивания.

Для проведения лабораторных экспериментов семена кохии распростертой (*Kochia prostrata* (L.) Schrad., сем. Chenopodiaceae) проращивали в дистиллированной воде. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на перлит, пропитанный 50% питательным раствором Хогланда. Растения выращивали в двух отдельных камерах с разным уровнем концентрации CO₂ (атмосферной (400 ppm) и повышенной (800 ppm)) под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/(м² с), 16-часовом фотопериоде и температуре 25°C. У 45-дневных растений измеряли длину побега, сырую и сухую биомассу, содержание воды, пролина, ионов натрия и калия, фотосинтетических ферментов Рубиско и ФЕПк, эффективность фотосистем I и II.

Определение содержания воды, пролина и ионов натрия и калия. Для определения сухой биомассы растительные пробы высушивали двое суток при 80°C. Содержание воды (W) рассчитывали по формуле и выражали в г H₂O/г сухой массы:

$$W = (FW - DW)/DW, \quad (1)$$

где FW – сырая биомасса, DW – сухая биомасса.

Содержания ионов Na⁺ и K⁺ в фотосинтезирующих органах определяли в водной вытяжке пробы (100 мг) на атомно-абсорбционном спектрометре Hitachi 207 (“Hitachi”, Япония).

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива по методу Bates [13], результаты рассчитывали на 1 г сухой массы.

Определение содержания белков Рубиско (РБФК/О) и ФЕПк с помощью вестерн-блот анализа. Тотальный белок экстрагировали из 0.5 г надземной части растения, которую измельчали в жидком азоте и 2 мл экстракционного буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 8), 10 мМ MgCl₂, 0.3 мМ ЭДТА, 40 мг поливинилпирролидона и 5 мМ дитиотреитола. Гомогенат центрифугировали при 10000 об./мин в течение 20 мин при 4°C, используя центрифугу марки K-24 (“Janetzki”, Германия). Содержание белка определяли с помощью бицинхониновой кислоты, используя набор реактивов Pierce BCA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific”, США). Калибровочную кривую строили на основе известных концентраций бычьего сывороточного альбумина, входящего в данный набор.

Анализ содержания белков Рубиско и ФЕПк, проводили с помощью иммуноферментного анализа по стандартной методике [14] с использованием коммерческих поликлональных антител против белков большой субъединицы (L) РБФК/О и ФЕПк (“Agrisera”, Швеция). Разделение суммарных белков (15 мкг тотального белка в слоте) проводили с помощью 10% денатурирующего гель-электрофореза (SDS-PAGE) по методу Laemmli [15] с использованием маркеров стандартной молекулярной массы (“BioRad”, США). После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм (“Amersham, GE Healthcare”, Великобритания), используя прибор для мокрого блоттинга (“BioRad”, США), согласно стандартному протоколу. Белки Рубиско и ФЕПк визуализировали при помощи кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с флуоресцентными красителями люминолом и кумариновой кислотой (“Sigma”, США) и пленки Retina XBE (Германия). Интенсивность полос в вестерн-блоттинге оценивали с помощью программы ImageJ 1.37v (США) и выражали относительно среднего уровня ($n = 3$) для растений, вы-

ращенных при 400 ppm CO₂, которое было взято за 100%. Анализ проводили не менее 3 раз.

Фотосистема I. Изменение окислительно-восстановительного потенциала P700 измеряли путем мониторинга оптической плотности листьев при 820 нм с использованием dual-wavelength системы импульсной модуляции ED-P700DW (“Heinz-Walz, Effeltrich”, Германия) в сочетании с РАМ-101 (“Heinz-Walz”, Германия). Кинетика окисления P700 измерялась при освещении дальним красным светом (720 нм, 17.2 Вт/м²). Максимальное окисление P700 определяли с использованием ксеноновой газоразрядной лампы (50 мс, 1500 Вт/м²; “Heinz-Walz”, Германия) в присутствии дальнего красного света.

Фотосистема II. Определение квантового выхода флуоресценции фотосистемы II (ФС II) адаптированного к темноте (20 мин) фрагмента листа осуществляли с помощью РАМ флуориметра (РАМ-101, “Heinz-Walz”, Германия). Измеряли темновой максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II (F_v/F_m). Измерение проводили с досветкой образца слабым модулированным потоком красного света, которое осуществлялось АЦПУ (PDA-100, “Walz”, Германия), преобразующим первичный сигнал от РАМ-101 на компьютер со специализированным программным интерфейсом. Расчет показателей проводили на основании текущего значения минимальной (F_0) и максимальной (F_m) флуоресценции адаптированного к темноте листа по формуле:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m. \quad (2)$$

Статистический анализ. Во всех экспериментах было не менее трех биологических повторностей. Для корреляционного и факторного (ANOVA) анализа использовали программу SigmaPlot 12.0. На графиках приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Различия считались достоверными при $P < 0.05$ (тест Тьюки). Для многофакторного анализа методом главных компонент (РСА) было использовано программное обеспечение R (версия 3.6.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У растений *Kochia prostrata*, выращенных при высокой концентрации CO₂ (800 ppm), по сравнению с растениями, находившимися при естественной концентрации CO₂ (400 ppm), наблюдалось небольшое снижение сухой биомассы (в 1.2 раза) (рис. 1а). При этом содержание воды в надземной части растений не изменялось (рис. 1б).

Исследование эффективности функционирования фотосистем у растений *K. prostrata* в условиях высокой концентрации CO₂ показало, что максимальный квантовый выход ФС II (F_v/F_m) не

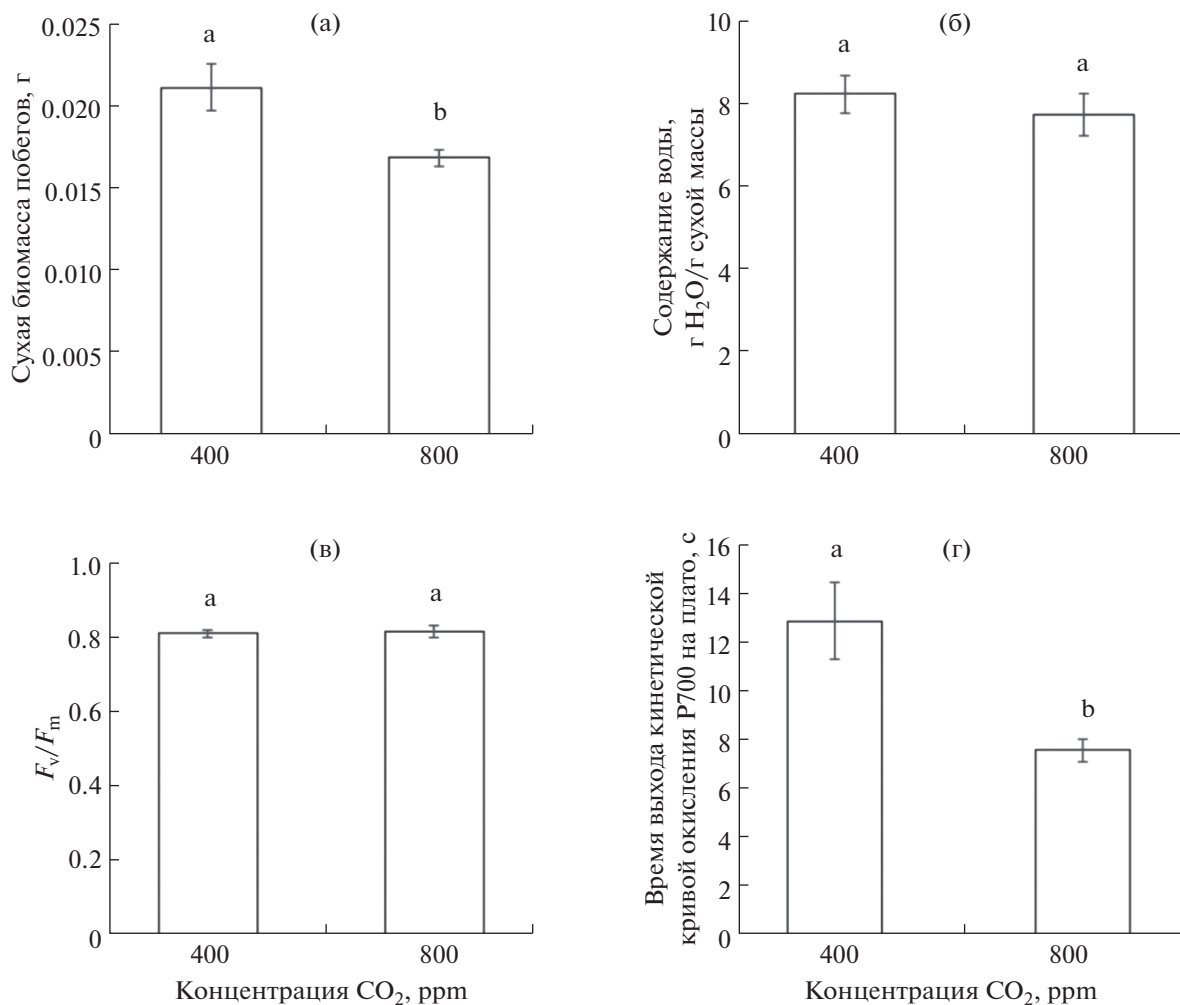


Рис. 1. Сухая биомасса (а), содержание воды (б), максимальный квантовый выход ФС II (в) и время выхода на плато кинетической кривой окисления P700 (ФС I) при освещении дальним красным светом (г) растений C₄-галофита (*Kochia prostrata*), выращенных при разных концентрациях CO₂ (400 и 800 ppm). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне $P < 0.05$ (тест Тьюки).

изменялся (рис. 1в). При этом наблюдалось снижение времени выхода на плато кинетической кривой ФС I (в 1.7 раза) (рис. 1г), т.е. уменьшалась интенсивность циклического транспорта электронов, характерная для C₄-видов.

С помощью вестерн-блоттинга и специфических антител к ключевым ферментам C₃- и C₄-пути фотосинтеза, а именно к большой субъединице Рубиско и ФЕПк, было показано, что в условиях высокой концентрации CO₂ у растений *K. prostrata* содержание обоих ферментов возрастало (рис. 2). Было установлено, что содержание Рубиско у растений, выращенных при 800 ppm CO₂, увеличивалось на 312% (в 3 раза), относительно его содержания при 400 ppm CO₂. Содержание ФЕПк возрастало в меньшей степени и при 800 ppm CO₂ составило 116%, относительно растений, выращенных при 400 ppm CO₂ (рис. 2).

При этом отношение Рубиско/ФЕПк при 400 ppm CO₂ составило 1.3, а при 800 ppm CO₂ оно увеличивалось почти в 3 раза и составило 3.4 (рис. 3а).

Определение содержания пролина показало, что выращивание растений в условиях высокой концентрации CO₂ приводило к небольшому, но достоверному его увеличению (в 1.2 раза) (рис. 3б).

Содержание Na⁺ в тканях растений *K. prostrata* не изменялось в зависимости от концентрации CO₂ в камере (рис. 3в). В условиях высокой концентрации CO₂ наблюдалось накопление K⁺ (в 1.3 раза по сравнению с вариантом 400 ppm CO₂) (рис. 3г).

С целью выявления параметров, участвующих в процессе акклимации к высокой концентрации CO₂, был проведен анализ главных компонент (PCA) на растениях *K. prostrata*, произрастающих

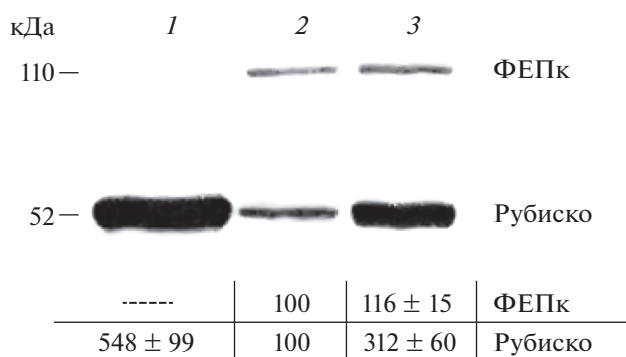


Рис. 2. Результаты вестерн-блоттинга белков Рубиско (большая субъединица) и ФЕПк в листьях растений *Kochia prostrata*, выращенных при разных концентрациях CO_2 (400 и 800 ppm). В качестве контроля взят C_3 -вид (*Salicornia europaea* L.). 1 – *S. europaea*; 2 – *K. prostrata* при 400 ppm CO_2 ; 3 – *K. prostrata* при 800 ppm CO_2 . Относительное содержание Рубиско и ФЕПк дано на основе оценки интенсивности полос в вестерн-блоттинге с помощью программы ImageJ 1.37v (США) и выражено относительно среднего уровня для растений, выращенных при 400 ppm CO_2 , которое было взято за 100%. Приведены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки ($n = 3$).

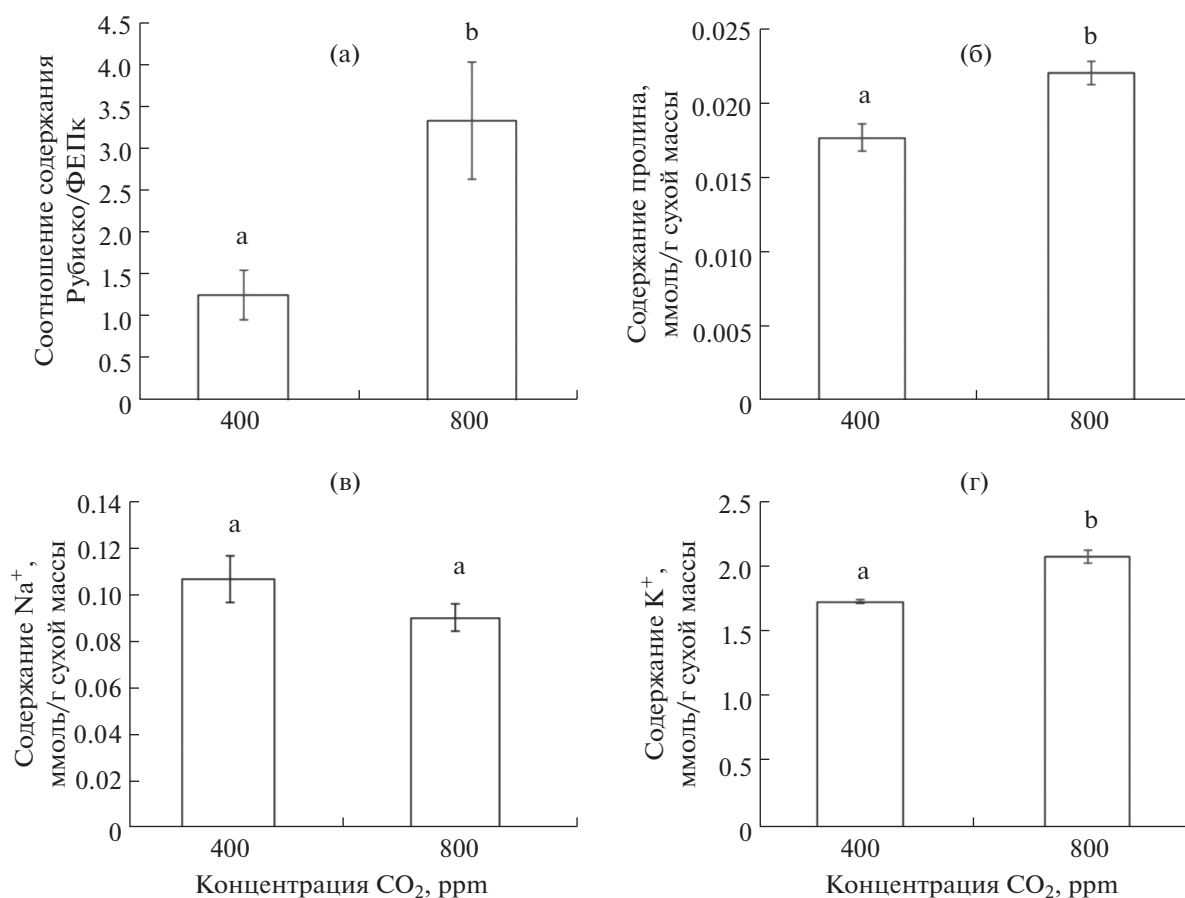


Рис. 3. Соотношение Рубиско/ФЕПк (а), содержание пролина (б), ионов натрия (в) и калия (г) у растений C_4 -галофита (*Kochia prostrata*), выращенных при разных концентрациях CO_2 (400 и 800 ppm). Разными латинскими буквами отмечены достоверные различия на уровне $P < 0.05$ (тест Тьюки).

в условиях естественной (400 ppm) и высокой (800 ppm) концентрациях CO_2 . На рис. 4 видно, что четко выделяются 2 группы, разделенные первым основным компонентом (PC1), что составляет 51.42% от общей вариации. Основными элементами PC1 были содержание K^+ , Рубиско и пролина, т.к. эти переменные имели наиболее высокие значения коэффициентов факторной нагрузки (табл. 1). Второй главный компонент (PC2) не дал четкого разделения на группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокие концентрации CO_2 стимулируют фотосинтез за счет увеличения доступности субстрата (CO_2) для Рубиско и одновременного подавления фотодыхания [16]. Стимуляция фотосинтеза и роста у растений, выращиваемых в условиях повышенных концентраций CO_2 , хорошо изучена [17, 18]. Однако подобная стимуляция часто является непостоянной, и в процессе акклимации растений к повышенной концентрации CO_2 происходит снижение фотосинтетической активности и

уменьшение стимуляции роста растений [19, 20]. Это может быть связано с накоплением сахаров, приводящим к понижению концентрации Рубиско и снижению интенсивности фотосинтеза [21]. В наших экспериментах при выращивании растений *K. prostrata* в условиях повышенной концентрации CO₂ наблюдали небольшое снижение сухой биомассы растений (рис. 1а), которое сопровождалось увеличением содержания пролина и ионов калия (рис. 3б, г). Данный вид, являясь эу-галофитом, обладает специфическими адаптационными механизмами солеустойчивости, в которых большую роль играет накопление ионов натрия и калия в тканях. Наличие таких механизмов и их эффективное функционирование показано на галофите *Salicornia ramosissima* в условиях повышенной концентрации CO₂ (700 ppm) и засоления (510 mM NaCl) [22]. Совместное влияние данных факторов привело к улучшению водного баланса растений за счет сокращения устьичной проводимости и увеличения осмотического потенциала. Несмотря на эти положительные эффекты, существенных изменений в приросте биомассы не наблюдалось. Авторы этот факт объясняют более высокими энергетическими затратами на механизмы защиты от солевого стресса, в том числе связанные с повышением концентрации антиоксидантных пигментов и активности антиоксидантных ферментов [22]. В наших экспериментах, чтобы избежать солевого стресса, мы выращивали растения *K. prostrata* при незначительном содержании ионов натрия в питательном растворе (0.13 mM) и достоверных изменений в содержании Na⁺ в побегах растений при разных концентрациях CO₂ не

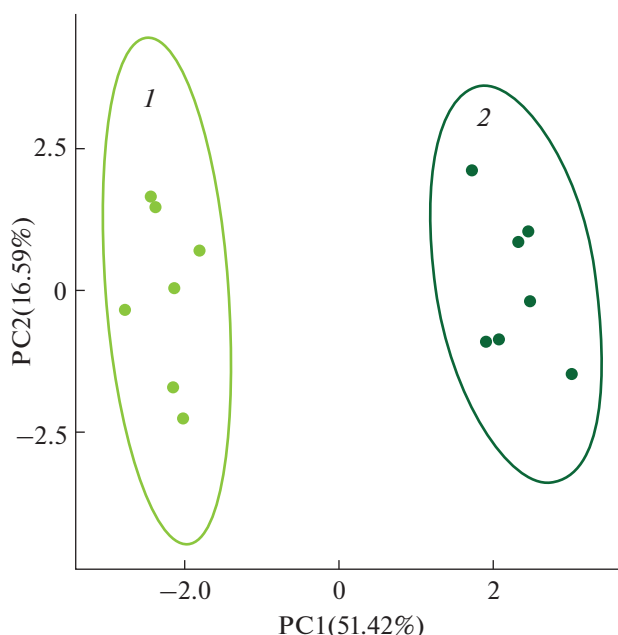


Рис. 4. Анализ главных компонент (PCA) исследованных параметров (биомасса, эффективность фотосистем, содержание воды, пролина, ионов натрия, калия, Рубиско и ФЕПк), участвующих в процессе акклимации растений *Kochia prostrata* к высокой концентрации CO₂. 1 – Растения, выращенные при 400 ppm CO₂; 2 – растения, выращенные при 800 ppm CO₂.

наблюдалось (рис. 3в). В то же время, как следует из полученных результатов, высокая концентрация CO₂ стимулировала увеличение содержания ионов калия и пролина (рис. 3б, г). Как известно, калий является жизненно важным макроэлементом,

Таблица 1. Факторные нагрузки физиологических параметров на главные компоненты (PC1 и PC2) многофакторного анализа (PCA) растений *Kochia prostrata* при действии разных концентраций CO₂ (400 и 800 ppm)

Параметры	PC1	PC2
Сырая биомасса	-0.1381	0.5407
Сухая биомасса	-0.2891	0.3676
Длина побега	0.0143	0.6599
Фотосистема I	-0.3362	-0.1192
Фотосистема II	0.1132	-0.0860
Содержание воды	-0.2247	0.0557
Содержание пролина	0.3954	-0.0953
Содержание K ⁺	0.4123	0.0697
Содержание Na ⁺	-0.3193	-0.0855
Содержание Рубиско	0.4041	0.0750
Содержание ФЕПк	0.3591	0.2920

Примечание. Наиболее значимые параметры выделены полужирным шрифтом.

который выполняет функции, связанные с активацией ферментов, поддержанием осмоса и тургора, размножением клеток, регуляцией электрического мембранного потенциала и гомеостазом pH [23]. Аминокислота пролин играет важную роль в обмене веществ и развитии растений, участвует в поддержании клеточного гомеостаза, включая редокс-баланс и энергетический статус. При действии стрессовых факторов пролин может функционировать как превосходный осмолит, антиоксидант и сигнальная молекула [24]. Повышенное накопление ионов калия и пролина обеспечивали стабильное состояние водного баланса растений *K. prostrata*, что подтверждается постоянным содержанием воды в побегах, а также отсутствием снижения максимального квантового выхода ФС II (рис. 1б, в). Однако, в связи с тем, что процессы накопления ионов калия и биосинтеза пролина являются энергозатратными [23, 24], их стимуляция может служить одной из причин снижения сухой биомассы растений.

В проведенных нами экспериментах у растений *K. prostrata*, выращенных в условиях повышенной концентрации CO₂, наблюдалось снижение времени выхода на плато кинетической кривой ФС I (в 1.7 раза) (рис. 1г), что свидетельствует об уменьшении интенсивности циклического транспорта электронов, в ходе которого осуществляется синтез дополнительного АТФ, необходимого для эффективного функционирования С₄-УКМ [6]. Чувствительность фотосинтетической ЭТЦ к повышению концентрации CO₂ была показана и другими авторами при исследовании ключевых генов и молекулярно-биологических процессов, реагирующих на изменение концентрации CO₂ [25, 26]. Таким образом, снижение сухого веса растений *K. prostrata* при высокой концентрации CO₂ может быть связано также с уменьшением интенсивности циклического транспорта электронов ФС I и, возможно, с менее эффективным функционированием С₄-пути фотосинтеза.

С помощью вестерн-блоттинга и специфических антител к ключевым ферментам С₃- и С₄-путей фотосинтеза (к большой субъединице Рубиско и ФЕПк) было показано, что в условиях высокой концентрации CO₂ у растений *K. prostrata* значительно увеличивалось содержание фотосинтетических ферментов: Рубиско в 3 раза, ФЕПк на 16% (рис. 2). Это привело к возрастанию отношения содержания Рубиско/ФЕПк почти в 3 раза (рис. 3а), что может свидетельствовать об активации менее эффективного С₃-пути фотосинтеза у С₄-галофита *K. prostrata* под влиянием повышенной концентрации CO₂, и также может вносить вклад в снижение сухого веса растений. Увеличение содержания Рубиско может быть связано с воздействием высокой концентрации CO₂ на механизмы регуляции экспрессии генов Рубиско в

клетках мезофилла. Известно, что на ранних стадиях развития листьев амаранта мРНК Рубиско присутствует как в клетках-предшественниках КО, так и в КМ, хотя белки Рубиско накапливаются только в КО [7]. В зрелых листьях проявляется специфичность к КО на уровнях мРНК и накопления белка. Активация механизмов КО-специфичности генов *rbcL* и *RbcS* в развивающихся листьях С₄-растений происходит в ответ на эндогенные и экзогенные сигналы. В частности, показано, что гены Рубиско очень чувствительны к факторам изменения климата [27] и поэтому высокая концентрация CO₂ может выступить в роли такого экзогенного фактора. Установлено, что повышенный уровень CO₂ по-разному влияет на экспрессию фотосинтетических генов, связанных с синтезом Рубиско [26] и ФЕПк [28]. Например, экспрессия генов, кодирующих субъединицы Рубиско может как активироваться [26], так и ингибироваться [29]. Клеточно-специфическое накопление белков в КМ или КО, характерное для С₄-пути фотосинтеза, опосредуется событиями на различных уровнях регуляции экспрессии генов [27]. В тоже время, при исследовании регуляторных механизмов экспрессии клеточно-специфических генов выявлено сходство в системах их контроля, а именно *cis*-элементы, *транс*-факторы и другие регуляторы одинаковы у растений с С₃ и С₄-путями фотосинтеза [30].

Проведенный РСА анализ показал, что значимыми переменными в реакции растений *K. prostrata* на высокий уровень CO₂ являются содержание ионов калия, Рубиско и пролина (рис. 4, табл. 1). Вероятно, высокая концентрация CO₂ стимулирует биосинтез главного фотосинтетического фермента С₃-пути у С₄-вида, а пролин и ионы калия обеспечивают стабилизацию водного обмена, необходимого для активного биосинтеза и эффективного функционирования Рубиско. Итак, у С₄-вида *K. prostrata* в условиях повышенной концентрации CO₂ наблюдается небольшое снижение сухой биомассы, значительное увеличение соотношения Рубиско/ФЕПк, снижение активности циклического транспорта электронов ФС I, необходимого для синтеза дополнительного АТФ и эффективного функционирования С₄-УКМ, а также увеличение содержания пролина и жизненно важных ионов калия.

Полученные результаты позволяют предположить, что повышенный уровень концентрации CO₂ (особенно в условиях отсутствия засоления) активизирует С₃-путь фотосинтеза в КМ и в КО проводящих пучков листьев С₄-галофита *K. prostrata*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sage R.F., Sage T.L., Kocacinar F. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2012. V. 63. P. 19.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105511>
2. Raven J.A., Beardall J., Sánchez-Baracaldo P. The possible evolution and future of CO₂-concentrating mechanisms // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3701.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx110>
3. Arrivault S., Moraes T.A., Obata T., Medeiros D.B., Fernie A.R., Boulouis A., Ludwig M., Lunn J.E., Borghi G.L., Schlereth A., Guenther M., Stitt M. Metabolite profiles reveal inter-specific variation in operation of the Calvin-Benson cycle in both C₄ and C₃ plants // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 1843.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz051>
4. Lara M.V., Andreo C.S. C₄ plants adaptation to high levels of CO₂ and to drought environments // Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations / Eds. Shanker A., Venkateswarlu B. InTech: Croatia, 2011. V. 18. P. 415.
<https://doi.org/10.5772/24936>
5. Edwards G.E., Walker D.A. C₃, C₄: Mechanism, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis / Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1983, 542 p.
6. Nakamura N., Iwano M., Havaux M., Yokota A., Munekage Y.N. Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP malic enzyme-type C photosynthesis in the genus *Flaveria* // New Phytol. 2013. V. 199. P. 832.
<https://doi.org/10.1111/nph.12296>
7. Berry J.O., Mure C.M., Yerramsetty P. Regulation of Rubisco gene expression in C₄ plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2016. V. 31. P. 23.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.004>
8. Westhoff P., Gowik U. Evolution of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: a case study with the genus *Flaveria* // Ann. Bot. 2004. V. 93. P. 13.
<https://doi.org/10.1093/aob/mch003>
9. Ghannoum O., von Caemmerer S., Ziska L.H., Conroy J.P. The growth response of C₄ plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment // Plant Cell Environ. 2000. V. 23. P. 931.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00609.x>
10. Reddy A.R., Rasineni G.K., Raghavendra A.S. The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity // Curr. Sci. 2010. V. 99. P. 46.
11. Watling J.R., Press M.C., Quick W.P. Elevated CO₂ induces biochemical and ultrastructural changes in leaves of the C₄ cereal sorghum // Plant Physiol. 2000. V. 123. P. 1143.
<https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1143>
12. Sage R.F. How terrestrial organisms sense, signal and respond to carbon dioxide // Integ. and Comp. Biol. 2002. V. 42. P. 469.
<https://doi.org/10.1093/icb/42.3.469>
13. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205.
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
14. Пожудаева Е.С. Вестерн-блот-гибридизация // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2011. С. 228.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
16. Drake B.G., Gonzalez-Meler M.A., Long S.P. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 609.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.609>
17. Ainsworth E.A., Rogers A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions // Plant Cell Environ. 2007. V. 30. P. 258.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01641.x>
18. Dusenke M.E., Duarte A.G., Way D.A. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration // New Phytol. 2019. V. 221. P. 32.
<https://doi.org/10.1111/nph.15283>
19. Leuzinger S., Luo Y., Beier C., Dieleman W., Vicca S., Körner C. Do global change experiments overestimate impacts on terrestrial ecosystems? // Trends Ecol. Evol. 2011. V. 26. P. 236.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.02.011>
20. Warren J.M., Jensen A.M., Medlyn B.E., Norby R.J., Tissue D.T. Carbon dioxide stimulation of photosynthesis in *Liquidambar styraciflua* is not sustained during a 12-year field experiment // AoB Plants. 2015. V. 7: plu074.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plu074>
21. Moore B.D., Cheng S.-H., Sims D., Seemann J.R. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂ // Plant Cell Environ. 1999. V. 22. P. 567.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00432.x>
22. Pérez-Romero J.A., Idaszkin Y.L., Barcia-Piedras J.M., Duarte B., Redondo-Gómez S. Caçador I., Mateos-Naranjo E. Disentangling the effect of atmospheric CO₂ enrichment on the halophyte *Salicornia ramosissima* J. Woods physiological performance under optimal and suboptimal saline conditions // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 127. P. 617.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.041>
23. Ragel P., Raddatz N., Leidi E.O., Quintero F.J., Pardo J.M. Regulation of K⁺ nutrition in plants // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 281.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00281>
24. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environ-

- ments: a review // *Plant Signal Behav.* 2012. V. 7. P. 1456.
<https://doi.org/10.4161/psb.21949>
25. *Zheng S., Chen Z., Nie H., Sun S., Zhou D., Wang T., Zhai X., Liu T., Xing G., Li M.* Identification of differentially expressed photosynthesis- and sugar synthesis-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants grown under different CO₂ concentrations // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2020. V. 34. P. 84.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1715833>
26. *Zhao X., Li W.F., Wang Y., Ma Z.H., Yang S.J., Zhou Q., Mao J., Chen B.H.* Elevated CO₂ concentration promotes photosynthesis of grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Pinot noir') plantlet in vitro by regulating RbcS and Rca revealed by proteomic and transcriptomic profiles // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 42.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1644-y>
27. *Hibberd J.M., Covshoff S.* The regulation of gene expression required for C₄ photosynthesis // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. V. 61. P. 181.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112238>
28. *Silva R.G.D., Alves R.D.C., Zingaretti S.M.* Increased [CO₂] causes changes in physiological and genetic responses in C₄ crops: a brief review // *Plants.* 2020. V. 9. P. 1567.
<https://doi.org/10.3390/plants9111567>
29. *Huang Y., Fang R., Li Y., Liu X., Wang G., Yin K., Jin J., Herbert S.J.* Warming and elevated CO₂ alter the transcriptomic response of maize (*Zea mays* L.) at the silking stage // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 17948.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54325-5>
30. *Reeves G., Grangé-Guermente M.J., Hibberd J.M.* Regulatory gateways for cell-specific gene expression in C₄ leaves with Kranz anatomy // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 107.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw438>

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ NaCl НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПОКАЗАТЕЛИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ У *Nasturtium officinale* R. Br. ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ИСКУССТВЕННЫМ ЗАМКНУТЫМ ЭКОСИСТЕМАМ

© 2021 г. А. М. Павлова^{a, b, *}, Н. А. Гаевский^a, О. В. Анищенко^b,
Н. А. Тихомирова^b, А. А. Тихомиров^{b, c}

^a Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Сибирский федеральный университет”, Красноярск, Россия

^b Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр, Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

^c Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Сибирский государственный университет науки и технологий им. академика М.Ф. Решетнева”, Красноярск, Россия

*e-mail: Оксу92@mail.ru

Поступила в редакцию 22.10.2020 г.

После доработки 29.01.2021 г.

Принята к публикации 11.02.2021 г.

Исследованы продуктивность, накопление натрия в абсолютно сухой надземной биомассе (АСНБ) и показатели фотосинтеза у листьев растений водяного кресс-салата (*Nasturtium officinale*) в условиях, приближенных к искусственным замкнутым экосистемам (ЗЭС). Растения выращивали при различных уровнях содержания NaCl в питательных растворах (0.7, 1.4, 1.8 г/л) в течение 7, 14 и 19 сут после перенесения растений на солевой раствор, соответственно. Продуктивность растений с увеличением уровня засоления на 7 сут не отличалась от контрольных растений. Снижение продуктивности растений отмечали во всех опытных вариантах, начиная с 14 сут после переноса растений на солевой раствор. Повышение концентрации NaCl в питательном растворе от 0.7 до 1.8 г/л приводило к значительному увеличению относительного содержания Na⁺ в тканях растений вне зависимости от продолжительности действия NaCl. Отмечали значительное снижение отношения суммы хлорофиллов (*a* + *b*) к каротиноидам на 7 и 14 сут у растений, выращенных при 1.8 г/л NaCl, и повышение содержания хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов на 7 сут у растений, выращенных при 0.7 и 1.4 г/л NaCl, что указывает на устойчивость *N. officinale* к условиям ЗЭС. Уровень засоления раствора не повлиял на долю хлорофиллов *a* и *b* в составе светособирающего хлорофилл (*a* + *b*) комплекса растений. Зарегистрированы высокие значения максимального квантового выхода (Y(II)_{max}) ФС II (0.755 ± 0.007) у растений *N. officinale*. С использованием Imaging PAM Maxi показано, что различия между опытными и контрольными вариантами в характере световой зависимости эффективного квантового выхода фотохимического тушения (Y(II)) и квантового выхода нефотохимического тушения (Y(NPQ)) флуоресценции проявляются преимущественно при длительном действии (19 сут) засоления в вариантах 0.7 и 1.4 г/л. Показано, что NaCl в концентрации 1.8 г/л в период между 14 и 19 сут после переноса растений на раствор не повлиял на характер световых зависимостей Y(II) и Y(NPQ). Обосновываются возможности использования *N. officinale* как источника NaCl для человека в условиях ЗЭС.

Ключевые слова: *Nasturtium officinale*, гликофит, солеустойчивость, фотосинтетический аппарат, замкнутые экосистемы

DOI: 10.31857/S0015330321050134

ВВЕДЕНИЕ

Высшие растения обеспечивают газообмен в замкнутых экологических системах (ЗЭС), являются источником воды и растительной пищи, а

также активно участвуют в вовлечении органических отходов во внутрисистемный массообмен. В повышении замкнутости такого массообмена значительные трудности возникают при включении в круговорот жидких органических выделений человека, содержащих хлорид натрия, который с ростом концентрации в питательном растворе приводит к ингибированию роста растений. Од-

Сокращения: АСНБ – абсолютно сухая надземная биомасса; ЗЭС – замкнутые экологические системы; Кар – каротиноиды; ССК – светособирающий хлорофилл (*a* + *b*) комплекс; Хл – хлорофилл.

ним из способов решения этой проблемы является включение в фотосинтезирующее звено замкнутой экосистемы съедобных для человека соле-накапливающих растений, что позволяет извлечь из питательного раствора NaCl и вернуть его человеку в виде съедобной биомассы с повышенным содержанием поваренной соли. Такая возможность была успешно продемонстрирована в исследованиях физиологии съедобного соленакапливающего галофита солероса европейского (*Salicornia europaea*) применительно к условиям ЗЭС [1]. Для усиления изъятия из питательного раствора NaCl и улучшения разнообразия растительной диеты представляется целесообразным включить в структуру фототрофного звена дополнительный вид солеустойчивого съедобного растения. Как показали предварительные исследования, таким кандидатом может быть водяной кресс-салат (*Nasturtium officinale*), который может культивироваться в условиях, приближенных к ЗЭС, является солеустойчивым видом и может произрастать в диапазоне нарастающих концентраций NaCl от 0.7 до 2.1 г/л [2]. В связи с этим актуально исследовать возможности адаптации *N. officinale* к различным уровням засоления, характерным для ЗЭС, и оценить некоторые возможные механизмы такой адаптации.

Известно, что у растений с разной степенью устойчивости к засолению происходят изменения как в росте растений, так и в процессах фотосинтеза. В частности, воздействуя на отдельные реакции фотосинтеза, NaCl приводит к изменению его активности и в результате влияет на общую продуктивность растений [3]. Однако применительно к условиям ЗЭС возможности адаптации фотосинтетического аппарата растений (в данном случае *N. officinale*) к разной степени засоления еще недостаточно изучены. Одним из эффективных способов оценки состояния фотосинтетического аппарата растений при различных видах стресса является флуоресценция хлорофилла (Хл) *a* [4, 5].

Цель работы – оценка влияния концентрации NaCl на накопление абсолютно сухой надземной биомассы, содержание фотосинтетических пигментов и показатели флуоресценции хлорофилла *a*, связанные с процессом фотосинтеза у водяного кресс-салата (*Nasturtium officinale*), а также оценка возможности использования данного вида для культивирования в условиях ЗЭС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Водяной кресс-салат (*Nasturtium officinale* R.Br., сем. *Brassicaceae*).

Условия выращивания. Растения выращивали в вегетационной камере при 24-часовом фотопериоде в вегетационных сосудах из нержавеющей стали объемом 2.5 л с посевной площадью 0.032 м². Усло-

вия в камере в течение суток: температура воздуха – 24 ± 1°C, концентрация CO₂ – 0.03%, относительная влажность воздуха – 60–70%. Источник света – металлогалогенная лампа ДМЗ-3000 (МЭЛЗ, СССР). Величина квантового потока в области ФАР – 690 мкмоль фотонов × м⁻² × с⁻¹.

Питательный раствор по минеральному составу имитировал раствор, который образуется после выращивания растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на минерализованных органических отходах человека в ЗЭС [2], (мг/л): NO₃ – 150, P – 41, K – 216, Na – 8, Ca – 229, Mg – 41, S – 86. Раствор готовили на отстоянной водопроводной воде. Дополнительно вносили лимоннокислое железо (2.4 мг/л) и микроэлементы по Кнопу [6].

Получение посадочного материала. Семена проращивали в вегетационной камере на влажном мелком керамзите в течении 7 сут при величине квантового потока в области ФАР 400 мкмоль фотонов × м⁻² × с⁻¹. На стадии 3–4 настоящих листьев для адаптации корней к водной среде молодые растения помещали в отверстия (*d* = 0.7 см) на вспененной пищевой подложке, находящейся в сосуде с отстоянной водопроводной водой. По истечении 1 сут молодые растения перемещали в сосуды (2.5 л) с питательным раствором, состоящим в равных частях из питательного раствора и отстоянной водопроводной воды. Через 3 сут растения перемещали на контрольные и опытные растворы объемом 2 л. Растворы постоянно аэрировали. По мере испарения воды в сосуды добавляли отстоянную водопроводную воду. Питательные растворы заменяли на свежеприготовленные один раз в неделю. Плотность посадки – 3 растения на сосуд (3 растения/0.032 м²; 94 растения/м²).

Условия проведения экспериментов. Действие NaCl (засоления) на растения исследовали в трех независимых экспериментах. Содержание NaCl в контрольном растворе составляло 0.02 г/л. В опытных вариантах содержание NaCl составляло 0.7, 1.4 и 1.8 г/л. Физиологические показатели растений определяли на 7, 14 и 19 сут после переноса растений на контрольный и солевой растворы.

Определение АСНБ. Образцы надземной части растений нагревали при +105°C в течении 5 мин, затем высушивали при +70°C до постоянной массы. АСНБ определяли на аналитических весах с точностью до 0.001 г.

Определение содержания натрия. Анализ проводили в аналитической лаборатории Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук. Сухую навеску массой 0.2 г озольяли в смеси азотной и хлорной кислоты (1 : 1), затем переносили в пробирку и доводили деионизированной водой до 14 мл с последующим разведением в 100 раз [7]. Содержание натрия определяли с помощью спектрометра iCAP-6300 Duo (“Thermo Scientific”, США). Ошибка метода не превышала

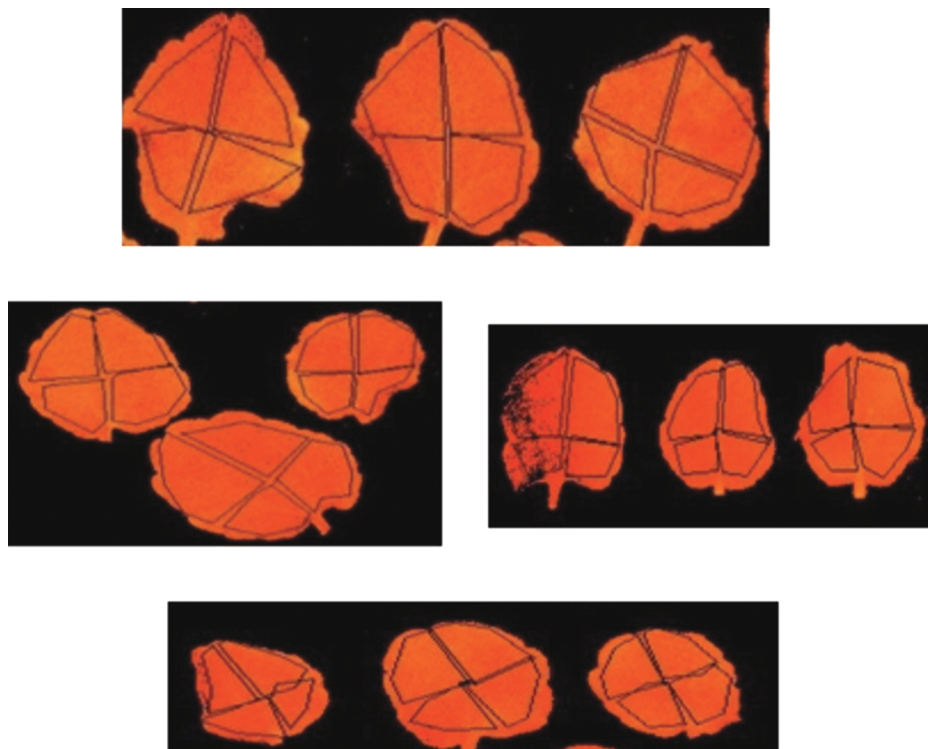


Рис. 1. Серия изображений листьев *N. officinale* в режиме регистрации F_0 с помощью программы Imaging Win.

15% (получено при сравнении со стандартным образцом травосмеси ТР-1 (ГСОН№8922-2007, Иркутск, Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН).

Определение содержания фотосинтетических пигментов. Содержание фотосинтетических пигментов определяли непосредственно после измерения параметров флуоресценции Хл *a*. Отдельный лист помещали в пробирку, в которую добавляли 5–10 мл 96% этилового спирта и 10 мг сухого CaCO_3 . Пробирки нагревали на водяной бане при $+70^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и помещали в холодильник на 24 ч для окончательной экстракции пигментов. Оптическую плотность растворов определяли на Spekol 1300 (“Analytik Jena”, Германия) при длинах волн 440.5, 649, 665 и 720 нм. Расчет концентрации Хл *a*, *b* и суммы каротиноидов (Кар) проводили по методу [8]. Содержание пигментов выражали на мг/г сухой массы листьев. Дополнительно рассчитывали отношения Хл (*a* + *b*)/Кар.

Долю хлорофиллов в составе ССК рассчитывали согласно Lichtentaler [9]:

$$(C_{\text{Хл}b} + 1.2C_{\text{Хл}b}) / (C_{\text{Хл}a} + C_{\text{Хл}b}), \quad (1)$$

исходя из того, что весь Хл *b* находится в ССК, а отношение Хл *a*/Хл *b* в этом комплексе составляет 1.2 [9].

Регистрация параметров флуоресценции Хл *a*.

Во всех экспериментах использовали хорошо развитые листья без видимых повреждений контрольных и опытных растений. При отборе проб на 7 сут, после переноса растений на контрольные и солевые растворы, от побегов отделяли по одному листу растений из каждого из трех сосудов одного варианта, на 14 и 19 сут – по два листа. После отделения от растений листья адаптировали к темноте в течение 15–20 мин во влажной камере. Затем листья перемещали на рабочий стенд флуориметра Imaging PAM Maxi (“Walz”, Германия) с влажной фильтровальной бумагой. В режиме визуальной регистрации нулевого уровня флуоресценции (F_0) на каждом листе выделяли по 4 зоны, не затрагивая края листьев (рис. 1). В пределах каждой зоны программа Imaging PAM Maxi регистрировала усредненные параметры флуоресценции.

Функциональные показатели фотосинтетического аппарата регистрировали в режиме “световая кривая”. Величина квантового потока ступенчато изменялась от 21 до 701 мкмоль фотонов $\times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, время световой экспозиции на каждом из девяти уровней возбуждения – 20 с. Световые кривые строили по 10 точкам, включая 0. С помощью программы Imaging Win определяли следующие параметры: максимальный квантовый выход фотохимического тушения флуоресценции $\Phi\text{С II} - \text{Y}(\text{II})_{\text{max}}$, эффективный квантовый выход, зави-

сящий от интенсивности света $\PhiС II - Y(II)$ и квантовый выход нефотохимического тушения флуоресценции — $Y(NPQ)$.

Максимальный квантовый выход $\PhiС II Y(II)_{max}$ определяли согласно [10] после темновой экспозиции листьев до включения актиничного света:

$$Y(II)_{max} = (F_m - F_0) / F_m, \quad (2)$$

где F_0 и F_m — нулевой и максимальный уровень, соответственно.

Значения эффективного квантового выхода $\PhiС II$ определяли для каждой интенсивности актиничного света на основе соответствующих значений максимального (F'_m) и стационарного (F'_s) уровня флуоресценции [10]:

$$Y(II) = (F'_m - F'_s) / F'_m. \quad (3)$$

Скорость нециклического электронного транспорта (ETR), мкмоль электронов $\times m^{-2} \times c^{-1}$ рассчитывали по формуле:

$$ETR = 0.5 \times \Phi AP \times 0.84 \times Y(II), \quad (4)$$

где коэффициент 0.5 — доля квантов возбуждающего света, поглощенных пигментами антенного комплекса $\PhiС II$ при нециклическом электронном транспорте, $Y(II)$ — эффективный квантовый выход фотохимического тушения флуоресценции, ΦAP — величина квантового потока в области ΦAP (мкмоль фотонов $\times m^{-2} \times c^{-1}$), коэффициент 0.84 — доля фотонов, поглощенных фотосинтетическими пигментами зеленого листа [11].

Параметры световой кривой ETR: (α) — угол наклона касательной на начальном участке световой кривой, который связан с квантовой эффективностью $\PhiС II$, (ETR_{mPot}) — максимальная потенциальная скорость электронного транспорта, ΦAP — величина квантового потока в области ΦAP , которую аппроксимировали при R^2 приближенной к 0.97, используя выражение [11]:

$$ETR = ETR_{mPot} (1 - e^{-\alpha \Phi AP / ETR_{mPot}}). \quad (5)$$

Также фиксировали максимальную экспериментальную скорость электронного транспорта (ETR_{max}), зарегистрированную при величине квантового потока 700 мкмоль электронов $\times m^{-2} \times c^{-1}$.

Статистическая обработка данных. В табл. 1 и на рисунках 2–6 приведены средние значения и стандартные ошибки среднего в ходе независимых экспериментов, каждый из которых был проведен в трех биологических повторностях. Биологическая повторность представляла собой измерения, проведенные на группе из трех растений из одного сосуда. Для определения значимости различий средних значений использовали t -тест Стьюдента при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние NaCl на содержание натрия в АСНБ и продуктивность растений

Так как в ЗЭС необходимо решить проблему утилизации хлористого натрия из минерализованной урины человека и обеспечить возврат NaCl человеку со съедобной растительной биомассой, было определено содержание натрия в абсолютно сухой надземной биомассе (АСНБ) и сама АСНБ растений (рис. 2а–е). Содержание Na в АСНБ растений увеличивалось после 7 сут выращивания на солевых растворах (рис. 2д–е). Так, в вариантах с засолением 0.7, 1.4 и 1.8 г/л содержание Na в АСНБ растений превосходило контроль в 16, 17 и 35 раз, соответственно (рис. 2а–в). При этом АСНБ во всех опытных вариантах на 7 сут выращивания на солевых растворах достоверно не отличалась от контрольных вариантов. Ингибирование роста растений, а вместе с этим и накопление Na происходило в период от 7 до 14 сут после переноса растений на солевой раствор во всех опытных вариантах. По сравнению с контрольным вариантом содержание натрия в АСНБ на 14 сут достоверно возросло, соответственно, при концентрациях NaCl: 0.7 г/л — в 18 раз, при 1.4 г/л — в 30 раз, при 1.8 г/л — в 40 раз. При этом АСНБ в вариантах 0.7 и 1.4 г/л NaCl была практически в 2 раза ниже, а в варианте 1.8 г/л NaCl в 3 раза ниже, чем в контрольных вариантах. На 19 сут культивирования у растений не регистрировали достоверных различий в накоплении Na в АСНБ в вариантах 0.7, 1.4 и 1.8 г/л NaCl. При этом значения АСНБ на 19 сут не отличалась от АСНБ на 14 сут у контрольных вариантов (рис. 2г–е). Содержание Na на 19 сут у опытных и контрольных вариантов различалось в 25, 34 и 33 раз, а сама АСНБ различалась соответственно в 1.5, 2.0 и 2.2 раз (рис. 2а–е). Отметим, что засоление растворов (0.7, 1.4 и 1.8 г/л) стало причиной перехода растений в стадию бутонизации на 14 сут, и в варианте с засолением 1.8 г/л — в стадию цветения на 19 сут после переноса растений на солевой раствор.

Влияние NaCl на пигментный состав растений

Одним из ключевых критериев в выборе растений применительно к условиям ЗЭС является способность фотосинтетического аппарата активно функционировать при засолении питательного раствора. Надежным показателем устойчивости фотосинтеза к засолению выступают фотосинтетические пигменты, абсолютное и относительное содержание которых откликается на стрессовые условия среды [12]. Так, содержание Хл *a*, Хл *b* и Кар на 7 сут выращивания растений при 0.7 г/л NaCl было в 3.2, 4.5 и 3 раза, соответственно выше, чем в контроле (рис. 3а). Содержание Хл *a*, Хл *b* и Кар к 14 сут выращивания растений на солевых

Таблица 1. Параметры световой кривой нециклического транспорта электронов в зависимости от концентрации соли и сроков выращивания растений *N. officinale* в экспериментах с 0.7, 1.4 и 1.8 г/л NaCl на 7, 14 и 19 сут после переноса растений на контрольные и солевые растворы, соответственно

Эксперимент	Вариант засоления	Срок действия NaCl, сут	$Y(II)_{\max}$	α	ETR_{\max} , мкмоль электронов $\times M^{-2} \times c^{-1}$
№ 1	0.02 г/л NaCl	7	0.71 ± 0.01^a	0.14 ± 0.01^a	58.1 ± 3.70^a
	0.7 г/л NaCl	7	0.77 ± 0.00^b	0.14 ± 0.01^a	61.7 ± 2.20^a
№ 2	0.02 г/л NaCl	7	0.77 ± 0.01^a	0.19 ± 0.01^a	71.5 ± 3.20^a
	1.4 г/л NaCl	7	0.78 ± 0.01^a	0.18 ± 0.02^a	66.2 ± 16.9^a
№ 3	0.02 г/л NaCl	7	0.74 ± 0.00^a	0.12 ± 0.00^a	53.5 ± 2.54^a
	1.8 г/л NaCl	7	0.75 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^b	41.6 ± 2.02^b
№ 1	0.02 г/л NaCl	14	0.79 ± 0.00^a	0.19 ± 0.01^a	76.9 ± 2.82^a
	0.7 г/л NaCl	14	0.77 ± 0.02^a	0.19 ± 0.01^a	67.6 ± 5.34^b
№ 2	0.02 г/л NaCl	14	0.75 ± 0.00^a	0.14 ± 0.01^a	52.9 ± 2.81^a
	1.4 г/л NaCl	14	0.75 ± 0.00^a	0.16 ± 0.00^b	58.7 ± 1.73^b
№ 3	0.02 г/л NaCl	14	0.75 ± 0.00^a	0.14 ± 0.01^a	52.9 ± 2.81^a
	1.8 г/л NaCl	14	0.75 ± 0.00^a	0.14 ± 0.01^a	41.7 ± 1.31^b
№ 1	0.02 г/л NaCl	19	0.67 ± 0.03^a	0.15 ± 0.01^a	64.4 ± 4.29^a
	0.7 г/л NaCl	19	0.75 ± 0.01^b	0.18 ± 0.01^b	64.9 ± 2.17^a
№ 2	0.02 г/л NaCl	19	0.74 ± 0.01^a	0.12 ± 0.00^a	50.3 ± 1.92^a
	1.4 г/л NaCl	19	0.76 ± 0.01^a	0.15 ± 0.00^b	62.0 ± 1.46^b
№ 3	0.02 г/л NaCl	19	0.77 ± 0.00^a	0.18 ± 0.01^a	66.8 ± 1.57^a
	1.8 г/л NaCl	19	0.79 ± 0.00^b	0.18 ± 0.01^a	61.7 ± 2.40^b

Примечание. Каждый параметр получен при $n = 3-7$ сут, при $n = 6-14$ и 19 сут. Значимые различия между контрольными и опытными вариантами обозначены разными латинскими буквами.

растворах снизилось в варианте 0.7 г/л NaCl на 50, 61.5 и 65%, соответственно, при этом в контрольных вариантах за данный период достоверных изменений данных показателей не обнаружили (рис. 3а). К 19 сут выращивания растений при 0.7 г/л NaCl произошло незначительное увеличение содержания Хл *a*, как и в контрольных вариантах. При этом не происходило изменений в содержании Хл *b* и Кар в контрольных и опытных вариантах (рис. 3а). Между контрольными и опытными вариантами (0.7 г/л NaCl) за период 7–19 сут после переноса растений на солевые и контрольные растворы не обнаружили различий в Хл (*a + b*)/Кар. При этом между 7 и 14 сут выращивания растений в контрольном и опытном вариантах происходило увеличение в Хл (*a + b*)/Кар на 34 и 23%, соответственно. При увеличении длительности действия NaCl до 19 сут достоверных различий в данном параметре не выявили, как и в контрольном варианте (рис. 3г). Максимальное значение доли хлорофиллов в ССК в варианте 0.7 г/л NaCl обнаружили на 7 сут (0.73 ± 0.06) после переноса растений на солевые растворы.

При повышении уровня засоления до 1.4 г/л происходило снижение содержания хлорофиллов и Кар (рис. 3б). Содержание Хл *a*, Хл *b* и Кар на 7 сут выращивания растений при 1.4 г/л NaCl было в 2.0, 2.0 и 1.6 раза, соответственно, выше, чем в контроле. Между 7 и 14 сут происходило незначительное снижение содержания Хл *a*, Хл *b* и Кар у растений *N. officinale*, выращенных при 1.4 г/л NaCl. При этом в контрольных вариантах в данный период выращивания растений происходило увеличение в содержании Хл *a* и Хл *b* на 40 и 44%, соответственно. В отношении Хл (*a + b*)/Кар в период 7–19 сут выращивания растений между 1.4 г/л NaCl и контролями не обнаружили достоверных различий. При этом между 7 и 14 сут выращивания растений при 1.4 г/л NaCl, как и в контролях, происходило увеличение данного параметра на 20 и 32%, соответственно. Отметим, что при переходе растений в стадию бутонизации (14–19 сут выращивания растений на солевых растворах) не происходило изменения в отношении Хл (*a + b*)/Кар, как и в контрольных вариантах. Концентрация NaCl в растворе 1.4 г/л не повлияла на ССК расте-

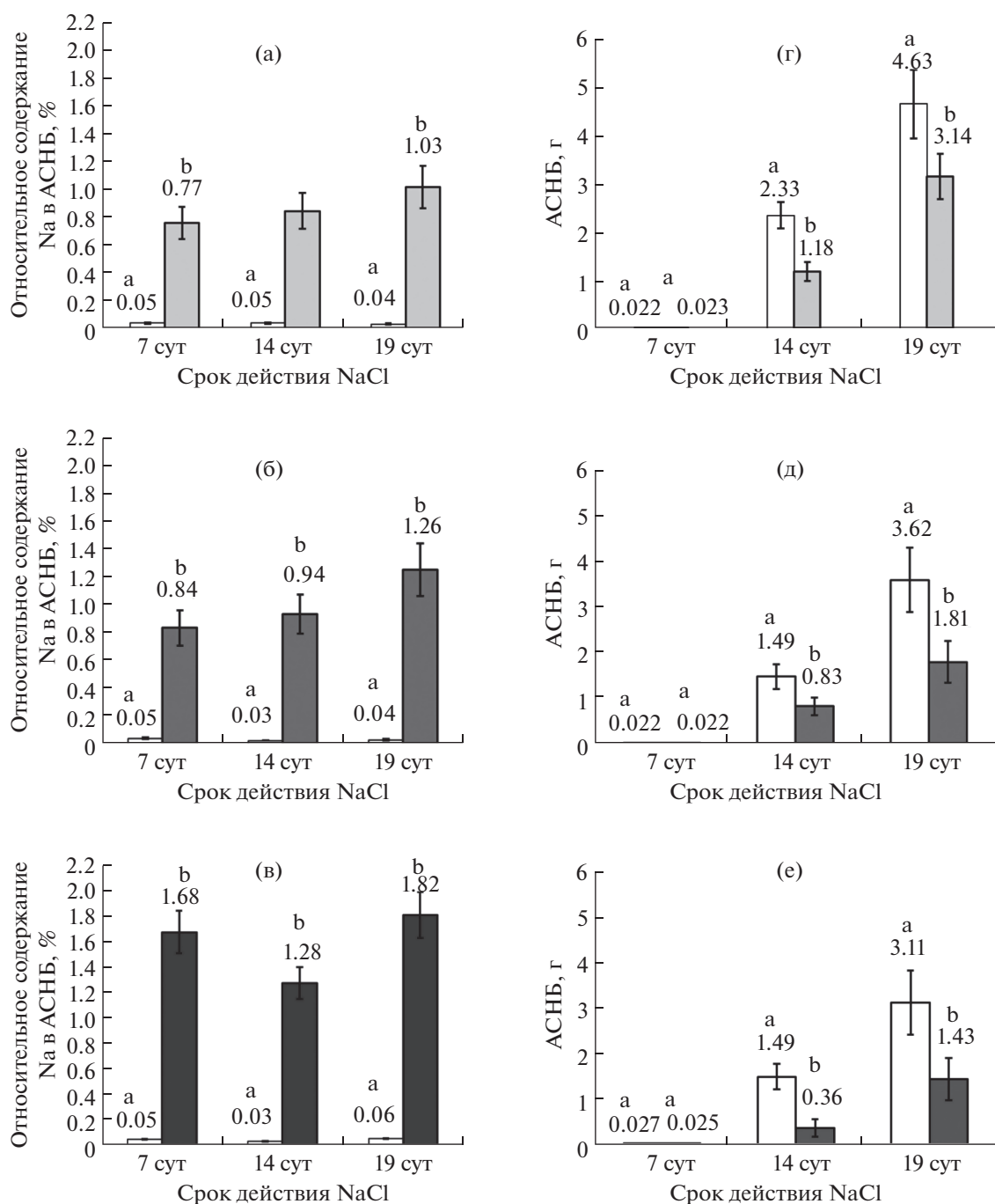


Рис. 2. Относительное содержание Na^+ в АСНБ и АСНБ при выращивании *N. officinale* в контрольных растениях и после переноса растений на 0.7 г/л NaCl (а, г), на 1.4 г/л NaCl (б, д) и на 1.8 г/л NaCl (в, е). Показаны средние значения и ошибка среднего при $P < 0.05$ (на 7 сут при $n = 9$, на 14 и 19 сут при $n = 9$). Значимые различия между контрольными и опытными вариантами обозначены разными латинскими буквами.

ний водяного кресс-салата на 7, 14 и 19 сут после переноса растений на солевые растворы (рис. 3д).

Содержание Хл *a*, Хл *b* и Кар в период 7–19 сут выращивания растений при концентрации NaCl 1.8 г/л не отличалось от контроля (рис. 3в). При этом на 7 сут выращивания растений при 1.8 г/л NaCl отмечено снижение в отношении Хл (*a* + *b*)/Кар

в 1.3 раза, соответственно, по сравнению с контролем (рис. 3е). В период между 7 и 14 сут выращивания растений при концентрации NaCl 1.8 г/л происходило достоверное повышение данного параметра на 28%, а в контроле – на 20%. При длительном засолении (14–19 сут) 1.8 г/л происходило повышение в отношении Хл (*a* + *b*)/Кар

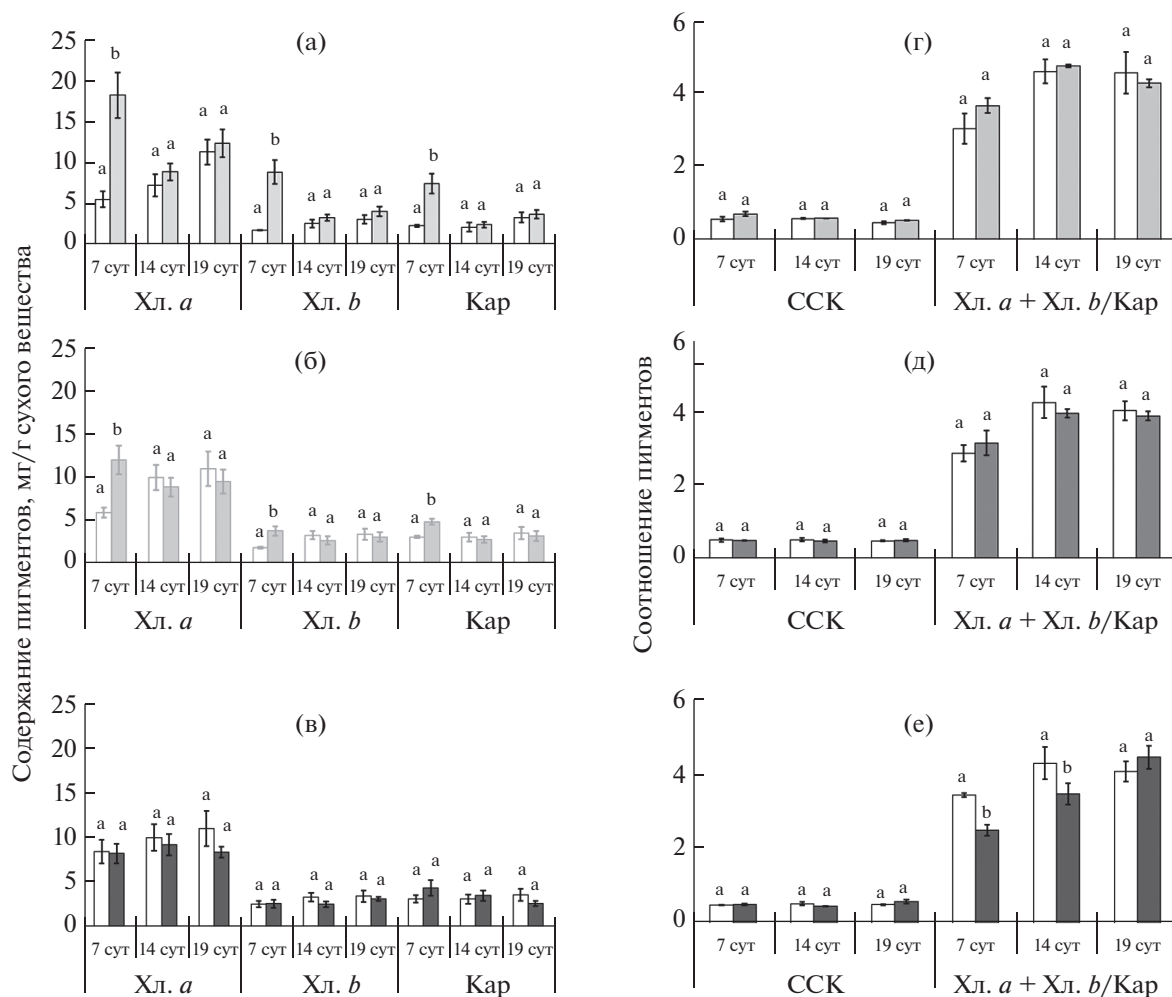


Рис. 3. Содержание фотосинтетических пигментов (Хл. *a*, Хл. *b*, каротиноидов (Кар)) и их соотношений (отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам (Хл (*a* + *b*)/Кар), светособирающий хлорофилл (*a* + *b*) комплекс (ССК)) в листьях *N. officinale* у контрольных растений и после переноса растений на 0.7 г/л NaCl (а, г), на 1.4 г/л NaCl (б, д) и на 1.8 г/л NaCl (в, е). Показаны средние значения и ошибка среднего при $P < 0.05$ (на 7 сут при $n = 3$, 14 и на 19 сут при $n = 6$). Значимые различия между контрольными и опытными вариантами обозначены разными латинскими буквами.

на 22%, при этом в контрольном варианте различий не выявили (рис. 3е).

Концентрация NaCl в растворе 1.8 г/л не повлияла на ССК растений водяного кресс-салата, убранных на 7, 14 и 19 сут после переноса растений на солевые растворы. Кроме того, ССК опытных растений не отличалась от контрольных растений.

Влияние NaCl на параметры флуоресценции Хл а в листьях растений

Световые зависимости эффективного квантового выхода ФС II ($Y(II)$) и квантового выхода нефотохимического тушения флуоресценции ($Y(NPQ)$) (рис. 4–6), полученные в режиме регистрации световой кривой на РАМ-флуориметрах, кроме влияния величины квантового потока отражали

характер изменений, происходящих в индукционный период после включения актиничного света. Оба показателя зависели от электрохимического градиента протонов на мембране тилакоида. Обратная зависимость $Y(II)$ от $Y(NPQ)$ для сопряженных значений на световых кривых имела линейный характер. Оба параметра достигали близких к стационарному уровню значений при 200 мкмоль фотонов \times м⁻² \times с⁻¹ (через 1.5 мин после включения актиничного света (рис. 4–6)). Некоторые кинетические различия между контрольными вариантами повторялись в соответствующих опытных вариантах (рис. 6). В экспериментах №1 (0.7 г/л NaCl) и №2 (1.4 г/л NaCl) после 19 сут культивирования абсолютные значения $Y(II)$ и $Y(NPQ)$ в контрольном и опытном вариантах достоверно различались. При этом в опытном варианте возрастал вклад $Y(II)$ и снижался вклад $Y(NPQ)$ в

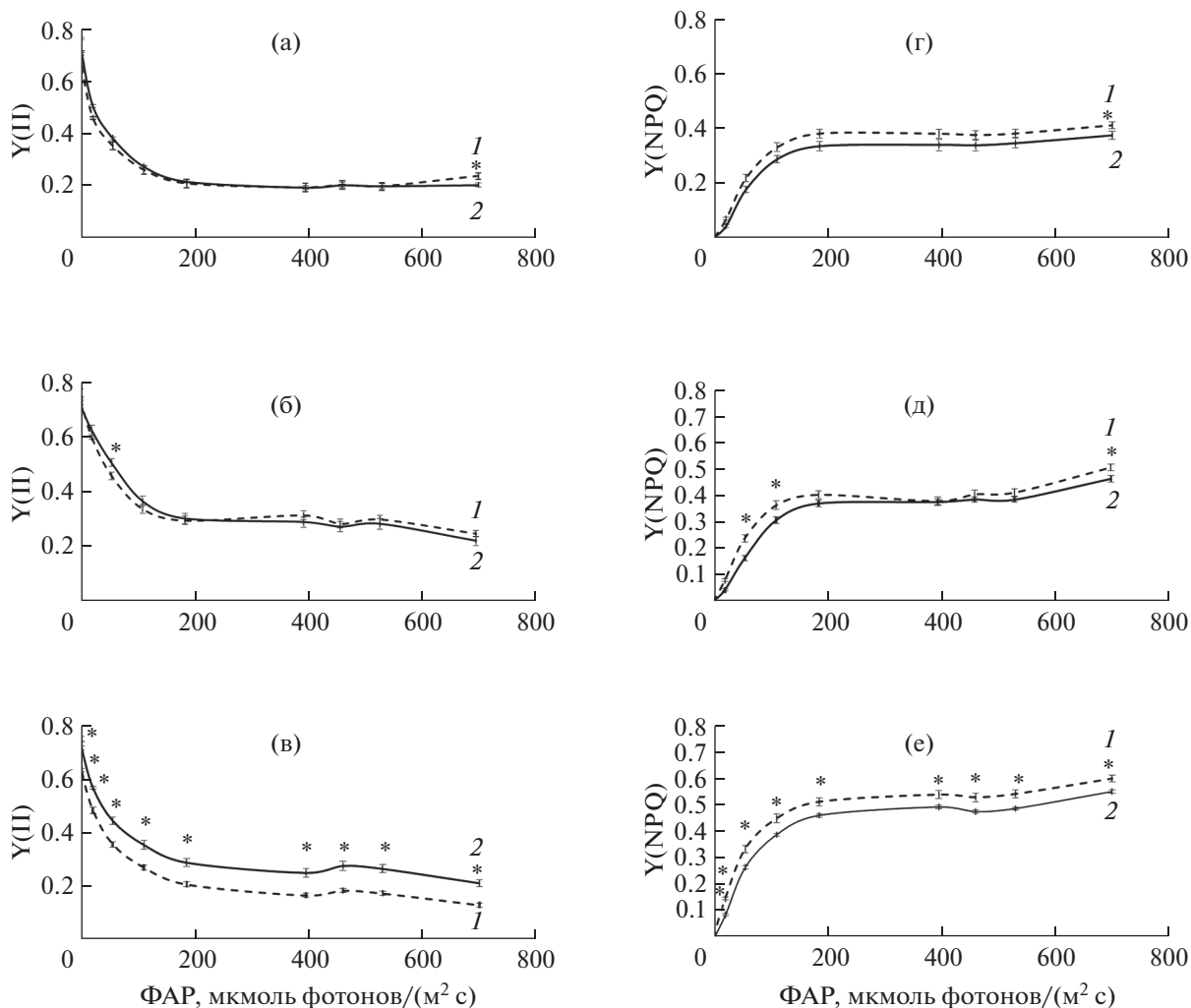


Рис. 4. Эффективный квантовый выход фотохимического тушения и квантовый выход нефотохимического тушения флуоресценции в листьях контрольных (пунктирная линия 1) и опытных (сплошная линия 2) вариантах *N. officinale* в первом эксперименте при 0.7 г/л NaCl: (а, г) – на 7 сут при $n = 3$; (б, д) – на 14 сут при $n = 6$, (в, е) – на 19 сут после переноса растений на контрольные и солевые растворы при $n = 6$. Показаны средние значения и ошибка среднего при $P < 0.05$. * – Значимые различия между контрольными и опытными вариантами.

процесс тушения флуоресценции хлорофилла. Такие изменения могли быть следствием уменьшения электрохимического градиента протонов на мембране тилакоида в опытном варианте. В свою очередь, снижение градиента могло быть связано как с разбавляющим действием NaCl, так и с увеличением скорости темновых реакций, использующих энергию АТФ [13].

В табл. 1 представлены результаты влияния NaCl на параметры световой кривой нециклического транспорта электронов в зависимости от концентрации соли и времени выращивания растений. Максимальный квантовый выход ФС II ($Y(II)_{\max}$) в контрольных и опытных вариантах варьировал слабо. Коэффициент вариации составил 3.8%. Средние значения показателя (0.755 ± 0.007) указывали на высокую эффективность захвата энергии возбуждения в открытых реакционных

центрах ФС II [4]. Достоверное снижение $Y(II)_{\max}$ регистрировали в эксперименте №1 после 19 сут выращивания растений в контрольном растворе.

Тангенс угла наклона касательной на начальном участке световой кривой (параметр α , табл. 1), характеризующий квантовую эффективность транспорта электронов через реакционный центр ФС II, и максимальная скорость нециклического транспорта электронов (ETR_{\max}) при световом потоке $701 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ варьировали в большей степени (16.8 и 15.4%, соответственно) по сравнению с $Y(II)_{\max}$. Различия параметра α зависели как от сроков вегетации, так и от концентрации NaCl в питательном растворе. При этом различия между соответствующими контрольными вариантами в трех экспериментах были существенно выше, чем между контролем и опытом в каждом из трех экспериментов. Относительно

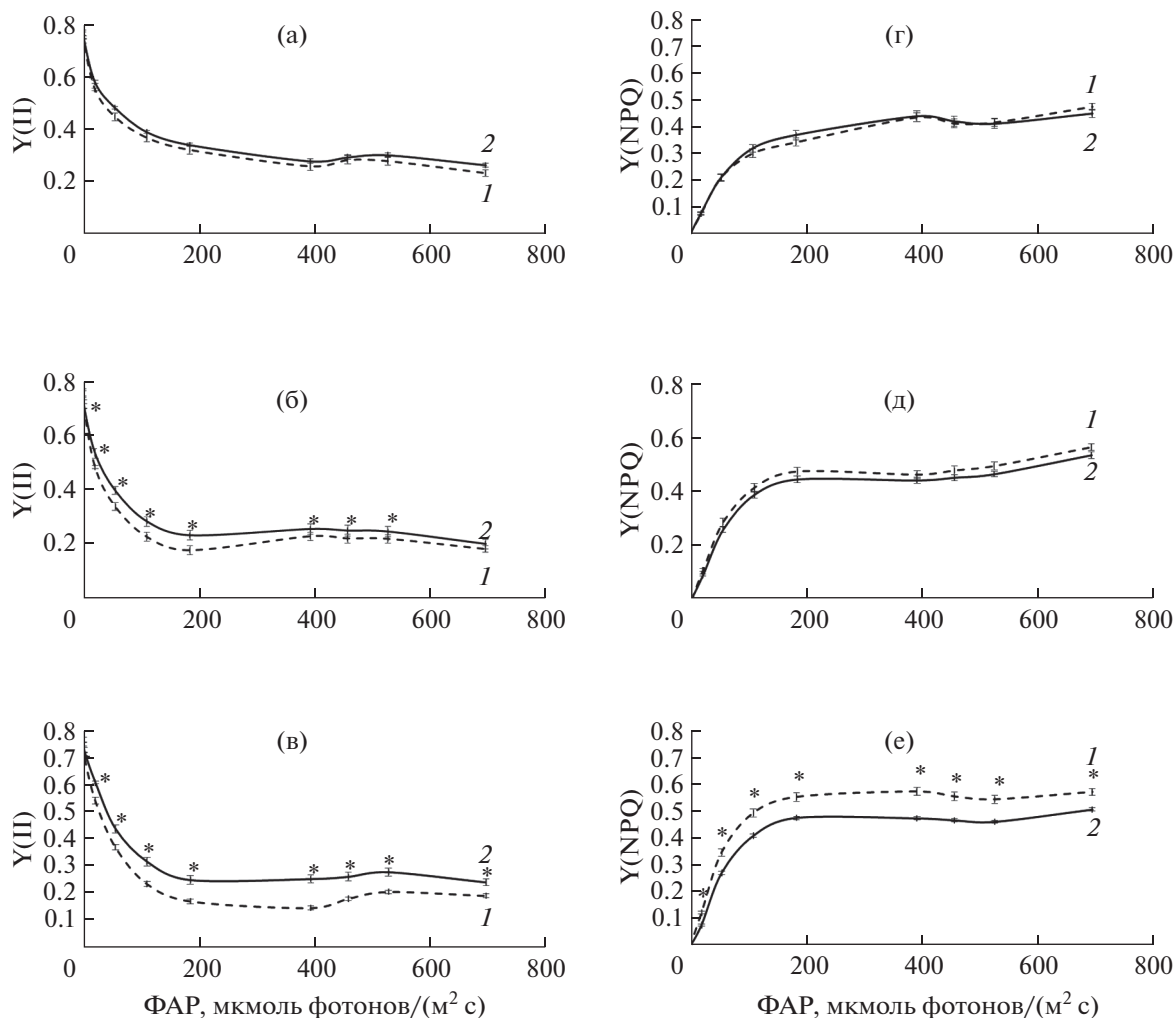


Рис. 5. Эффективный квантовый выход фотохимического тушения и квантовый выход нефотохимического тушения флуоресценции в листьях контрольных (пунктирная линия 1) и опытных (сплошная линия 2) вариантах *N. officinale* во втором эксперименте при 1.4 г/л NaCl: (а, г) – на 7 сут при $n = 3$; (б, д) – на 14 сут при $n = 6$ (в, е) – на 19 сут после переноса растений на контрольные и солевые растворы при $n = 6$. Показаны средние значения и ошибка среднего при $P < 0.05$. * – Значимые различия между контрольными и опытными вариантами.

низкие значения параметра ($\alpha < 0.15$) регистрировали на 7 сут вегетации в контрольном и опытном варианте эксперимента №1 (0.7 г/л NaCl) и эксперименте №3 (1.8 г/л NaCl), а также в контрольном варианте эксперимента №2 (1.4 г/л NaCl) на 14 сут действия NaCl. Влияние NaCl на параметры α и $E_{TR_{max}}$ в ряде случаев было сопряженным. NaCl снижал показатели в эксперименте №3 на 7 сут культивирования и увеличивал в эксперименте №2 на 14 и 19 сут культивирования (табл. 1). В экспериментах №1 и №3 после 14 сут, а также в эксперименте №3 после 19 сут NaCl вызывал снижение $E_{TR_{max}}$ при одинаковых значениях α .

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выращивания растений *N. officinale* в контролируемых условиях среды было показано,

что снижение АСНБ растений и поглощение Na в трех экспериментах свидетельствует о реакции растений на солевой стресс (рис. 2а–е). Аналогичные данные были получены рядом авторов. Так, у растений шпината (*Spinacia oleracea*) при 200 мМ NaCl (10.6 г/л NaCl) Robinson с соавт. [14] не обнаружили снижения продуктивности на 7 сут действия соли, что согласуется с результатами во всех опытных вариантах культивирования водяного кресс-салата (рис. 2г–е). На 14 сут отметили снижение продуктивности на 30% по сравнению с контролем [14], при этом в нашем эксперименте уже при 0.7 г/л NaCl продуктивность снизилась на 50% (рис. 2г–е). Guo с соавт. [15] сообщают, что уровни засоления 0.1 моль/л (5.8 г/л), 0.3 моль/л (17.5 г/л), 0.5 моль/л (29.2 г/л) среды (почва + перегной) у молодых растений не повлияли на продуктивность *Lycium ruthenicum*. Однако при более

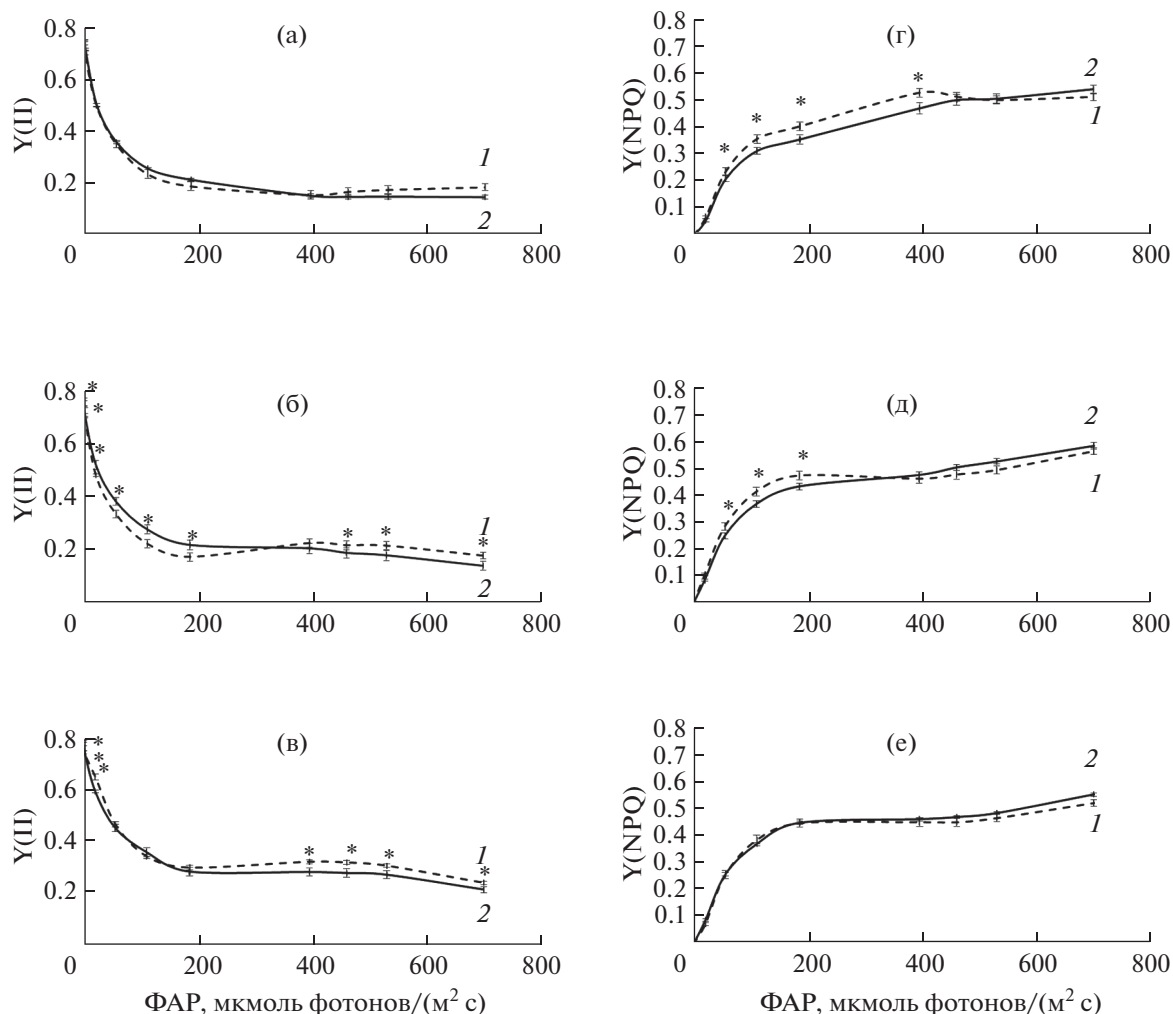


Рис. 6. Эффективный квантовый выход фотохимического тушения и квантовый выход нефотохимического тушения флуоресценции в листьях контрольных (пунктирная линия 1) и опытных (сплошная линия 2) вариантах *N. officinale* в третьем эксперименте при 1.8 г/л NaCl: (а, г) – на 7 сут при $n = 3$; (б, д) – на 14 сут при $n = 6$ (в, е) – на 19 сут после переноса растений на контрольные и солевые растворы при $n = 6$. Показаны средние значения и ошибка среднего. * – Значимые различия между контрольными и опытными вариантами.

длительном действии солевого фактора (21 сут) происходило снижение роста растений в 1.3 раза [15]. Интересные результаты были получены Kadouг с соавт. [16] при исследовании солеустойчивости водяного кресс-салата: растение относится к солеустойчивому виду и может выдерживать до 150 мМ NaCl (8.8 г/л); при данной концентрации NaCl отмечали задержку в росте растений. При 50 и 100 мМ NaCl (2.7, 5.9 г/л) авторы отмечали снижение продуктивности на 22 и 27%, соответственно. Возможной причиной различий в более высокой устойчивости к засолению растений в настоящей работе и в исследованиях Kadouг с соавт. [16] были другие условия культивирования: величина квантового потока в области ФАР – 150 мкмоль фотонов \times $m^{-2} \times c^{-1}$, фотопериод – 12 ч, длительность культивирования растений в условиях солевого стресса – 24 сут [16].

Одним из первых негативных действий засоления на растения является торможение роста. Последнее наблюдали у *N. officinale* во всех опытных вариантах на 14 и 19 сут после переноса растений на солевые растворы (рис. 2г–е). Торможение роста обуславливается влиянием различных факторов. Во-первых, это появление водного дефицита при действии ионов Na^+ и Cl^- на растения. Во-вторых, проявление токсического действия высоких концентраций хлористого натрия на корни растений при длительном действии данного фактора [17]. При совместном действии этих факторов возможно ускорение перехода растений в репродуктивную фазу, как описано в работе Генкеля [18], где автор отметил, что наименьшая солеустойчивость проявлялась у молодых растений; при формировании вегетативной биомассы солеустойчивость повышалась, а при переходе растений к бутонизации

происходило снижение солеустойчивости. При этом, если новые листья постоянно воспроизводились со скоростью большей, чем та, при которой старые листья отмирали, то у растения достаточно активной фотосинтетической поверхности, чтобы войти в репродуктивную фазу [17]. Возможно поэтому, начиная с молодых растений и до перехода их в репродуктивную фазу, происходит основное накопление ионов Na^+ и Cl^- в АСНБ на 19 сут после переноса растений на солевые растворы (рис. 2а–в).

При меньших концентрациях NaCl (0.7, 1.4 г/л) на 14–19 сут после переноса растений на питательные растворы не обнаружены достоверных различий по сравнению с контролем в содержании Хл *a*, Хл *b* и Кар, отношении Хл (*a* + *b*)/Кар и ССК (рис. 3а, б, г, д). При большей концентрации NaCl (1.8 г/л) в период 7–19 сут действия соли также не обнаружили достоверных различий в содержании Хл *a*, Хл *b* и Кар, ССК за исключением Хл (*a* + *b*)/Кар (рис. 3в, е). В целом изменения в фотосинтетических пигментах и продуктивности свидетельствуют об устойчивости изучаемого вида растений к условиям засоления, характерной для ЗЭС (0.7–1.8 г/л) [2].

Отмечено значительное превышение содержания фотосинтетических пигментов (Хл *a*, Хл *b* и Кар) на 7 сут выращивания при 0.7 г/л NaCl в 3.2, 4.5 и 3 раза по сравнению с контролем (рис. 3а) и аналогичен с результатами у солеустойчивых экотипов люцерны (*Medicago sativa* L.). А именно повышение суммы хлорофиллов у экотипов *M. sativa* обнаружено при засолении 100 мМ (5.9 г/л) и 200 мМ (10.6 г/л) NaCl [19]. Исходя из этого, можно предположить, что повышение содержания хлорофиллов связано с генетической устойчивостью определенного вида растений к засолению.

Снижение содержания фотосинтетических пигментов (Хл *a*, Хл *b* и Кар) при 0.7 г/л и 1.4 г/л NaCl между 7 и 14 сут (рис. 3а, б), как считают Hernandez с соавт. [20], связано с развитием окислительного стресса в результате образования активных форм кислорода, например, супероксидного и гидроксильного радикалов, а также с увеличением антиоксидантной активности за счет CuZn-супероксиддисмутазы в хлоропластах устойчивого к засолению сорта *Pisum sativa* (cv Granada) [20].

Для ЗЭС важно оценить не только устойчивость фотосинтетических пигментов к солевому стрессу, но и необходимо рассмотреть стабильность фотохимических реакций у *N. officinale*. В данной работе выявили достоверные изменения в световых зависимостях $Y(II)$ и $Y(NPQ)$ в листьях растений на 14 сут выращивания при засолении 1.4 г/л (рис. 5в) и на 19 сут при засолении 0.7 и 1.4 г/л (рис. 4в, е, рис. 5в, е). При этом характер световых кривых $Y(II)$ и $Y(NPQ)$ был одинаков как у контрольных, так и у опытных растений при

выращивании на растворах, содержащих 0.7, 1.4 и 1.8 г/л NaCl (рис. 4а–в, 5а–в, 6а–в). Ряд авторов считают, что при действии 100 мМ (5.9 г/л) и 150 мМ (8.9 г/л) NaCl на гликофит *Arabidopsis* происходит снижение световой кривой квантового выхода по сравнению с контролем. Кроме того, повышение данного показателя у опытных вариантов, выращенных при 150 мМ (8.9 г/л) и при более длительном засолении (14 дней после переноса растений на солевой раствор), отмечали как в гликофите *Arabidopsis*, так и у солеустойчивого *Thellungiella*. При этом, из представленных авторами рисунков видно, что кинетика световых кривых $Y(II)$ контрольных и опытных растений у *Arabidopsis* не отличалась [21], как и у исследуемого нами *N. officinale* (рис. 4а–в, 5а–в, 6а–в). Robinson с соавт. [14] отметили, что индукционные кривые флуоресценции контрольных растений *S. oleracea* не отличались от опытных, как и в вариантах с засолением 0.7 г/л на 7 и 14 сут после переноса растений на солевые растворы (рис. 4а–б) в нашей работе. Эти же авторы также установили, что даже при 200 мМ (10.6 г/л) NaCl первичные фотосинтетические процессы в *S. oleracea* не нарушаются [14]. Belkhdja с соавт. [22] обнаружили, что при засолении 100 мМ (5.9 г/л) значения $Y(II)$ на световой кривой были выше, чем в варианте без засоления у *Hordeum vulgare* сорта Albasete, что согласуется с нашими данными по световой кривой $Y(II)$ на 19 сут выращивания при 0.7 и 1.4 г/л NaCl (рис. 4в, 5в) и на 14 сут в варианте 1.4 г/л NaCl (рис. 5б). Предполагается, что при солевом стрессе снижается протонный градиент за счет повышения проницаемости мембран [17] и при этом включается защитный механизм, связанный с быстрым восстановлением Q_A [23], а остальная энергия, вероятно, диссипирует в тепло через нефотохимическое тушение флуоресценции.

Увеличение α на 14 сут выращивания при засолении 1.4 г/л и в вариантах с засолением 0.7 и 1.4 г/л на 19 сут по сравнению с контролем (табл. 1), вероятно, связано с устойчивостью растений к засолению и нормальной работой ФС II в условиях стресса. Отметим, что значения $Y(II)_{\max}$ на 7, 14 и 19 сут выращивания контрольных растений находились в диапазоне от 0.70 до 0.77, кроме значений контроля на 19 сут в третьем эксперименте – 0.67 (табл. 1), а во всех опытных вариантах были выше – в диапазоне от 0.73 до 0.79, что свидетельствовало о сохранении фотохимической активности ФС II в условиях стресса [24]. Высокая фотосинтетическая активность у растений сем. *Brassicaceae* в условиях солевого стресса может быть связана как с транспортом и накоплением NaCl и работой антипортера Na^+/H^+ в вакуоли [3, 25], так и со снижением содержания галактолипидов в мембранах хлоропласта [26].

Известно, что реальное обеспечение всеми необходимыми человеку растительными продуктами возможно только за счет комплекса культур, что достигается для ЗЭС разработкой многокомпонентного звена высших растений [27 с. 38]. Ранее нами для возврата NaCl человеку в условиях ЗЭС было предложено растение *S. europaea*. Было рассчитано количество растений *S. europaea* (175 шт) и их АСНБ (1750 г), необходимые для того, чтобы удовлетворить суточную потребность человека в NaCl (12 г) [12]. *S. europaea* является устойчивой к засолению культурой и может культивироваться при 10 г/л NaCl. Известно, что *S. europaea* содержит больше необходимых человеку жирных кислот (линолевою, докозановую и тетракозановую) по сравнению с *N. officinale*. В то же время *N. officinale* не только достаточно солеустойчивый гликофит, но и источник дополнительных жирных кислот (гексадекатриеновой, вакценовой, гексакозановой) и углеводов, необходимых человеку. Кроме этого *N. officinale* отличается более быстрым ростом, по сравнению с *S. europaea*. Поэтому представляется целесообразным совместное использование этих двух видов растений для обеспечения человека NaCl в ЗЭС. Можно определить количество растений *N. officinale* и их АСНБ в перерасчете на площадь для того, чтобы обеспечить человека половиной нормы (6 г) от суточной потребности в NaCl, т. к. остальную часть NaCl можно получить за счет *S. europaea*. Из наших данных известно, что *N. officinale* может поглощать до 1.5% Na при средней АСНБ одного растения, равной 3 г. Если исходить из суточной нормы потребления и выделения человеком NaCl за счет *N. officinale*, равной 6 г, что соответствует примерно 2.4 г Na, ежедневно необходимо будет убирать и включать в рацион питания около 157 г АСНБ растений *N. officinale*. При длительности засоления до 19 сут, для утилизации всего Na, выделенного за этот период человеком, потребуется вырастить около 50 растений *N. officinale*. В наших экспериментах мы выращивали по 3 растения на площади 0.032 м². Из этого следует, что для ЗЭС одновременное выращивание растений *N. officinale* и *S. europaea* на площади 3 м² может обеспечить NaCl одного человека.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях ЗЭС, достигнутая продуктивность *N. officinale*, благодаря устойчивости его фотосинтетического аппарата к засолению, может служить дополнительным источником NaCl для человека. Установлено, что засоление сопровождалось накоплением натрия в АСНБ *N. officinale* на 7, 14 и 19 сут после переноса растений на солевые растворы. Показано, что в зависимости от уровня засоления питательного раствора и длительности его действия усиливалось ингибирование накопления АСНБ у растений *N. officinale*, за исключением растений, выращенных в течение

7 сут после переноса на солевые растворы. Ограничения применения водяного кресс-салата в ЗЭС могут быть связаны с длительностью культивирования *N. officinale* свыше 19 сут и при концентрации NaCl свыше 1.8 г/л.

Данная работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. по теме № 56.1.4 “Оценка устойчивости ценозов высших растений замкнутых экологических систем, включающих человека, к выращиванию на питательных средах из минерализованных органических отходов”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ushakova S.A., Kovaleva N.P., Gribovskaya I.V., Dolgu-shev V.A., Tikhomirova N.A. Effect of NaCl concentration on productivity and mineral composition of *Salicornia europaea* as a potential crop for utilization NaCl in LSS // Adv. Space Res. 2005. V. 36. P. 1349. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2004.09.017>
2. Тихомирова Н.А., Павлова А.М., Ушакова С.А., Труфонов С.В., Грибовская И.В., Тихомиров А.А. Продукционные характеристики зеленных растений при выращивании на жидких продуктах переработки экзометаболитов человека применительно к биологическо-технической системе жизнеобеспечения // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. С. 51. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2017-51-1-51-57>
3. Srivastava A.K., Srivastava S., Lokhande V.H., D'Souza S.F., Lokhande V. H., Suprasanna P. Salt stress reveals differential antioxidant and energetics responses in glycophyte (*Brassica juncea* L.) and halophyte (*Sesuvium portulacastrum* L.) // Front. Environ. Sci. 2015. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00019>
4. Kitajima M., Butler W.L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 376. P. 105. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90209-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90209-1)
5. Креславский В.Д., Карпенциер Р., Климов В.В., Мурата Н., Аллахвердиев С.И. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу // Биологические мембраны. 2007. Т. 24. С. 195.
6. Ушакова С.А., Тихомиров А.А., Величко В.В., Головки Т.К., Табаленкова Г.Н., Захожий И.Г., Мамусевич В.В. Сравнительная оценка продуктивности зеленных культур, возможных представителей звена высших растений биорегенеративных систем жизнеобеспечения // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2010. Т. 44. С. 42.
7. Anishchenko O.V., Tolomeev A.P., Ivanova E.A., Drobotov A.V., Kolmakova A.A., Zuev I.V., Gribovskaya I.V. Accumulation of elements by submerged (*Stuckenia pecti-*

- nate* (L.) Börner) and emergent (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) macrophytes under different salinity levels // *PPB*. 2020. V. 154. P. 328. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.019>
8. *Wintermans I.F.G.M., De Mots A.* Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol // *Biochim. Biophys. Acta*. 1965. V. 109. P. 448. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(65\)90170-6](https://doi.org/10.1016/0926-6585(65)90170-6)
 9. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enzymology* / Eds. Colowick S.P., Kaplan N.O. San Diego: Academic Press, 1987. P. 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
 10. *Genty B., Briantais J.M., Baker N.R.* The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. V. 990 P. 87. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
 11. *Platt T., Gallegos C.L., Harrison W.G.* Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton // *J. Mar. Res.* 1980. V. 38 P. 687.
 12. *Тухомирова Н.А.* Влияние внешних факторов среды на газообмен и продуктивность растений *Salicornia europaea* L., как возможной составной части фототрофного звена системы жизнеобеспечения: Автореф. дисс ... канд. биол. наук. Т.: ТГУ, 2006. 128 с.
 13. *Kramer D.M., Johson G., Kiirats O., Edwards G.* New fluorescence parameters for determination of Q_a redox state and excitation energy fluxes // *Photosyn. Res.* 2004. V. 79. P. 209. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d>
 14. *Robinson S.R., John W., Downton S., Millhouse J.A.* Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach // *Plant Physiol.* 1983. V. 73. P. 238 <https://doi.org/10.1104/pp.73.2.238>
 15. *Guo Y.-Y., Nie H.-S., Yu H.-Y. Kong D.-S., Wu J.-Y.* Effect of salt stress on the growth and photosystem II photochemical characteristics of *Lycium ruthenicum* Murr. seedlings // *Photosynthetica*. 2019. V. 57. P. 564. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.068>
 16. *Kaddour R., Draoui E., Baâtour O. Mahmoudi H., Tarchoune I., Nasri N., Gruber M., Lachaâl M.* Assessment of salt tolerance of *Nasturtium officinale* R. Br. using physiological and biochemical parameters // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 3427. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1377-8>
 17. *Munns R.* Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses // *Plant Cell Environ.* 1993. V. 16. P. 15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00840.x>
 18. *Генкель П.А.* Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. Москва: Наука, 1982. 280 с.
 19. *Monirifar H., Barghi M.* Identification and selection for salt tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes via physiological traits // *Notulae Sci. Biol.* 2009. V. 1. P. 63. <https://doi.org/10.15835/nsb.1.1.3498>
 20. *Hernandez J.A., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F.* Tolerance of pea plants (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. P. 853. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3040.2000.00602.x>
 21. *Stepien P., Johnson G.N.* Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: Role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink // *Plant Physiol.* 2009. V. 149. P. 1154. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132407>
 22. *Belkhdja R., Morales F., Abadia A., Gomez-Aparisi J., Abadia J.* Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Physiol.* 1994. V. 104. P. 667. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.667>
 23. *Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // *J. Bot.* 2012. P. 1. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
 24. *Souza R.P., Machado E.C., Silva J.A.B., Lagoa A.M.M.A., Silveira J.A.G.* Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery // *Environ. Exp. Bot.* 2004. V. 51. P. 45. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(03)00059-5)
 25. *Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E.* Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis* // *Science*. 1999. V. 285. P. 1256. <https://doi.org/10.1126/science.285.5431.1256>
 26. *Müller M., Santarius K.A.* Changes in chloroplast membrane lipids during adaptation of barley to extreme salinity // *Plant Physiol.* 1978. V. 62. P. 326. <https://doi.org/10.1104/pp.62.3.326>
 27. Замкнутая система: человек – высшие растения / Под ред. Г.М. Лисовского. Новосибирск: Наука, 1979. 160 с.

УДК 581.1

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ИНВЕРТАЗ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ *Nicotiana tabacum* L. И *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) К ГИПОТЕРМИИ

© 2021 г. В. Н. Попов^а, *, Н. В. Астахова^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: vnpopov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.12.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 01.01.2021 г.

Исследовали изменение активности инвертаз при закаливании теплолюбивых растений *Nicotiana tabacum* L. и холодостойких – *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) к гипотермии. Показано, что при закаливании у табака наблюдалось 20% снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз и почти двукратное увеличение активности инвертазы клеточной стенки. У арабидопсиса за время закаливания происходило более чем двукратное увеличение активности всех трех типов инвертаз. В процессе закаливания у табака наблюдался 20% рост содержания сахаров. При этом доли сахарозы и гексоз (фруктоза и глюкоза) как до, так и после закаливания были равными и составляли примерно по 50%. В растениях арабидопсиса за время закаливания содержание сахаров возрастало в 2.5 раза, при этом происходило уменьшение доли сахарозы в общей массе сахаров (с 44 до 24%) и увеличение доли гексоз (с 56 до 76%). Сделано предположение, что повышение активности инвертазы клеточной стенки у обоих видов исследуемых растений тормозило отток ассимилятов и создавало предпосылки для накопления продуктов фотосинтеза в клетках мезофилла листа у растений табака и арабидопсиса. Снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз у *N. tabacum* ограничивало образование гексоз в клетках и снижало эффективность закаливания растений табака. Более чем двукратный рост содержания растворимых углеводов у арабидопсиса достигался, главным образом, за счет накопления гексоз, в результате повышения активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз, что обеспечивало высокую эффективность закаливания *A. thaliana* к гипотермии.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* L., *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), гипотермия, закаливание, фотосинтез, сахара, инвертазы

DOI: 10.31857/S0015330321050146

ВВЕДЕНИЕ

Гипотермия является одним из наиболее распространенных экологических факторов, влияющих на метаболизм растений и определяющих их продуктивность и географическое распространение на планете. Растения способны существенно повышать устойчивость к повреждающему действию холода и мороза в процессе закаливания, которое происходит при экспозиции растений в условиях низких, но не повреждающих температур [1].

Накопление сахаров при гипотермии – одна из наиболее хорошо изученных защитных реакций растений, которая реализуется в процессе закаливания [2]. Сахароза, глюкоза и фруктоза служат основным источником энергии и предшественниками при синтезе других веществ с защитным эффектом, выполняют осморегуляторную, крио-

протекторную, антиоксидантную и сигнальную функции [3].

Реализация защитных свойств сахаров при гипотермии во многом зависит от активности гидролитического фермента инвертазы (β -фруктофуранозидаса, КФ 3.2.1.26), которая расщепляет основную транспортную форму сахаров – сахарозу – на глюкозу и фруктозу [4]. В растениях имеется три типа инвертаз, различающихся по субклеточной локализации, растворимости и рН оптимуму. Локализованная в клеточной стенке и связанная с ней ионными связями инвертаза, а также растворимая вакуолярная форма фермента, проявляют максимальную активность при рН от 4.5 до 5.0. Растворимая инвертаза, локализованная в цитоплазме растительной клетки, имеет рН оптимум в области 7.0–7.8 [4].

В литературе имеются многочисленные и довольно разнообразные данные, касающиеся изменения активности инвертаз в условиях низких

Сокращения: ФС II – фотосистема II, НХК1 – гексокиназа 1.

температур. Как правило, участие инвертаз в закаливании растений к гипотермии связывают с мобилизацией растворимых углеводов, необходимых для формирования повышенной холодоустойчивости. Так, в работе [5] было показано, что двукратное увеличение активности инвертазы клеточной стенки при закаливании *Solanum tuberosum* L. приводило к существенному росту содержания сахаров внутриклеточной и апопластной локализации и к повышению устойчивости растений картофеля к гипотермии. Растения арабидопсиса, трансформированные геном *CsINV5* вакуолярной инвертазы из *Camellia sinensis* L., отличались от контрольных растений измененным соотношением сахара/гексозы, увеличенным содержанием гексоз и повышенной устойчивостью к гипотермии [6].

Показано участие вакуолярной инвертазы в стабилизации фотосинтеза у растений *A. thaliana* в условиях низких температур [7]. Авторы этой работы установили, что имеющие пониженную активность вакуолярной инвертазы мутанты арабидопсиса *inv4*, отличались от растений дикого типа более низкими значениями максимального квантового выхода ФС II и скорости ассимиляции CO₂ при гипотермии. При этом увеличение активности цитоплазматической инвертазы не могло компенсировать дефицит активности вакуолярной инвертазы [7].

Имеются данные о вовлечении инвертаз в процесс защиты растений от окислительного стресса. Так, мутанты *A. thaliana* по генам, кодирующим цитоплазматическую инвертазу, характеризовались повышенным уровнем экспрессии генов, участвующих в защите от окислительного стресса [8]. В другой работе показано, что растения *S. tuberosum*, трансформированные геном инвертазы дрожжей апопластной локализации, в условиях гипотермии имели повышенное содержание сахаров и значительно меньшую интенсивность перекисного окисления липидов по сравнению с нетрансформированными растениями [9].

Помимо работ, описывающих существенный вклад инвертаз в закаливание растений к гипотермии, имеются публикации, в которых авторы отрицают участие инвертаз в этом процессе. Так, было показано значительное снижение активности вакуолярной инвертазы в процессе закаливания *Brassica oleracea* L. При этом содержание сахаров, особенно глюкозы и фруктозы, в листьях капусты возрастало в 3–4 раза. На основе этих данных авторы сделали вывод о том, что вакуолярная инвертаза не играет существенной роли в аккумуляции сахаров и в формировании устойчивости растений капусты к низким температурам [10].

Таким образом, представленные в литературе данные об участии инвертаз в закаливании растений

к гипотермии сильно различаются в зависимости от видовой специфики исследуемых растений и условий проведения экспериментов. Кроме того, значительное число публикаций не содержит данных об активности всех типов инвертаз имеющих в клетке, что затрудняет анализ роли этих ферментов в формировании устойчивости к гипотермии.

Цель работы – исследование изменения активности вакуолярной, цитоплазматической и связанной с клеточной стенкой инвертаз у теплолюбивых (*Nicotiana tabacum* L.) и холодостойких (*Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.)) растений в связи с особенностями аккумуляции растворимых углеводов при закаливании этих растений к гипотермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектами исследования являлись теплолюбивые растения табака (*Nicotiana tabacum* L., сортотип Samsun) и холодостойкие растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), экотип Columbia). Растения выращивали в вазонах с почвой в камерах фитотрона ИФР РАН при следующих условиях: табак – температура 22°C, 16-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м² с), арабидопсис – температура 22°C, 8-часовой фотопериод и освещенность 100 мкмоль/(м² с). Выбор 8-часового режима светового дня для арабидопсиса обусловлен тем, что он относится к длиннодневным растениям и при использовании короткого дня достигает необходимой для исследований биомассы розетки, не переходя в фазу цветения. Для опытов использовали растения в возрасте шести недель. Закаливание растений проводили в климатической камере KBW – 240 (“Binder”, Германия) в течение 5 сут при температуре 8°C для табака и 2°C для арабидопсиса, оставляя другие условия выращивания без изменений. Данные режимы закаливания были подобраны в ходе предварительных опытов. В качестве контроля использовали растения, не подвергнутые воздействию закаливающей температуры.

Устойчивость растений к гипотермии. Для оценки устойчивости *N. tabacum* и *A. thaliana* к низким температурам незакаленные и закаленные растения обоих видов тестировали в климатической камере MIR–153 (“Sanyo”, Япония) в течение 1 сут при температурах от –1 до –4°C для табака и при температурах от –1 до –8°C для арабидопсиса. После промораживания растения переносили в оптимальные для вегетации условия на одну неделю. Выживаемость растений рассчитывали как количество выживших растений в % от общего

количества растений подвергнутых тестированию при каждой температуре.

Определение содержания сахаров. Навески листьев *N. tabacum* и *A. thaliana* (~500 мг) фиксировали 96% кипящим этанолом. Ткань растирали в фарфоровой ступке и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80% этанолом. В полученных экстрактах определяли содержание глюкозы – глюкозооксидазным методом, сахарозы и фруктозы – по методу Рое [11]. Полученные результаты выражали в мг/г сухой массы.

CO₂-газообмен растений. Изучение CO₂-газообмена растений *N. tabacum* и *A. thaliana* проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Германия) при 22°C (контроль), 8°C (закаленные растения табака) и 2°C (закаленные растения арабидопсиса), т.е. при температурах, идентичных температурам вегетации и холодового закаливания. Измерения газообмена включали определение скорости видимой ассимиляции CO₂ и темнового дыхания, которые выражали в мг CO₂/(г сухой массы ч). На основе этих параметров рассчитывали отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание [12].

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры хлоропластов. Для получения препаратов для микроскопии использовали фрагменты из срединной части хорошо развитых листьев *N. tabacum* и *A. thaliana*. Растительный материал фиксировали в течение 4 ч 2.5% глутаровым альдегидом в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4) при температуре 4°C. После 4-кратной промывки фосфатным буфером материал фиксировали 1% раствором OsO₄, обезвоживали последовательно растворами этанола в возрастающих концентрациях и ацетоном, а затем заливали в Ерон – 812. Ультратонкие срезы листьев растений получали на ультрамикротоме LKB3 (“LKB”, Швеция). Срезы просматривали при помощи электронного микроскопа LIBRA120 (“ZEISS”, Германия) при увеличении ×4000. Измерение площади крахмальных зерен в хлоропластах проводили при помощи встроенного программного обеспечения электронного микроскопа LIBRA120 (“ZEISS”, Германия), при этом просматривали не менее 100 хлоропластов каждого варианта [13].

Определение активности инвертаз. Навески листьев *N. tabacum* и *A. thaliana* (по 1 г) растирали в фарфоровой ступке на холоде в фосфатно-цитратной буферной смеси рН 7.0, состоящей из 0.1 М лимонной кислоты и 0.2 М Na₂HPO₄·2H₂O. Полученный гомогенат для удаления сахаров, содержащихся в тканях, диализовали 20 ч при температуре 4°C против разбавленной в 10 раз фосфатно-цитратной буферной смеси. Затем гомогенат центрифугировали 20 мин при 18600 g при помощи цен-

трифуги K24D (“MLW”, Германия). Супернатант использовали для определения активности растворимых вакуолярной и цитоплазматической инвертаз. Осадок трижды промывали разбавленным буфером, центрифугируя суспензию каждый раз при 200 g и получая фракцию клеточных стенок, которую использовали для определения активности инвертазы клеточной стенки. Инкубационная смесь общим объемом 0.5 мл содержала 0.2 мл фракции фермента, 0.3 мл буфера с сахарозой, конечная концентрация которой в смеси составляла 150 мМ. Для определения активности кислых инвертаз (вакуолярная инвертаза и инвертаза клеточной стенки) использовали 1 М ацетатный буфер (рН 4.7), для щелочной (цитоплазматическая инвертаза) – фосфатно-цитратную буферную смесь (рН 7.5). Время инкубации составляло 1 ч, при температуре 30°C. Об активности фермента судили по количеству образовавшейся в инкубационной среде глюкозы, которую определяли глюкозооксидазным методом [14].

Во всех экспериментах биологическая повторность измерений была 6-кратной, аналитическая 3–4-кратной. Каждый эксперимент повторяли не менее 3–4 раз. Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На гистограммах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями оценена по *t*-критерию Стьюдента для 95% уровня значимости ($P < 0.05$). Достоверно различающиеся между собой величины обозначены разными надстрочными буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Устойчивость растений N. tabacum и A. thaliana к гипотермии

Об устойчивости исследуемых растений к гипотермии судили по их выживаемости после промораживания при различных температурах. Из данных представленных в табл. 1 видно, что незакаленные растения табака после промораживания при температуре –1°C полностью сохраняли свою жизнеспособность. При снижении температуры до –2°C выживаемость *N. tabacum* составляла 57%, а после –3°C все незакаленные растения погибли. Закаленные растения табака успешно выдерживали температуру –2°C (выживаемость 100%). При температуре –3°C выживало 65% растений, а при –4°C все растения погибли.

Все незакаленные растения арабидопсиса выжили при температурах промораживания вплоть до –3°C. При температуре –4°C выживаемость снижалась почти в 2 раза (до 55%), а при –5°C падала до нуля. После закаливания растения арабидопсиса демонстрировали 100% выживаемость при темпе-

Таблица 1. Выживаемость (%) незакаленных и закаленных растений табака и арабидопсиса после промораживания в течение 1 сут

Температура промораживания	Выживаемость, %			
	<i>Nicotiana tabacum</i> L.		<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)	
	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
-1°C	100	100	100	100
-2°C	57 ± 9	100	100	100
-3°C	0	65 ± 8	100	100
-4°C	0	0	55 ± 5	100
-5°C	0	0	0	100
-6°C	0	0	0	100
-7°C	0	0	0	45 ± 6
-8°C	0	0	0	0

Таблица 2. Изменение содержания сахаров в листьях растений табака и арабидопсиса при закаливании к гипотермии

Вариант опыта	Содержание сахаров, мг/г сухой массы			
	фруктоза	глюкоза	сахароза	сумма сахаров
<i>Nicotiana tabacum</i> L.				
Незакаленные растения	1.8 ± 0.1 ^a	5.7 ± 0.4 ^a	8.0 ± 0.4 ^a	15.5 ± 0.8 ^a
Закаленные растения	2.4 ± 0.2 ^b	7.5 ± 0.3 ^b	9.7 ± 0.5 ^b	19.6 ± 0.9 ^b
<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)				
Незакаленные растения	1.4 ± 0.3 ^a	11.8 ± 0.9 ^c	10.5 ± 0.6 ^b	23.7 ± 1.7 ^c
Закаленные растения	4.9 ± 0.5 ^c	41.1 ± 2.2 ^d	14.3 ± 0.5 ^c	60.3 ± 3.4 ^d

Примечание. В каждом столбце величины, достоверно различающиеся при $P < 0.05$, обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

ратурах до -6°C. Промораживание при -7°C вызывало снижение выживаемости *A. thaliana* до 45%, а при -8°C – до нуля.

*Содержание сахаров в растениях
N. tabacum u A. thaliana*

Данные по изменению содержания сахаров в листьях растений табака и арабидопсиса при низкотемпературном закаливании представлены в табл. 2. В процессе закаливания у табака происходил ~20% рост содержания сахаров (с 15.5 до 19.6 мг/г сухой массы), который достигался за счет почти равномерного увеличения содержания фруктозы, глюкозы и сахарозы. При этом соотношение разных форм сахаров за время низкотемпературного закаливания практически не изменялось (табл. 3). Доли сахарозы и гексоз (фруктоза и

глюкоза) как до, так и после закаливания были равными и составляли примерно по 50%.

В растениях арабидопсиса за время закаливания суммарное содержание сахаров возрастало в 2.5 раза (с 23.7 до 60.3 мг/г сухой массы). Такой результат был получен за счет увеличения содержания сахарозы почти на 40%, а фруктозы и глюкозы – в 3.5 раза. При закаливании *A. thaliana* значительно изменялось соотношение разных форм сахаров в сторону уменьшения доли сахарозы в общей массе сахаров (с 44 до 24%) и увеличения доли гексоз (с 56 до 76%).

CO₂-газообмен растений N. tabacum u A. thaliana

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что у обоих видов исследуемых растений, параметры CO₂-газообмена в процессе зака-

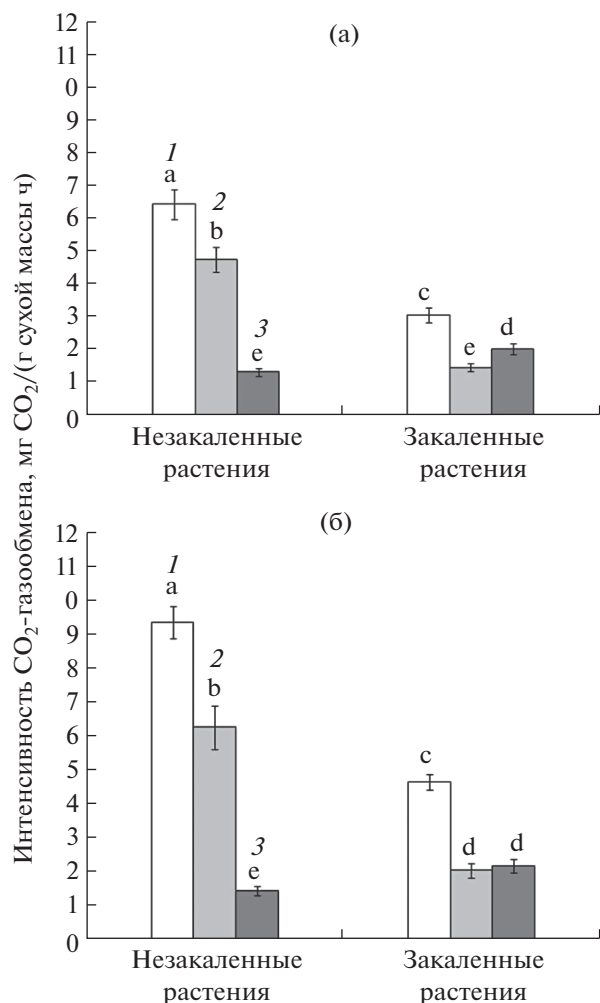


Рис. 1. Изменение параметров CO_2 -газообмена растений табака (а) и арабидопсиса (б) при закаливании к гипотермии (1 – видимый фотосинтез, 2 – темновое дыхание, 3 – отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание). Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

ливания к гипотермии изменялись практически одинаково (рис. 1а, б). Интенсивность видимого фотосинтеза снижалась в 2 раза: с 6.5 до 3.1 мг $\text{CO}_2/\text{г}$ сухой массы ч у табака, и с 9.4 до 4.7 мг $\text{CO}_2/\text{г}$ сухой массы ч у арабидопсиса. Интенсивность темнового дыхания уменьшалась примерно в 3 раза: с 4.8 до 1.5 мг $\text{CO}_2/\text{г}$ сухой массы ч у табака, и с 6.3 до 2.1 мг $\text{CO}_2/\text{г}$ сухой массы ч у арабидопсиса. Такие изменения CO_2 -газообмена приводили к 1.5-кратному росту отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание у обоих видов.

Площадь крахмальных зерен в хлоропластах *N. tabacum* и *A. thaliana*

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что в процессе закаливания *N. tabacum* и *A. thaliana* наблюдались существенные изменения как площади, так и количества крахмальных зерен в хлоропластах (рис. 2, 3). У табака площадь одного крахмального зерна и суммарная площадь крахмальных зерен в хлоропласте увеличивалась более чем в 2 раза (табл. 4). В результате таких изменений доля крахмальных зерен от площади хлоропласта возрастала с 24 до 46%.

У арабидопсиса, в отличие от табака, площадь одного крахмального зерна за время закаливания не изменялась, но за счет увеличения количества крахмальных зерен (рис. 3), суммарная площадь крахмальных зерен в хлоропласте возрастала почти на 25% (табл. 4). Это приводило к увеличению доли крахмальных зерен, рассчитанной от площади среза хлоропласта с 12 до 16%.

Активность инвертаз в растениях *N. tabacum* и *A. thaliana*

Данные по изменению активности инвертаз в листьях растений табака и арабидопсиса при низ-

Таблица 3. Изменение соотношения разных форм сахаров в листьях растений табака и арабидопсиса при закаливании к гипотермии

Вариант опыта	Содержание сахаров, % от суммы сахаров			
	фруктоза	глюкоза	сумма гексоз	сахароза
<i>Nicotiana tabacum</i> L.				
Незакаленные растения	12 ± 1 ^a	37 ± 3 ^a	49 ± 4 ^a	51 ± 3 ^a
Закаленные растения	12 ± 1 ^a	38 ± 2 ^a	50 ± 4 ^a	50 ± 3 ^a
<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)				
Незакаленные растения	6 ± 1 ^b	50 ± 4 ^b	56 ± 5 ^a	44 ± 3 ^a
Закаленные растения	8 ± 1 ^b	68 ± 4 ^c	76 ± 5 ^b	24 ± 1 ^b

Примечание. В каждом столбце величины, достоверно различающиеся при $P < 0.05$, обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

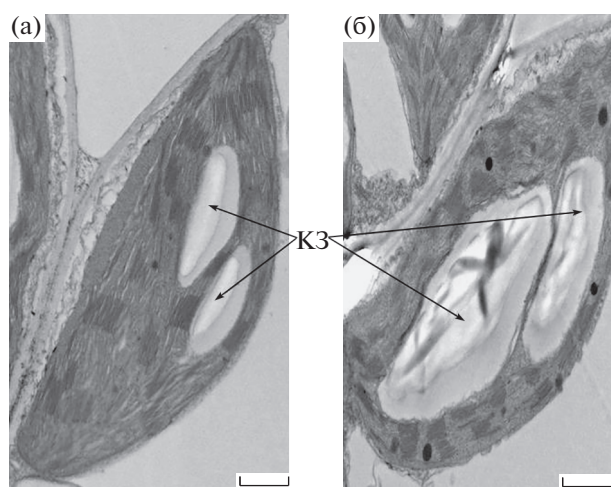


Рис. 2. Изменение площади и количества крахмальных зерен в хлоропластах растений табака при закаливании к гипотермии (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

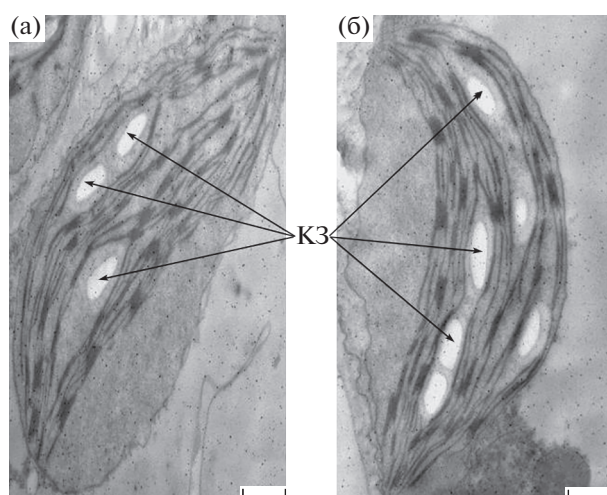


Рис. 3. Изменение площади и количества крахмальных зерен в хлоропластах растений арабидопсиса при закаливании к гипотермии (а – незакаленные растения, б – закаленные растения). КЗ – крахмальное зерно. Масштабная шкала – 1 мкм.

котемпературном закаливании представлены на рисунке 4. В процессе закаливания у табака наблюдалось ~20% снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз и почти двукратное увеличение активности инвертазы клеточной стенки (рис. 4а).

В листьях арабидопсиса за время закаливания к гипотермии происходило более чем двукратное увеличение активности всех трех типов инвертаз (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Закаливание растений приводит к формированию повышенной устойчивости к гипотермии, позволяющей растениям выдерживать более низ-

кие повреждающие температуры по сравнению с незакаленными растениями [15]. Одним из наиболее часто используемых методов, позволяющих достоверно оценить эффективность закаливания, является метод прямого промораживания целых растений с последующей оценкой их выживаемости [16]. Полученные нами данные показали, что растения *N. tabacum* и *A. thaliana* в результате закаливания повышали свою устойчивость к отрицательным температурам, хотя и в разной степени. Если судить по температуре выживания всех тестируемых растений (выживаемость 100%), то можно констатировать, что в результате закаливания растения табака повышали свою устойчивость к морозу на 1°C (с –1 до –2°C). Эффективность закаливания *A. thaliana* оказалась значительно выше. Закален-

Таблица 4. Изменение площади крахмальных зерен в хлоропластах растений табака и арабидопсиса при закаливании к гипотермии

Измеряемый параметр	<i>Nicotiana tabacum</i> L.		<i>Arabidopsis thaliana</i> Heynh. (L.)	
	незакаленные растения	закаленные растения	незакаленные растения	закаленные растения
Площадь одного крахмального зерна, мкм ²	1.20 ± 0.10 ^a	2.70 ± 0.15 ^b	0.44 ± 0.08 ^c	0.40 ± 0.07 ^c
Суммарная площадь крахмальных зерен в хлоропласте, мкм ²	3.13 ± 0.26 ^a	8.23 ± 0.40 ^b	0.86 ± 0.11 ^c	1.12 ± 0.08 ^d
Доля крахмальных зерен от площади среза хлоропласта, %	24 ± 2 ^a	46 ± 3 ^b	12 ± 1.6 ^c	16 ± 1.2 ^d

Примечание. Надстрочные латинские буквы обозначают достоверность различий средних значений при $P < 0.05$ по каждому показателю, представленному в таблице.

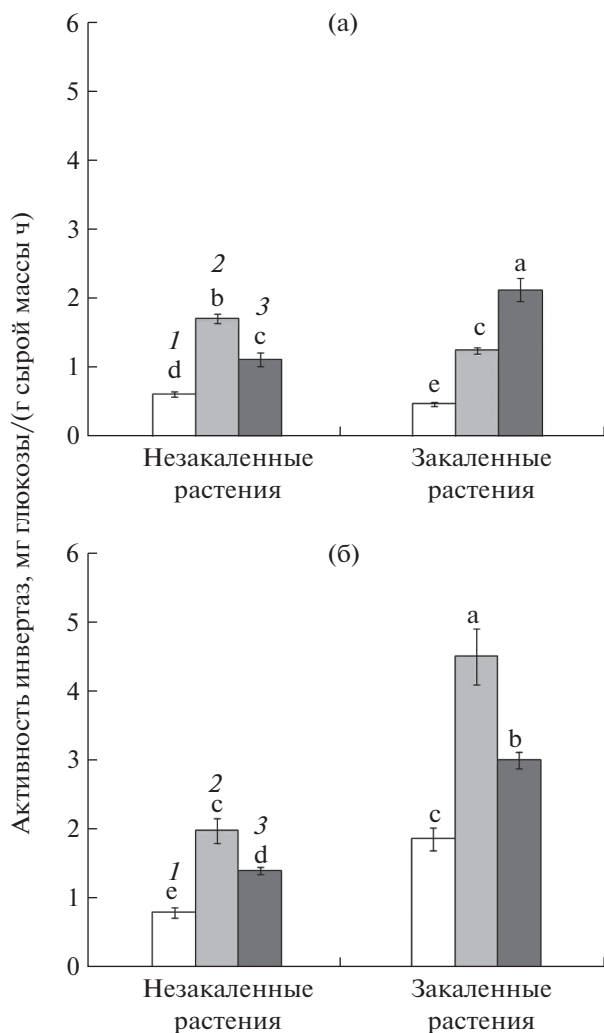


Рис. 4. Изменение активности инвертаз в листьях растений табака (а) и арабидопсиса (б) при закаливании к гипотермии (1 – цитоплазматическая инвертаза, 2 – вакуолярная инвертаза, 3 – инвертаза клеточной стенки). Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

ные растения арабидопсиса повышали свою морозоустойчивость на 3°C (с -3 до -6°C).

Известно, что причиной повреждения и гибели растений при отрицательных температурах является образование льда в их тканях. Образование кристаллов льда внутри клетки всегда приводит к ее гибели. Внеклеточное образование льда позволяет предотвратить механические внутриклеточные повреждения и сохранить жизнеспособность клеток растений [17]. Поэтому стратегия адаптации растений к морозу основана на образовании льда в межклетниках и избегании возникновения льда внутри клетки [2].

В реализации этой стратегии существенная роль принадлежит растворимым углеводам, которые на-

капливаются в растениях в период низкотемпературного закаливания [18]. Проведенные нами эксперименты выявили значительные различия между *N. tabacum* и *A. thaliana* по их способности к накоплению сахаров при закалывающих температурах. У растений табака содержание сахаров в листьях увеличилось лишь на 20%, а у арабидопсиса – в 2.5 раза по сравнению с незакаленными растениями. Эти результаты хорошо согласуются с данными по устойчивости растений табака и арабидопсиса к отрицательным температурам (табл. 1) и могут объяснять большие различия в эффективности закаливания между *N. tabacum* и *A. thaliana*.

Возможность накопления сахаров в клетке при закалывающих температурах во многом зависит от соотношения интенсивности процессов фотосинтеза (донор ассимилятов) и дыхания (акцептор ассимилятов) [12]. Наши эксперименты показали, что у обоих исследуемых видов растений интенсивность видимого фотосинтеза в процессе закаливания снижалась в меньшей степени, чем интенсивность темнового дыхания, что приводило к 1.5-кратному росту отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание. Одинаковые изменения параметров CO_2 -газообмена не давали возможности объяснить большие различия в содержании растворимых сахаров у *N. tabacum* и *A. thaliana* с точки зрения соотношения процессов фотосинтеза и дыхания.

В литературе имеются данные о том, что деградация крахмальных зерен в хлоропластах может служить в качестве дополнительного источника сахаров при низкотемпературном закаливании [19]. Для проверки этого предположения мы определили площадь крахмальных зерен в хлоропластах, используя методы электронной микроскопии. Оказалось, что площадь крахмальных зерен у *N. tabacum* и *A. thaliana* не только не сокращалась за время закаливания, а наоборот, увеличивалась. При этом у арабидопсиса рост суммарной площади крахмальных зерен в хлоропласте ограничивался 25%, а доля крахмальных зерен не превышала 16% от площади среза хлоропласта. У табака синтез крахмала при закалывающих температурах происходил настолько интенсивно, что площадь крахмальных зерен достигала почти половины от площади среза хлоропласта (табл. 4). Таким образом, *N. tabacum* и *A. thaliana* существенно отличались по характеру накопления фотоассимилятов при закаливании к гипотермии. Можно предположить, что растения табака аккумулялировали большую часть продуктов фотосинтеза в виде крахмала, что ограничивало их способность к накоплению растворимых углеводов в листьях и снижало эффективность закаливания. У растений арабидопсиса, в отличие от табака, большая часть ассимилятов, по-видимому, накапливалась в виде сахаров в листьях, что со-

здавало потенциал для формирования повышенной устойчивости к отрицательным температурам.

Наряду с накоплением сахаров, закаливание к гипотермии изменяло и соотношение разных форм сахаров в листьях исследуемых растений. Если у табака доли сахарозы и гексоз как до, так и после закаливания составляли примерно по 50%, то у арабидопсиса значительно увеличивалась доля гексоз (главным образом, глюкозы) в общей массе сахаров, за счет почти двукратного сокращения доли сахарозы (табл. 3). Поскольку изменение соотношения сахарозы и гексоз зависит от активности инвертаз, осуществляющих гидролиз сахарозы в клетках [20], мы провели серию экспериментов по определению активности инвертаз до и после закаливания.

Наши исследования выявили как общие для растений табака и арабидопсиса изменения в активности инвертаз при закаливании, так и существенные различия между исследуемыми видами. К числу общих для обоих видов можно отнести реакцию инвертазы клеточной стенки на закаливание, а именно — увеличение ее активности в два раза по сравнению с незакаленными растениями. Как известно, инвертаза клеточной стенки принимает участие в регуляции загрузки флоэмы ассимилятами [21]. В зависимости от организации контактов между клетками мезофилла и флоэмы, различают симпластный и апопластный типы загрузки флоэмы ассимилятами. Виды растений, имеющие единый для мезофилла и флоэмы симпласт и транспортирующие ассимиляты по межклеточной сети плазмодесм, называют симпластными. Виды с разобщенными симпластными доменами мезофилла и флоэмы, использующие апопласт в качестве промежуточного накопителя ассимилятов перед их загрузкой во флоэму, относят к апопластным [22]. Для растений *N. tabacum* и *A. thaliana*, имеющих апопластный тип загрузки флоэмы [23], активность инвертазы клеточной стенки в апопласте имеет большое значение в регуляции процесса оттока ассимилятов из листьев в корни. Можно предположить, что повышение активности инвертазы клеточной стенки приводило к ускорению расщепления сахарозы в апопласте и, тем самым, к торможению загрузки флоэмы у закаленных растений табака и арабидопсиса. Образовавшиеся в процессе гидролиза сахарозы гексозы поступали обратно в клетки мезофилла, увеличивая содержание сахаров в листьях [24].

Основные различия в активности инвертаз между *N. tabacum* и *A. thaliana* были связаны с функционированием внутриклеточных инвертаз. За время закаливания к гипотермии в клетках табака и арабидопсиса происходили разнонаправленные изменения активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз, которые могли

определять особенности накопления сахаров в листьях исследуемых видов. В наших экспериментах наблюдалось ~20% снижение у табака и двукратное увеличение активности данных инвертаз у арабидопсиса. Снижение активности внутриклеточных инвертаз у *N. tabacum* ограничивало образование гексоз в клетках, поэтому соотношение сахарозы и гексоз за время низкотемпературного закаливания у этих растений практически не изменялось. Значительное увеличение доли гексоз одновременно со снижением доли сахарозы при закаливании *A. thaliana* можно объяснить повышением активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз. Работа инвертаз, приводящая к увеличению доли гексоз в общей массе сахаров, при закаливании имеет важное значение для формирования устойчивости растений к отрицательным температурам [25]. Образование в результате гидролиза молекулы сахарозы двух молекул (глюкозы и фруктозы) повышает осмотический потенциал клетки, что позволяет снижать температуру замерзания раствора, при которой происходит образование кристаллов льда [26].

Высокое содержание глюкозы в клетках закаленных растений *A. thaliana*, помимо осмотической и криопротекторной функции, могло иметь и сигнальную функцию. В литературе имеются данные об участии глюкозы в передаче внутриклеточных сигналов [27]. В качестве сенсора глюкозы рассматривается гексокиназа 1 (HKK1), локализованная в цитозоле, хлоропластах, митохондриях и ядре [28]. В литературе представлены данные об активации экспрессии генов *COR15B* и *LEA3* в ответ на увеличение содержания гексоз в клетках растений арабидопсиса в условиях низких температур [6, 19]. Одна из основных функций белков, кодируемых генами холодового ответа (*COR*), а также генами белков позднего эмбриогенеза (*LEA*) заключается в защите клеточных структур от дегидратации [29]. Поэтому можно предположить, что HKK1 могла воспринимать увеличение концентрации глюкозы в клетках арабидопсиса, участвовать в трансдукции глюкозного сигнала и, тем самым, активировать экспрессию генов, отвечающих за формирование устойчивости клеток к обезвоживанию, что имеет большое значение для повышения морозоустойчивости растений [30].

Таким образом, на основе полученных данных можно констатировать, что у растений *N. tabacum* и *A. thaliana* инвертазы играли существенную роль в закаливании к гипотермии. Можно предположить, что повышение активности инвертазы клеточной стенки у обоих видов исследуемых растений тормозило загрузку флоэмы и отток ассимилятов из листьев в корни. Это создавало предпосылки для накопления продуктов фотосинтеза в клетках мезофилла листа у растений таба-

ка и арабидопсиса. Снижение активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз у табака приводило к торможению гидролиза сахарозы в клетках этого растения. Низкий уровень накопления гексоз одновременно с интенсивным синтезом крахмала в хлоропластах ограничивал способность к накоплению сахаров и снижал эффективность низкотемпературного закаливания растений табака. Растения арабидопсиса, в отличие от табака, аккумулялировали большую часть ассимилятов в виде растворимых углеводов, а не крахмала в хлоропластах. Более чем двукратный рост содержания сахаров у арабидопсиса достигался, главным образом, за счет накопления гексоз, в результате повышения активности цитоплазматической и вакуолярной инвертаз, что обеспечивало высокую эффективность закаливания *A. thaliana* к гипотермии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания (номер темы 121040800153-1 “Механизмы адаптации растений к факторам аридизации глобального климата и антропогенному загрязнению окружающей среды”).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Larcher W.* Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2003. P. 513.
2. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
3. *Tarkowski L.P. and Van den Ende W.* Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure // *Front Plant Sci.* 2015. V. 6. Article 203. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00203>
4. *Sturm A.* Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P. 1. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.1>
5. *Deryabin A.N., Burakhanova E.A., Trunova T.I.* Apoplastic sugars and cell wall invertase are involved in formation of the tolerance of cold-resistant potato plants to hypothermia // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2015. V. 465. P. 366.
6. *Qian W., Xiao B., Wang L., Hao X., Yue C., Cao H., Wang Y., Li N., Yu Y., Zeng J., Yang Y., Wang X.* Cs-INV5, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* // *BMC Plant Biology.* 2018. V. 18. Article 228. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1456-5>
7. *Weiszmann J., Furtauer L., Weckwerth W., Nagele T.* Vacuolar sucrose cleavage prevents limitation of cytosolic carbohydrate metabolism and stabilizes photosynthesis under abiotic stress // *FEBS Journal.* 2018. V. 285. P. 4082. <https://doi.org/10.1111/febs.14656>
8. *Xiang L., Le Roy K., Bolouri-Moghaddam M.R., Vanhaecke M., Lammens W., Rolland F., Van den Ende W.* Exploring the neutral invertase – oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana* // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3849. <https://doi.org/10.1093/jxb/err069>
9. *Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Astakhova N.V., Sabelnikova E.P., Trunova T.I.* Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature // *J. Therm Biol.* 2005. V. 30. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.07.002>
10. *Sasaki H., Ichimura K., Imada S., Yamaki S.* Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings // *J. Plant Physiol.* 2001. V. 158. P. 847.
11. *Туркина М.В., Соколова С.В.* Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука, 1971. 7 с.
12. *Климов С.В.* Холодовое закаливание растений – результат поддержания повышенного отношения фотосинтез/дыхание при низких температурах // Известия РАН. Серия биологическая. 2003. Т. 30. С. 57.
13. *Трунова Т.И., Астахова Н.В., Дерябин А.Н., Сабельникова Е.П.* Ультраструктурная организация хлоропластов листьев растений картофеля, трансформированного геном дрожжевой инвертазы, в норме и при гипотермии // Доклады АН. 2003. Т. 389. С. 842.
14. *Klimov S.V., Popov V.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Trunova T.I.* The decreased cold-resistance of chilling-sensitive plants is related to suppressed CO₂ assimilation in leaves and sugar accumulation in roots // *Russ. J. Plant Physiol.* 2002. V. 49. P. 776.
15. *Xin Z., Browse J.* Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. P. 893.
16. *Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hinch D.K.* Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 1860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x>
17. *Ashworth E.N., Pearce R.S.* Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species // *Planta.* 2002. V. 214. P. 798.
18. *Ma Y., Zhang Y., Lu J., Shao H.* Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress // *Afr. J. Biotechnol.* 2009. V. 8. P. 2004.
19. *Sicher R.* Carbon partitioning and the impact of starch deficiency on the initial response of *Arabidopsis* to chilling temperatures // *Plant Science.* 2011. V. 181. P. 167. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.005>
20. *Barau J., Grandis A., Carvalho V.M., Teixeira G.S., Zapparioli G.H.A., Scatolin do Rio M.A., Rincones J., Bucker-*

- idge M.S., Pereira G.A.G. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches broom disease of cacao // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 1325.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru485>
21. Roitsch T., Gonzalez M.C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations // Trends Plant Sci. 2004. V. 9. P. 606.
22. Гамалей Ю.В. Флоэма листа. СПб.: Наука, 1990. 144 с.
23. Gamalei Y.V., Pakhomova M.V., Sjutkina A.V. Ecological aspects of assimilate export. Temperature // Fiziol. Rast. 1992. V. 39. P. 1068.
24. Chikov V.I., Bakirova G.G. Role of the apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity // Russ. J. Plant Physiol. 2004. V. 51. P. 420.
25. Livingston D.P., Henson C.A. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 403.
<https://doi.org/10.1104/pp.116.1.403>
26. Reyes-Diaz M., Ulloa N., Zuniga-Feest A., Gutierrez A., Gidekel M., Alberdi M., Corcuera L.J., Bravo L.A. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3687.
27. Gupta A.K., Kaur N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants // J. BioSci. 2005. V. 30. P. 761.
28. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // Science. 2003. V. 300. P. 332.
29. Wilhelm K.S., Thomashow M.F. *Arabidopsis thaliana cor15b*, an apparent homologue of *cor15a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought // Plant Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 1073.
30. Jang J.C., León P., Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants // Plant Cell. 1997. V. 9. P. 5.

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИИ НА БАЛАНС ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ ГРЕЧИХИ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ПЛОИДНОСТИ

© 2021 г. Е. А. Гончарук^{а, *}, В. В. Казанцева^а, Н. В. Загоскина^а

^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.12.2020 г.

После доработки 17.02.2021 г.

Принята к публикации 19.02.2021 г.

Изучено воздействие гипотермии (5°C; 1 и 7 суток) на ростовые процессы и накопление фенольных соединений в надземных органах проростков ди- и тетраплоидных генотипов гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench). Установлено, что у проростков диплоидного генотипа изменения всех исследованных параметров были выражены в большей степени по сравнению с тетраплоидным генотипом. В условиях гипотермии это проявлялось в снижении высоты проростков и длины корневой системы по сравнению с контролем, повышении уровня малонового диальдегида и уменьшении суммарного содержания фенольных соединений в надземных органах диплоидного генотипа, в отличие от тетраплоидного. На фоне действия низкой температуры количество фенилпропаноидов в гипокотиле проростков обоих генотипов гречихи снижалось, тогда как накопление антоцианов в большинстве случаев повышалось, что зависело от длительности низкотемпературного воздействия и генотипа. В то же самое время гипотермия не приводила к изменениям в содержании фенилпропаноидов и флавоноидов в семядольных листьях обоих генотипов, которое сохранялось на уровне контрольных вариантов. Активность ключевого фермента фенольного метаболизма *L*-фенилаланинаммиаклиаза в надземных органах проростков при гипотермии либо не изменялась, либо снижалась. Таким образом, проведенные исследования по изучению баланса фенольных соединений в проростках двух генотипов гречихи впервые показали его зависимость от уровня ploидности клеток и температурных условий выращивания растений.

Ключевые слова: *Fagopyrum esculentum*, гречиха, проростки, гипотермия, морфофизиологические параметры, малоновый диальдегид, фенольные соединения, фенилпропаноиды, флавоноиды, *L*-фенилаланинаммиаклиаза

DOI: 10.31857/S0015330321050043

ВВЕДЕНИЕ

Фенольные соединения (ФС) относятся к вторичным или специализированным (“specialized metabolites”) метаболитам, которые широко распространены в растениях и чрезвычайно разнообразны по структуре, свойствам и биологической активности [1, 2]. Они представлены преимущественно фенилпропаноидами, флавоноидами, а также нерегулярными трехмерными полимерами — лигнинами. Функциональная роль ФС разнообразна и связана с регуляцией роста и развития растений, процессов фотосинтеза и дыхания, прорастания семян, аллелопатических взаимодействий [1, 3]. Они также повышают адаптационные возможности растений в условиях стрессовых воздействий, таких как высокая интенсивность света,

патогенные инфекции, дефицит макро- и микроэлементов, низкие температуры и др. [4]. В значительной степени это обусловлено их антиоксидантной активностью, взаимодействием со свободными радикалами и, как следствие, прерыванием и блокированием цепных процессов свободно-радикального окисления [5]. Эти свойства ФС в поддержании жизнедеятельности проявляются не только в растениях, но и в организме человека, что привлекает внимание исследователей в связи с возможностью их практического применения в фармакологии в качестве веществ-антиоксидантов [6].

Пути биосинтеза ФС в настоящее время хорошо изучены [1]. Установлена важная роль фермента *L*-фенилаланинаммиаклиаза (ФАЛ), катализирующей образование *транс*-коричной кислоты из *L*-фенилаланина. Отмечена его экспрессия в покровных и сосудистых тканях растений, где локализируются флавоноиды и полимеры фенольной природы, выполняющие защитную функцию [7].

Сокращения: ФС — фенольные соединения; ФАЛ — *L*-фенилаланинаммиаклиаза; ДГГ — диплоидный генотип гречихи; ТГГ — тетраплоидный генотип гречихи; МДА — малоновый диальдегид.

Высказывается предположение о том, что фенилпропаноидный путь фенольного метаболизма, по которому образуется большинство веществ фенольной природы, определяет основу устойчивости растений к абиотическим стрессам [4].

К числу экологических факторов, которым растения подвергаются на разных этапах онтогенетического развития, относится температура, в том числе гипотермия [8]. Ее влияние на начальных этапах роста приводит к изменениям физиолого-биохимических процессов на последующих стадиях онтогенеза [9]. Это касается и биосинтеза ФС, что проявляется на уровне активности ферментов их метаболизма и содержания этих вторичных метаболитов, включая фенилпропаноиды и флавоноиды [5, 10]. Сообщалось и о снижении количества этих метаболитов у теплолюбивых культур в условиях холодового стресса [11].

Адаптация растений к действию стрессовых факторов зависит и от уровня плоидности. Например, у тетраплоидных сортов табака устойчивость к холодовому стрессу была выше по сравнению с диплоидными [12]. Повышение уровня плоидности у цитрусовых культур сопровождалось изменениями в их фенотипических и физиологических характеристиках, а также устойчивости к гипотермии [13].

Гречиха посевная, или обыкновенная, представляет собой наиболее известный вид рода *Fagopyrum*, широко возделываемый в качестве крупяной культуры для диетического питания, а также для получения такого соединения фенольной природы как рутин, используемого в качестве препарата-биоантиоксиданта в медицине [14]. Для этой культуры характерно образование различных ФС [15, 16]. Они представлены оксиквонной кислотами (протокатеховая, галловая, ванилиновая), фенилпропаноидами (хлорогеновая, кофейная, феруловая и *n*-кумаровая кислоты) и флавоноидами. К последним относятся флавонолы (кверцетин и его гликозиды, в том числе рутин, кверцитрин и др.), антоцианы и антоцианидины (цианидин и его гликозиды), флаваны (эпигаллокатехин, эпикатехин) и танины, а также образующиеся исключительно у проростков флавоны (ориентин, изоориентин, изовитексин, витексин). К доминирующим соединениям фенольного комплекса гречихи относятся рутин, катехин и эпикатехин, в меньших количествах присутствуют протокатеховая и галловая кислоты, а также витексин и кверцетин, которые в комплексе определяют ее антиоксидантную активность [15].

Следует отметить, что гречиха относится к группе теплолюбивых культур и она восприимчива к действию низких положительных температур, особенно на начальных этапах онтогенеза [8, 17]. Однако до сих пор крайне мало известно об особенностях накопления ФС у генотипов гречихи

посевной с различным уровнем плоидности на стадии проростков, когда они наиболее уязвимы к изменению температурного режима, включая действие низких положительных температур.

Целью работы было исследование действия гипотермии на изменение баланса фенольных соединений в проростках гречихи с различным уровнем плоидности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были проростки гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) диплоидного (ДГГ, $2n = 16$) и тетраплоидного (ТГГ, $4n = 32$) генотипов (сорта Девятка и Большевик 4, соответственно). Семена проращивали в темноте в чашках Петри на смоченной водой фильтровальной бумаге. Через 24 ч материал помещали в рулоны из фильтровальной бумаги (по 15 семян в рулон), которые ставили в пластиковые стаканы с водой (по 7 рулонов в один стакан) и выращивали в камере фитотрона при $+24^{\circ}\text{C}$ и 16-часовом фотопериоде (5000 люкс) в течение 7 суток. После этого часть растений подвергали низкотемпературному воздействию, помещая их на 1 или 7 суток (кратковременное и длительное воздействие гипотермии, соответственно) в камеру фитотрона с температурой $+5^{\circ}\text{C}$ (при тех же условиях освещения), которая не приводила к их гибели (согласно данным предварительных исследований). В качестве контроля использовали проростки, выращенные в стандартных условиях. Для биохимических исследований надземные органы проростков (гипокотили, семядольные листья) фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C .

Оводненность растительных тканей анализировали после их высушивания до постоянного веса при $+70^{\circ}\text{C}$.

Уровень перекисного окисления липидов в растительных тканях определяли стандартным методом по содержанию МДА, используя реакцию с тиобарбитуровой кислотой [18]. Концентрацию МДА рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции ($1.56 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Количество МДА выражали в мкмоль/г сырой массы.

Фенольные соединения извлекали 96% этанолом из замороженного и измельченного растительного материала в течение 45 мин при 45°C [19]. Экстракты центрифугировали (13500 g, 10 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения ФС. Содержание суммы ФС определяли с реактивом Фолина-Дениса при 725 нм, содержание флавоноидов – с 1% водным раствором хлористого алюминия при 415 нм, содержание фенилпропаноидов – методом прямого спектрофотометрирования растворов при 330 нм [20]. Содержание суммы ФС и содер-

Таблица 1. Морфофизиологические параметры проростков* диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*

Генотип	Параметры					
	сырой вес, г		оводненность, %		ростовые параметры, см	
	гипокотиль	семядольные листья	гипокотиль	семядольные листья	длина корня	высота надземных органов
Кратковременное воздействие гипотермии						
Контроль						
ДГГ	0.116 ± 0.022 ^C	0.042 ± 0.003 ^C	96.06 ± 0.28 ^A	88.56 ± 0.60 ^A	9.60 ± 0.82 ^C	9.04 ± 0.62 ^C
ТГГ	0.140 ± 0.006 ^{AB}	0.047 ± 0.004 ^B	97.47 ± 0.50 ^A	90.27 ± 1.02 ^A	8.20 ± 0.54 ^D	8.14 ± 0.42 ^{CD}
Опыт						
ДГГ	0.103 ± 0.011 ^D	0.041 ± 0.002 ^C	95.24 ± 0.28 ^A	87.98 ± 0.59 ^A	8.80 ± 0.84 ^{CD}	8.20 ± 0.27 ^{CD}
ТГГ	0.127 ± 0.004 ^{BC}	0.039 ± 0.001 ^C	95.97 ± 0.43 ^A	88.05 ± 1.51 ^A	7.90 ± 0.74 ^D	7.30 ± 0.50 ^D
Длительное воздействие гипотермии						
Контроль						
ДГГ	0.130 ± 0.011 ^{AB}	0.054 ± 0.003 ^A	96.07 ± 0.07 ^A	90.06 ± 0.12 ^A	14.56 ± 1.26 ^A	13.70 ± 1.41 ^A
ТГГ	0.145 ± 0.009 ^A	0.054 ± 0.009 ^A	96.64 ± 1.73 ^A	91.22 ± 0.62 ^A	12.60 ± 2.22 ^B	10.94 ± 0.57 ^B
Опыт						
ДГГ	0.114 ± 0.009 ^{CD}	0.048 ± 0.005 ^B	95.79 ± 0.76 ^A	85.82 ± 1.47 ^A	8.40 ± 1.34 ^D	10.33 ± 0.55 ^B
ТГГ	0.131 ± 0.005 ^{AB}	0.040 ± 0.001 ^C	96.89 ± 0.53 ^A	89.75 ± 0.71 ^A	8.66 ± 1.32 ^{CD}	10.49 ± 1.15 ^B

Примечание. * Данные приведены в расчете на один проросток. Разными латинскими буквами обозначены достоверные различия при $P < 0.05$. Проростки выращивали при $t + 24^{\circ}\text{C}$ (контроль) и подвергали кратковременному (1 сутки) или длительному (7 суток) воздействию низкой положительной температуры (5°C , опыт).

жание флавоноидов выражали в мг-экв. рутина/г сухой массы, а содержание фенолпропаноидов – в мг-экв. кофейной кислоты/г сухой массы.

Антоцианы извлекали 3% раствором HCl в 96% этаноле при постоянном перемешивании в темноте из замороженных в жидком азоте и измельченных гипокотилей проростков гречихи [20]. Через 30 мин гомогенат центрифугировали (11000 g, 10 мин) и в надосадочной жидкости определяли содержание антоцианов методом прямого спектрофотометрирования при 550 нм. Содержание антоцианов выражали в мг-экв. цианидина/г сухой массы.

Для определения активности *L*-фенилаланинаммияклизы (ФАЛ) замороженный материал гомогенизировали в 0.1 М Na-боратном буфере (pH 8.8), содержащем 0.5 мМ ЭДТА и 3 мМ дитиотреитола, с добавлением нерастворимого поливинилпирролидона (50% от веса сырой ткани) [19]. Гомогенат фильтровали, центрифугировали (18000 g, 20 мин) и надосадочную жидкость использовали для определения активности фермента. Все операции проводили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Активность ФАЛ определяли по образованию из *L*-фенилаланина продукта реакции *транс*-коричной кислоты [19]. Активность ФАЛ выражали в нмоль *транс*-коричной кислоты/мг белка. Ко-

личество белка в пробах определяли методом Бредфорд [21].

В экспериментах использовали трехкратные биологические и трех–четырёхкратные аналитические повторности. В таблице и на графиках представлены средние арифметические значения полученных величин и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), используя программу Sigma Plot 12.3. Различными латинскими буквами обозначали достоверность различий между средними значениями при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфофизиологические характеристик и проростков гречихи

Определение морфофизиологических параметров проростков двух генотипов гречихи необходимо для оценки их физиологического состояния и реакции на кратковременное и длительное воздействие гипотермии. В большинстве случаев длина корня и высота гипокотили у проростков ДГГ как контрольных, так и опытных вариантов была выше по сравнению с таковыми у ТГГ (табл. 1). В условиях гипотермии эти показатели снижались. При кратковременном ее воздействии (1 сутки)

длина корней проростков ДГГ уменьшалась на 10% по сравнению с контролем, а у ТГГ не изменялась, тогда как высота гипокотилей уменьшалась у обоих генотипов на 10%. При длительном воздействии гипотермии (7 суток) изменения этих параметров были выражены в значительно большей степени по сравнению с контрольным вариантом: длина корней уменьшалась на 43 и 32% соответственно, у ДГГ и ТГГ, высота гипокотилия снижалась на 25% у ДГГ и сохранялась на уровне контроля у ТГГ.

Сырой вес надземных органов проростков двух генотипов гречихи в условиях гипотермии снижался по сравнению с контролем, тогда как содержание в них воды практически не изменялось (табл. 1). При кратковременном ее воздействии вес гипокотилей у ДГГ и ТГГ уменьшался соответственно на 12 и 10%, а вес семядольных листьев – на 18% у ТГГ и сохранялся на уровне контроля у ДГГ. При длительном воздействии гипотермии вес гипокотилей проростков обоих генотипов гречихи по сравнению с контролем не изменялся, тогда как вес семядольных листьев уменьшался на 12 и 26% у ДГГ и ТГГ, соответственно.

Содержание малонового диальдегида в надземных органах проростков гречихи

Определение содержания МДА в надземных органах проростков двух генотипов гречихи, выращиваемых в контрольных и опытных условиях, являлось важной составляющей оценки их реакции на воздействие низкой положительной температуры. Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о более высоком его уровне в семядольных листьях по сравнению с гипокотилиями, а также об изменениях этого показателя при действии гипотермии.

В контрольных условиях содержание МДА у 8-суточных проростков ТГГ было выше по сравнению с ДГГ, и эти различия составляли 400% для гипокотилей и 250% для семядольных листьев. К 14 суткам роста оно повышалось в гипокотилиях ДГГ по сравнению с более ранней стадией онтогенеза на 42%, тогда как у ТГГ понижалось почти на эту же величину (47%). В семядольных листьях этих проростков количество МДА уменьшалось по сравнению с 8-суточными на 32 и 70% у ДГГ и ТГГ соответственно.

В условиях гипотермии содержание МДА в надземных органах проростков обоих генотипов гречихи изменялось. При кратковременном ее воздействии оно увеличилось в гипокотилиях ДГГ и ТГГ на 38 и 17% соответственно, тогда как в семядольных листьях достоверное повышение анализируемого показателя отмечалось только у ДГГ (на 19%). При длительном воздействии гипотер-

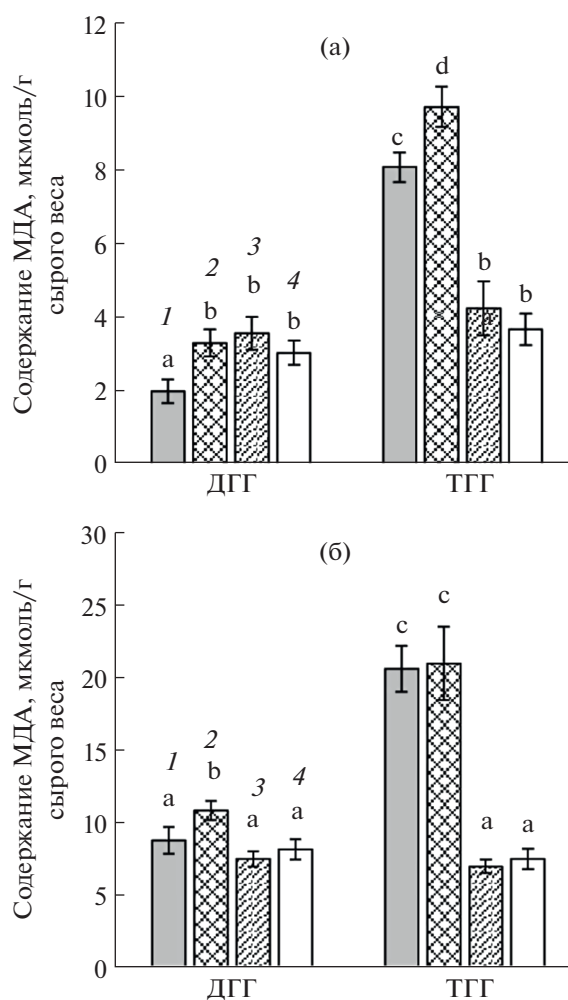


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида (МДА) в гипокотилиях (а) и семядольных листьях (б) проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*. 1, 3 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия (1 сутки), 4 – длительная гипотермия (7 суток). Возраст растений вариантов 1 и 2 составлял 8 дней, варианты 3 и 4 – 14 дней. Даны средние значения и их стандартные ошибки. Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

мии содержание МДА в надземных органах проростков двух генотипов гречихи не изменялось.

Содержание фенольных соединений в надземных органах проростков гречихи

В гипокотилиях проростков гречихи различного возраста, выращиваемых в контрольных условиях, количество ФС было практически равным и несколько выше у ДГГ по сравнению с ТГГ (рис. 2а). В семядольных листьях оно превышало таковое в гипокотилиях: у 8-суточных проростков ДГГ и ТГГ

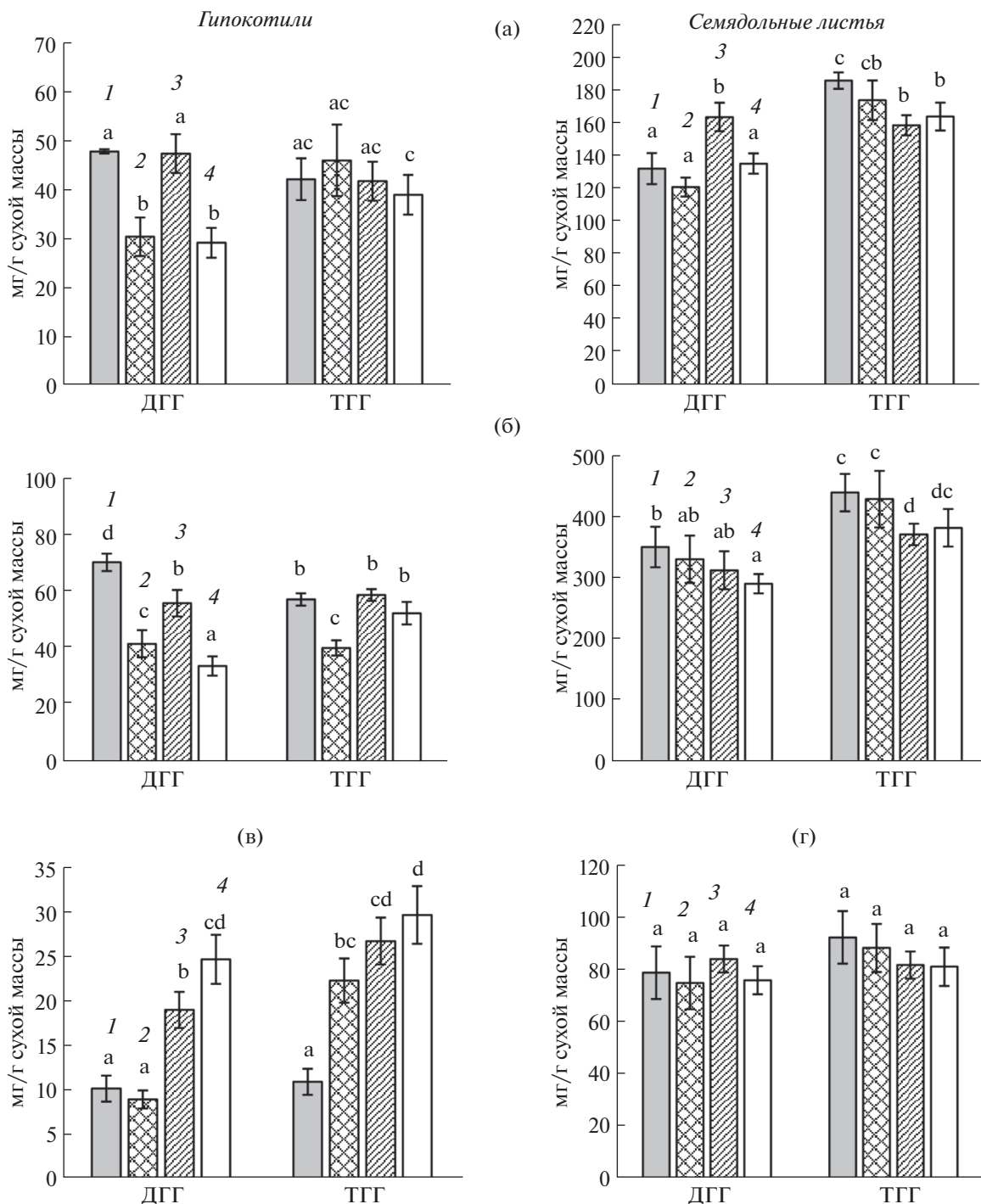


Рис. 2. Содержание суммы фенольных соединений (мг-экв. рутина) (а), фенилпропаноидов (мг-экв. кофейной кислоты) (б), антоцианов (мг-экв. цианидина) (в) и флавоноидов (мг-экв. рутина) (г) в гипокотилиях и семядольных листьях проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*. 1, 3 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия (1 сутки), 4 – длительная гипотермия (7 суток). Возраст растений вариантов 1 и 2 составлял 8 дней, вариантов 3 и 4 – 14 дней. Даны средние значения и их стандартные ошибки. Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

в 2.5 и 5 раз соответственно, тогда как у 14-суточных – в 3–4 раза.

Кратковременное действие гипотермии в большинстве случаев не приводило к изменениям суммарного содержания ФС в надземных органах проростков обоих генотипов гречихи, за исключением снижения их количества в гипокотелях ДГГ (на 36% по сравнению с контролем). При длительном воздействии гипотермии оно сохранялось на уровне контрольного варианта в надземных органах ТГГ и уменьшалось у ДГГ (как в гипокотелях, так и в семядольных листьях – на 38 и 18% относительно контроля).

Помимо определения суммарного содержания ФС нами было проанализировано накопление основных их классов в надземных органах проростков гречихи.

Определение содержания фенилпропаноидов в гипокотелях проростков гречихи контрольных вариантов показало более высокий их уровень у ДГГ по сравнению с ТГГ (на 20%) на 8 сутки роста и практически равный на 14 сутки (рис. 2б). Иная тенденция отмечена для семядольных листьев, характеризующихся значительно более высоким накоплением фенилпропаноидов, которое в 6–8 раз превышало таковое в гипокотелях. В этом случае у ДГГ их количество было во всех случаях ниже, чем у ТГГ (на 15–20%).

После кратковременного воздействия гипотермии содержание фенилпропаноидов в гипокотелях проростков обоих генотипов гречихи снижалось по сравнению с контролем на 30–40%, тогда как в семядольных листьях достоверных изменений не наблюдалось. Уменьшение их количества отмечалось и после длительного ее воздействия, но только в гипокотелях ДГГ (на 40% относительно контроля). Во всех остальных вариантах (гипокотили ТГГ, семядольные листья ДГГ и ТГГ) достоверных изменений анализируемого показателя не отмечено.

Как следует из представленных на рис. 2в данных, содержание антоцианов у 8-суточных проростков обоих генотипов гречихи контрольных вариантов было практически равным. В дальнейшем (14 суток) оно повышалось (на 46 и 60% у ДГГ и ТГГ соответственно), что приводило к более высокому содержанию антоцианов в гипокотелях ТГГ, которое на 29% превышало таковое у ДГГ.

При кратковременном воздействии гипотермии содержание антоцианов в гипокотелях проростков ДГГ не изменялось, а у ТГГ – повышалось (на 48% по сравнению с контролем). Иная тенденция отмечалась при длительном ее воздействии: их накопление возрастало у ДГГ (на 23% относительно контроля) и не изменялась у ТГГ, что приводило к одинаковому их накоплению у обоих генотипов гречихи.

Определение содержания флавоноидов в семядольных листьях проростков двух генотипов

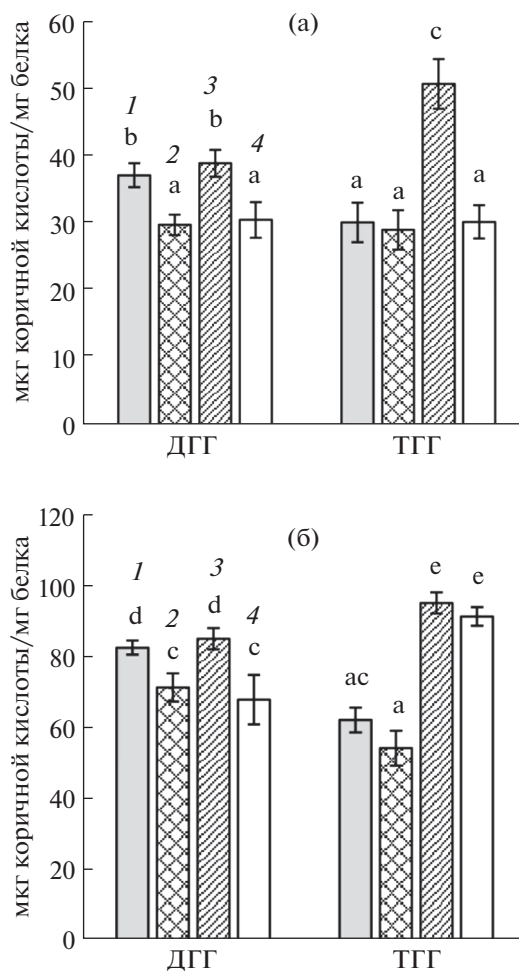


Рис. 3. Активность *L*-фенилаланинаммиаклиазы в гипокотелях (а) и семядольных листьях (б) проростков диплоидного (ДГГ) и тетраплоидного (ТГГ) генотипов *F. esculentum*. 1, 3 – контроль, 2-кратковременная гипотермия (1 сутки), 4 – длительная гипотермия (7 суток). Возраст растений вариантов 1 и 2 составлял 8 дней, вариантов 3 и 4 – 14 дней. Даны средние значения и их стандартные ошибки. Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

гречихи контрольных вариантов различного возраста (8 и 14 суток) показало практически равный их уровень (рис. 2г). Воздействие гипотермии (как кратковременное, так и длительное) не приводило к достоверным изменениям в количестве флавоноидов.

Активность L-фенилаланинаммиаклиазы в надземных органах проростков гречихи

Определение активности ФАЛ в проростках контрольных вариантов обоих генотипов гречихи показало, что в семядольных листьях она была в

среднем почти в 2 раза выше, чем в гипокотильях (рис. 3). При этом у 8-суточных проростков более высокие значения ФАЛ характерны для надземных органов ДГГ по сравнению с ТГГ, тогда как у 14-суточных — для ТГГ (за исключением семядольных листьев).

При кратковременном воздействии гипотермии активность ФАЛ снижалась в гипокотильях и семядольных листьях проростков ДГГ (на 20 и 14% относительно контроля соответственно) и не изменялась у ТГГ. При длительном ее воздействии у проростков ДГГ тенденция была аналогичной, тогда как у ТГГ активность фермента сохранялась на уровне контроля в семядольных листьях и снижалась в гипокотильях (на 40% относительно контроля).

ОБСУЖДЕНИЕ

Высшие растения в течение онтогенетического развития могут подвергаться низкотемпературному воздействию, что приводит к изменениям их роста и образования различных метаболитов [8]. К их числу относятся ФС — одни из наиболее распространенных представителей специализированных соединений растительного происхождения, для которых характерна антиоксидантная активность и участие в защите клеток от действия активных форм кислорода, количество которых повышается при стрессовых воздействиях [1, 4, 5]. Несмотря на большой интерес исследователей к изучению этих антиоксидантов, до сих пор данные об изменениях в их накоплении на начальных этапах онтогенетического развития растений, когда они наиболее чувствительны к действию гипотермии, немногочисленны и достаточно противоречивы [11, 16]. Это обусловлено спецификой образования ФС у различных видов растений, распределением их по органам и тканям, воздействием экологических и стрессовых факторов, а также уровнем полиплоидизации [1, 3, 4, 11, 22]. В этом случае растения гречихи, а именно гречихи обыкновенной или посевной, для которой характерна высокая способность к образованию различных ФС, в том числе флавонола рутина — вещества с Р-витаминной капилляроукрепляющей активностью, представляют уникальный объект для изучения [14]. Важно отметить наличие у этой культуры сортов с различным уровнем плоидности, что позволяет сравнить их ответную реакцию на изменение условий роста, в том числе воздействие гипотермии, и вызывает интерес у исследователей [23].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что на ранних этапах онтогенетического развития растения, принадлежащие к одному виду (*F. esculentum*), но с разным уровнем плоидности ($2n$ и $4n$), отличались по морфофизиологическим характеристикам как при выращивании в стан-

дартных условиях, так и при действии гипотермии. Так, у проростков ТГГ скорость роста как подземных, так и надземных органов была ниже таковой у ДГГ. О снижении ростовых параметров при полиплоидизации растений сообщалось и в литературе [24]. Следует также отметить уменьшение биометрических параметров проростков двух генотипов гречихи в условиях гипотермии, как это отмечалось и для других растений [8, 9]. При этом оводненность надземных органов сохранялась на одном уровне у контрольных и опытных вариантов, что может свидетельствовать об отсутствии изменений их водного режима на начальных этапах онтогенеза гречихи. Необходимо также отметить, что длительное воздействие гипотермии приводило к более выраженным изменениям морфометрических параметров проростков двух генотипов гречихи, а также массы их надземных органов по сравнению с кратковременным воздействием. В целом изменения морфофизиологических характеристик у изучаемых генотипов при действии гипотермии имели схожие тенденции, которые были более выражены у ДГГ. О том, что степень морфофизиологической изменчивости у растений определяется их видовой принадлежностью, онтогенетической фазой развития, длительностью и интенсивностью действия температуры сообщалось в литературе [8, 25].

Уровень перекисного окисления липидов, определяемый по содержанию МДА, является важным показателем физиологического состояния растительных тканей и их реакции на изменение условий произрастания, в том числе действия гипотермии [18]. Полученные нами данные свидетельствуют, во-первых, об отличиях в содержании МДА в надземных органах проростков двух генотипов гречихи, которое было выше в семядольных листьях, особенно у ТГГ. Во-вторых, о более выраженной их реакции на кратковременное воздействие гипотермии, когда содержание МДА увеличивалось (в большей степени в гипокотильях ТГГ).

Все это подтверждает “зависимость” образования активных форм кислорода в проростках гречихи от уровня их плоидности и длительности воздействия гипотермии, что впервые продемонстрировано нами для этих культур. При схожей тенденции варибельности содержания продуктов перекисного окисления липидов у обоих генотипов в условиях действия гипотермии, изменения у ТГГ были выражены в большей степени относительно ДГГ.

Для растений гречихи характерна высокая способность к накоплению ФС — низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы защиты [4, 14, 15]. Однако крайне мало данных об их образовании на начальных этапах онтогенеза у культур с различным уровнем плоидности, в том

числе в условиях действия низкой положительной температуры. Согласно нашим данным, суммарное содержание ФС в надземных органах проростков гречихи, подвергнутых действию гипотермии, снижалось у ДГГ (особенно при длительном воздействии), тогда как у ТГГ достоверных изменений не отмечено. Это может быть следствием отличий в конститутивном уровне ФС в этих растительных тканях, ингибированием ферментов биосинтеза ФС, катаболизмом этих метаболитов в условиях гипотермии, изменением структуры хлоропластов как основного места биосинтеза ФС в клетках зеленых растений [1, 7, 8]. Следует также отметить, что при длительном воздействии гипотермии такой показатель развития стрессовой реакции как уровень перекисного окисления липидов снижался относительно кратковременного ее воздействия (рис. 1). Это свидетельствует об активации антиоксидантной системы защиты, предотвращающей развитие окислительного стресса в клетках растений [10–12].

Фенилпропаноиды относятся к биогенетически ранним соединениям фенольного метаболизма с высокой окислительно-восстановительной способностью, образование которых в растениях в большинстве случаев повышается при действии стрессовых факторов и способствует формированию устойчивости [1, 10]. Иная тенденция отмечалась в надземных органах проростков двух генотипов гречихи. В условиях гипотермии (как при кратковременном, так и при длительном ее воздействии) содержание фенилпропаноидов снижалось в гипокотелях, а в семядольных листьях, где их количество было высоким и сохранялось на уровне контроля, эти изменения в большей степени были выражены у ДГГ по сравнению с ТГГ. Тенденция уменьшения этого класса ФС в гипокотелях гречихи может быть обусловлена изменением скорости их биосинтеза или катаболизма, а также транспортом в другие органы [1, 10]. Следует также отметить различия в накоплении фенилпропаноидов в надземных органах проростков ДГГ и ТГГ, что может быть следствием различно уровня ploидности растений.

Для растений гречихи характерно образование антоцианов, которые на начальных этапах онтогенеза придают красное окрашивание их гипокотелям [20]. Эти соединения фенольной природы обладают радикал-связывающими свойствами и способны “перехватывать” часть солнечной радиации, тем самым защищая проростки от фотоповреждения [26]. Как следует из наших данных, содержание антоцианов в гипокотелях повышалось по мере роста проростков гречихи, что в большей степени характерно для ТГГ. В условиях гипотермии в большинстве случаев их количество увеличивалось: у ТГГ – уже при кратковременном воздействии, тогда как у ДГГ – при длительном. Это свидетельствует о том, что при воздей-

ствии гипотермии в гипокотелях проростков ТГГ происходила быстрая активация биосинтеза антоцианов – ФС с антиоксидантной активностью – в отличие от ДГГ. Интересен и тот факт, что при длительном воздействии низких положительных температур их содержание в гипокотелях обоих генотипов гречихи достигало одного уровня, что предполагает равную “скорость” их биосинтеза и представляет интерес для последующих исследований. Увеличение накопления антоцианов может сопровождать адаптивную стадию растений к воздействию стрессора, являющуюся важной составляющей процесса формирования неспецифической устойчивости за счет “избыточной” активации метаболизма растений и усиления восстановительных процессов [27].

Флавоноиды представляют собой один из наиболее распространенных в растениях классов соединений фенольной природы, которые накапливаются в листьях, что характерно и для гречихи [1, 15, 20]. Они обладают радикал-связывающими свойствами и способны нейтрализовать активные формы кислорода, количество которых возрастает при действии стрессоров [3, 4]. Полученные нами данные свидетельствуют о “стабильности” биосинтеза флавоноидов в семядольных листьях проростков двух генотипов гречихи и отсутствии влияния низкой положительной температуры на их накопление. Можно предположить, что у фенол-накапливающей культуры гречихи изменения в содержании этих вторичных метаболитов менее выражены в условиях стрессовых воздействий, по сравнению с низко-продукционными культурами [1, 19].

ФАЛ является важным ферментом в биосинтезе ФС, при участии которого *L*-фенилаланин превращается в первое соединение фенольного метаболизма – *транс*-коричную кислоту, служащую предшественником в образовании других ФС [1]. Во многих случаях ее активность рассматривают как показатель биосинтетической способности растительных тканей [7, 19]. В семядольных листьях проростков гречихи отмечена более высокая активность ФАЛ и повышенное накопление ФС по сравнению с таковыми в гипокотелях, что свидетельствует о взаимосвязи между этими параметрами.

При действии гипотермии отмечались изменения в активности ФАЛ. В надземных органах проростков ДГГ она снижалась, а у проростков ТГГ – сохранялась на уровне контроля при кратковременном ее воздействии. При длительном воздействии гипотермии у проростков ДГГ тенденция была аналогичной, тогда как у ТГГ в семядольных листьях активность фермента сохранялась на уровне контроля, а в гипокотелях – снижалась. Судя по литературным данным, низкие положительные температуры стабилизируют или активи-

руют ряд транскрипционных факторов у многих культур, тем самым стимулируя наряду с другими ферментами и экспрессию генов ФАЛ [28]. Однако, у проростков гречихи в условиях гипотермии наблюдалась иная тенденция, что может быть связано с отсутствием экспрессии генов ФАЛ и это требует дальнейших исследований.

Таким образом, нами впервые показано, что воздействие гипотермии приводило к изменениям изучаемых показателей у проростков ДГГ. Это проявлялось в ингибировании их роста, повышении уровня ПОЛ и в большинстве случаев уменьшении накопления ФС, что, вероятно обусловлено снижением активности ФАЛ или является следствием катаболизма этих вторичных метаболитов. У проростков ТГГ в условиях гипотермии изменений в количестве ФС не происходило, что коррелировало с активностью ФАЛ, за исключением варианта с длительным ее воздействием, когда активность фермента снижалась, а накопление этих вторичных метаболитов не изменялось. При этом в большинстве случаев ни кратковременное, ни длительное воздействие гипотермии не влияло на накопление отдельных классов ФС в различных органах проростков двух генотипов гречихи, за исключением гипокотилей, в которых содержание фенилпропаноидов снижалось, а антоцианов – увеличивалось, и этот эффект зависел от генотипа гречихи и длительности действия стрессового фактора. Не следует исключать и “зависимость” фенольного метаболизма от стадии онтогенеза растений, поскольку степень “зрелости” растительной ткани соответствует определенной стадии образования вторичных метаболитов [1, 22]. Большое значение имеет влияние на него внешних и внутренних факторов, а именно гипотермии и “дозы гена” (уровня ploидности) [1, 11, 12]. Следовательно, увеличение ploидности у проростков гречихи, возможно, способствует проявлению у них “буферной” функции, стабилизирующей ответные реакции на действие гипотермии, включая баланс ФС. Исходя из этого, полиплоидизацию можно рассматривать как один из путей увеличения биосинтетической способности растений, что особенно актуально для получения вторичных метаболитов, а также как один из подходов для дальнейшей селекционной работы по созданию индуцированных полиплоидов, обладающих повышенным содержанием биологически активных и фармакологически ценных соединений. Выяснение механизмов регуляции биосинтеза ФС в условиях действия низких температур при полиплоидизации растений представляет интерес для дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках темы государственного задания Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук № АААА-А19-119041890054-8.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zanprometov M.H.* Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. Москва: Наука. 1993. 272 с.
2. *Pichersky E., Noel J. P., Dudareva N.* Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity // *Science*. 2006. V. 311. P. 808.
3. *Mierziak J., Kostyn K., Kulma A.* Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment // *Molecules*. 2014. V. 19. P. 16240. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
4. *Naikoo M.I., Dar M.I., Raghib F., Jaleel H., Ahmad B., Raina A., Khan F.A., Naushin F.* Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: an overview // *Plant signaling molecules: role and regulation under stressful environments*. Eds. Khan M.I.R., Reddy P.S., Ferrante A., Khan N. Elsevier. Duxford, United Kingdom. 2019. P. 157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
5. *Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.J.* Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants. Springer: Cham. 2018. P. 300. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-015>
6. *Roleira F.M., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties // *Food Chem*. 2015. V. 183. P. 235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.039>
7. *Barros J., Dixon R.A.* Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases // *Trends Plant Sci*. 2019. V. 25. P. 66. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011>
8. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. Москва: Наука. 2007. 54 с.
9. *Vahdati K., Leslie C.* Abiotic stress – plant responses and applications in agriculture. Rijeka: Croatia. 2013. P. 420.
10. *Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B.* Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
11. *Król A., Amarowicz R., Weidner S.* The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves // *Plant Physiol*. 2015. V. 189. P. 97. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.002>
12. *Deng B., Du W., Liu C., Sun W., Tian S., Dong H.* Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? // *Plant Growth Regul*. 2012. V. 66. P. 37. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9626-6>
13. *Oustric J., Morillon R., Luro F., Herbette S., Lourkisti R., Giannettini J., Santini J.* Tetraploid Carrizo citrange

- rootstock (*Citrus sinensis* Osb. *Poncirus trifoliata* L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) // *Plant Physiol.* 2017. V. 214. P. 108.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.014>
14. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО “Офорт” СамГМУ. 2004. 1180 с.
 15. Krefi M. Buckwheat phenolic metabolites in health and disease // *Nutr. Res. Rev.* 2016. V. 29. P. 30.
<https://doi.org/10.1017/S0954422415000190>
 16. Ahmed A., Khalid N., Ahmad A., Abbasi N.A., Latif M.S.Z., Randhawa M.A. Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: a review // *J. Agricultural Science.* 2014. V. 152 (3). P. 349.
<https://doi.org/10.1017/S0021859613000166>
 17. Фесенко Н.В., Фесенко Н.Н., Романова О.И., Алексеева Е.С., Суворова Г.Н. Теоретические основы селекции. Т. 5. Генофонд и селекция крупяных культур. Гречиха. СПб.: ГНЦ РФ ВИР. 2006. 196 с.
 18. Sin'kevich M. S., Naraikina N.V., Trunova T.I. Processes hindering activation of lipid peroxidation in cold – tolerant plants under hypothermia // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 1020.
<https://doi.org/10.1134/S1021443711050232>
 19. Olenichenko N.A., Zagoskina N.V. Response of winter wheat to cold: production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. P. 600.
<https://doi.org/10.1007/s10438-005-0109-2>
 20. Zagoskina N.V., Kazantseva V.V., Fesenko A.N., Shirokova A.V. Accumulation of phenolic compounds at the initial steps of ontogenesis of *Fagopyrum esculentum* plants that differ in their ploidy levels // *Biol. Bull.* 2018. V. 45. P. 171.
<https://doi.org/10.1134/S1062359018020140>
 21. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
 22. Bidel L.P.R., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay Allemand C. Biological activity in plant cells // *Recent Adv. Polyphenol Res.* Eds. Santos-Buelga C., Escobedo-Bailon M., Lattanzio V. Oxford: Wiley-Blackwell. 2010. V. 2. P. 163.
<https://doi.org/10.1002/9781444323375.ch6>
 23. Scholes D.R., Paige K.N. Plasticity in ploidy: a generalized response to stress // *Trends in Plant Science.* 2015. V. 20 (3). P. 165.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.007>
 24. Wang W., He Y., Cao Z., Deng Z. Induction of tetraploids in *Impatiens walleriana* and characterization of their changes in morphology and resistance to downy mildew // *HortScience.* 2018. V. 53. P. 925.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13093-18>
 25. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // *Planta.* 2012. V. 235. P. 1091.
 26. Close D. C., Beadle C. L. The ecophysiology of foliar anthocyanin // *Bot. Rev.* 2003. V. 69. P. 149.
 27. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем. 2001. 160 с.
 28. Guo J., Zhou X., Wang T., Wang G., Cao F. Regulation of flavonoid metabolism in ginkgo leaves in response to different day – night temperature combinations // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 147. P. 133.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.12.009>

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus* НА СОДЕРЖАНИЕ H_2O_2 И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ИНГИБИТОРОВ ГИДРОЛАЗ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary¹

© 2021 г. Л. Г. Яруллина^а, *, В. О. Цветков^б, Г. Ф. Бурханова^а, А. В. Сорокань^а, Е. А. Заикина^а

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение

Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Башкирский государственный университет”, Уфа, Россия

*e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 02.03.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 17.03.2021 г.

Изучено влияние обработки различными штаммами бактерий *Bacillus subtilis* Cohn (штаммы 26Д и 11ВМ) и *B. thuringiensis* Berliner (штаммы В-5351 и В-6066) на содержание пероксида водорода (H_2O_2), активность антиоксидантных (каталазы, пероксидазы) и гидролитических (протеазы и амилазы) ферментов и экспрессию генов ингибиторов гидролаз в растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в связи с устойчивостью к возбудителю фитофтороза – оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Исследования проводили на 15-дневных растениях картофеля восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя Роза, выросших из микроклубней. Растения опрыскивали суспензией различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* (10^8 кл./мл). Спустя 5 суток часть растений инфицировали зооспорами *P. infestans* (10^5 спор/мл). Через 6, 24 и 48 ч после заражения растения фиксировали для оценки биохимических параметров. Выявлено снижение степени пораженности листьев *P. infestans* под влиянием обработки бактериями *B. subtilis* и *B. thuringiensis* в зависимости от штамма. Бактерии повышали устойчивость картофеля к инфицированию *P. infestans* за счет увеличения концентрации H_2O_2 и усиления экспрессии генов ингибиторов протеазы и амилазы. Выявлены различия в степени активации транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз под влиянием бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, что предполагает штамм-зависимые пути формирования устойчивости растений картофеля к возбудителю фитофтороза *P. infestans*.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Solanum tuberosum*, антиоксидантные ферменты, гидролазы, ингибиторы гидролаз, пероксид водорода, экспрессия генов индуцированная устойчивость

DOI: 10.31857/S0015330321060191

ВВЕДЕНИЕ

Фитофтороз – одно из опаснейших заболеваний картофеля, поражающее практически все части растения: листья, стебли, клубни, цветки и ягоды. Потери от инфицирования выражаются в снижении массы и качества клубней, гибели пораженной ботвы в период клубнеобразования и в массовом гниении клубней во время хранения.

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизированных пользователей по doi: 10.31857/S0015330321060191

Сокращения: PR-белки – патоген-индуцируемые белки, ИП – ингибиторы протеаз, ИСУ – индуцированная системная устойчивость, КАТ – каталаза, ПО – пероксидаза, СВЧ – реакция сверхчувствительности; СРРБ – стимулирующие рост растений бактерии, СПУ – системная приобретенная устойчивость, ФБ – фосфатный буфер.

Возбудитель фитофтороза – оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary является гембиотрофным патогеном, на начальных стадиях болезни проявляющим свойства биотрофа, а позднее переходящим на некротрофный тип питания. Инфицирование происходит путем проникновения зооспор через чечевички, устьица, места повреждения растительных тканей. Зооспорангии способны прорасти гифами, сразу инфицируя растение, либо образуют множество зооспор, каждая из которых способна к прорастанию [1].

Повышение устойчивости растений к патогенам является актуальным вопросом современного растениеводства. В связи с этим наиболее перспективными являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и почвенных микро-

организмов. Основу экологически безопасных препаратов для защиты растений от стрессов биотической и абиотической природы составляют стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) (или PGPB от Plant Growth Promoting Bacteria) [2]. Особенно привлекательными являются высокоэффективные и сохраняющие в течение длительного времени свою жизнеспособность бактерии рода *Bacillus*. На основе бактерий рода *Bacillus* разработаны многие биопрепараты для защиты растений от фитопатогенов, которые рассматриваются как перспективные агенты биологического контроля болезней и вредителей растений в силу их широко распространенного природного антагонизма ко многим фитопатогенным грибам [3].

Особенностью биопрепаратов на основе микроорганизмов является неспецифическая активация защитных механизмов растений. Известна способность некоторых представителей бактерий рода *Bacillus* эндофитно развиваться в тканях растений и подавлять рост и развитие возбудителей болезней посредством секреции гидролитических ферментов и низкомолекулярных липопептидов, запускающих в растениях генерацию пероксида водорода (H_2O_2) и оксипиноловую сигнальную защитную систему, регулируемую активностью ингибиторов протеиназ [4]. Защитное действие биопрепаратов на основе *Bacillus spp.* может быть обусловлено опосредованным участием H_2O_2 в усилении экспрессии генов PR-белков. Возможно, способствуя генерации АФК, бактерии рода *Bacillus* индуцируют передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов. Показано, что обработка растений *Bacillus subtilis* способствует развитию индуцированной системной устойчивости (ИСУ), опосредованной действием жасмоновой кислоты [5]. Однако формирование устойчивости растений к патогенам под воздействием бактерий рода *Bacillus* может развиваться и через салицилатный сигнальный путь по типу системной приобретенной устойчивости (СПУ) [6]. Несмотря на наличие большого количества данных о подавлении развития фитопатогенов бактериями рода *Bacillus*, механизмы формирования устойчивости под их воздействием остаются до конца не выясненными. Предполагается, что особенности формирования защитных реакций растений под действием бактерий рода *Bacillus* могут быть связаны с природой организма-продуцента [3].

Цель данной работы – изучение влияния различных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Cohn и *B. thuringiensis* Berliner на содержание пероксида водорода, активности антиоксидантных и гидролитических ферментов, транскрипционную активность генов ингибиторов гидролаз в растениях картофеля в связи с устойчивостью к возбудителю фитофтороза *P. infestans* (Mont.) de Bary.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе были использованы растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.), выросшие из микроклубней восприимчивого к фитофторозу сорта Ранняя Роза. Для получения растений микроклубни высаживали в контейнеры с грунтом “TerraVita” (Норд Палп, Россия), включающим верховой торф различной степени разложения, очищенный речной песок, перлит, комплексное минеральное удобрение и биогумус (рН 6.0–6.5), на глубину 3–4 см. Растения выращивали на светоплощадке в течение 15 суток, затем их инокулировали суспензионной культурой (5 мл/растение, конечный титр 10^8 кл/мл) штаммов бактерий *B. thuringiensis* В-6066 и В-5351, полученными из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, *B. subtilis* 26Д – из коммерческого биопрепарата “Фитоспорин-М” (“Башинком”, Россия) и *B. subtilis* 11ВМ – из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН.

Заражение растений и оценка симптомов болезни. Через 5 дней после обработки бактериями часть растений инфицировали суспензией зооспор (10^6 спор/мл) возбудителя фитофтороза *P. infestans* изолята Башкирский из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ РАН (5 мл/растение). Через 6, 24 и 48 ч после инфицирования контрольные и зараженные растения фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения биохимических исследований. Бактерии культивировали на жидкой среде Луриа-Бертани в течение 72 ч, затем суспензия была разбавлена дистиллированной водой до необходимой концентрации.

Развитие симптомов заболевания оценивали через 5 суток после инфицирования по % площади поражения листовой пластинки. Листья фотографировали, и цифровые изображения анализировали в программе ImageJ (“National Institutes of Health”, Bethesda, США).

Определение содержания H_2O_2 . Листья гомогенизировали в 0.025 М Na-фосфатном буфере (ФБ), рН 6.2, в соотношении 1 : 3 и центрифугировали 20 мин при 10000 g. Здесь и далее использовали центрифугу Eppendorf 5415R (“Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для определения содержания H_2O_2 . Содержание H_2O_2 определяли с использованием красителя ксиленолового оранжевого [7]. Реагент содержал 0.074% соли Мора в 5.81% серной кислоты и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82% сорбита (в соотношении 1 : 100). Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре Biospek-Mini (“Shimadzu”, Япония) при 560 нм.

Определение активности каталазы (КАТ). Для определения активности КАТ (КФ 1.11.1.6) растительную ткань гомогенизировали в 50 мМ растворе ФБ (рН 7.8). Соотношение массы навески к объе-

му буфера составляло 1 : 10. После центрифугирования в течение 10 мин при 12000 g супернатант использовали для анализа активности фермента [8]. Реакцию инициировали добавлением 0.1 мл супернатанта к 0.2 мл 0.03% раствора H_2O_2 . В контрольную пробу вместо супернатанта вносили 0.1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4% раствора молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре Biospek-Mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 410 нм. Активность КАТ рассчитывали по формуле:

$$E = (A_k - A_0) / (K \times V \times t),$$

где E – активность КАТ (мкат/л), A_k и A_0 – поглощение контрольной и опытной проб, соответственно, V – объем вносимой пробы, 0.1 мл, t – время инкубации, 600 с, K – коэффициент молярного поглощения H_2O_2 , равный 22.2×10^3 моль $^{-1}$ см $^{-1}$.

Определение активности пероксидазы (ПО). Для выделения цитоплазматической фракции ПО (КФ 1.11.1.7) отрезки листьев гомогенизировали в 0.01 М ФБ, pH 6.2. Отношение массы навески листьев к объему ФБ составляло 1 : 3. Экстракт центрифугировали 25 мин при 12000 g и супернатант использовали для анализа активности ПО. Активность ПО определяли микрометодом [9] по окислению субстрата – ортофенилендиамина. Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США) при 490 нм. За единицу ферментативной активности принимали изменение оптической плотности за 1 мин.

Оценка транскрипционной активности генов ингибиторов протеазы и амилазы картофеля. Тотальную РНК из растений выделяли с помощью тризола, согласно протоколу фирмы-поставщика (“Molecular Research Center, Inc.”, США). Для получения кДНК на основе мРНК изучаемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы, согласно протоколу фирмы-поставщика (“Синтол”, Россия). Анализ накопления транскриптов генов ингибитора амилазы (номер в GenBank XM006351484) и ингибитора протеазы (номер в GenBank JX683427) (Дополнительные материалы, таблица 1) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System” (“Bio-Rad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Изменения в транскрипционной активности генов (оценка числа копий мРНК для каждого гена) определяли на основании вычисления уровня нормализованной экспрессии с помощью программного обеспечения “iCycler iQ5 Real-Time Detection System software” (“Bio-Rad”, США). На

гистограммах представлены значения экспрессии генов по отношению к исходной точке (контроль без обработки).

Активность амилаз и протеаз определяли по гидролизу иммобилизованных крахмала и БСА, соответственно [10]. Субстраты ферментов с конечной концентрацией 1% иммобилизовали в 4% ПААГ. Растворы, обладающие ферментативной активностью, наносили на ПААГ, выдерживали 20 мин при 37°C, затем окрашивали раствором Люголя или Кумасси G-250. Активность ферментов определяли методом денситометрии по калибровочным кривым, построенным с использованием стандартных препаратов амилазы *Aspergillus niger* и бычьего трипсина (“Sigma”, США). Ферментативную активность выражали в мкмоль субстрата/(г белка мин). Содержание растворимого белка в образцах определяли по методу Брэдфорд.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 5-кратной биологической повторности. Биохимические параметры и транскрипционную активность измеряли не менее трех раз. На гистограммах показаны выборочные средние, а в качестве показателя погрешности показан 95% доверительный интервал. Для оценки достоверности различий выборочных средних проводили дисперсионный анализ ANOVA и последующий многограновый тест Дункана в программе Statistica 13 (уровень надежности 95%). Достоверно различающиеся значения обозначены на гистограммах разными буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние различных штаммов бактерий B. subtilis и B. thuringiensis на устойчивость растений картофеля к инфицированию P. infestans

Сравнительный анализ развития возбудителя фитофтороза на растениях картофеля восприимчивого сорта Ранняя Роза выявил различия в степени пораженности листьев *P. infestans* между контролем и вариантами с обработкой бактериями *B. subtilis* и *B. thuringiensis* (рис. 1). В контроле степень поражения листьев составляла $65 \pm 15\%$. Предобработка растений бактериями значительно снижала пораженность листьев: в вариантах опыта со штаммами *B. subtilis* 26Д и 11ВМ – до $20 \pm 11\%$, и $28 \pm 11\%$, а с обработкой штаммами *B. thuringiensis* В-6066 и В-5351 – до $36 \pm 13\%$ и $41 \pm 15\%$ соответственно. Результаты показали, что все исследуемые штаммы бактерий повышали устойчивость растительных тканей к инфицированию возбудителем фитофтороза, но в различной степени. Наиболее эффективное защитное действие на растения картофеля к инфицированию *P. infestans* оказывали бактерии *B. subtilis* 26Д, что согласуется с данными, полученными на клубнях *S. tuberosum* [11] и в культуре *in vitro* [12].

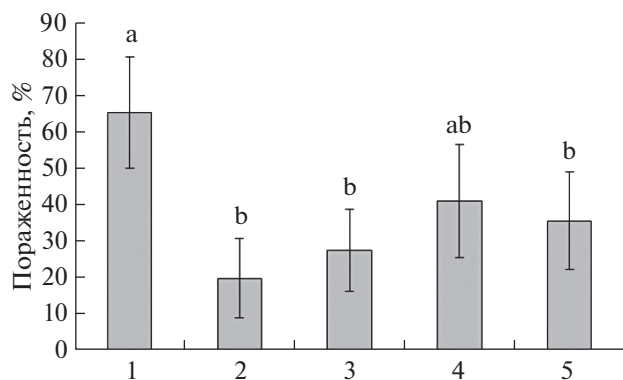


Рис. 1. Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на степень поражения листьев картофеля возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans* (1 – контроль, 2 – *Bacillus subtilis* 26D, 3 – *Bacillus subtilis* 11BM, 4 – *Bacillus thuringiensis* B-5351, 5 – *Bacillus thuringiensis* B-6066). Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения.

Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на содержание H₂O₂ в листьях картофеля при инфицировании *P. infestans*

Некоторые механизмы повышения устойчивости картофеля к инфицированию *P. infestans* под влиянием бактерий рода *Bacillus* могли быть связаны с изменением концентрации H₂O₂ в растительных тканях. Исследования показали, что в обработанных бактериями *B. subtilis* неинфицированных растениях накопление H₂O₂ происходило постепенно (рис. 2). Наиболее значимые различия по содержанию H₂O₂ между инокулированными *B. subtilis* 11BM и *B. thuringiensis* B-6066 и контрольными растениями выявлялись через 48 ч после инфицирования (рис. 2).

Возможно, это обусловлено антистрессовым воздействием метаболитов бактерий *B. subtilis*. Известно, что под воздействием эндофитных бактерий рода *Bacillus* индуцируется активность антиоксидантных ферментов [13]. В то же время, в листьях предобработанных бактериями растений при инфицировании *P. infestans* уровень H₂O₂ заметно повышался на раннем этапе (6 ч) инфекционного процесса, особенно под воздействием бактерий *B. subtilis* 26D и *B. thuringiensis* B-6066 (рис. 2). Однако через 48 ч после инфицирования концентрация H₂O₂ в растениях, обработанных различными штаммами бактерий рода *Bacillus*, не отличалась от контрольных инфицированных растений (рис. 2).

Как известно, устойчивость картофеля к возбудителю фитофтороза *P. infestans* во многом определяется развитием реакции сверхчувствительности (СВЧ). Это предполагает изменения концентрации H₂O₂ в растительных тканях в ответ на внедрение патогена. H₂O₂ можно рассматривать в качестве важнейшей молекулы, вовлеченной в передачу внутриклеточных сигналов, регулирующих экспрессию генов и активацию защитных систем растения. Повышение уровня H₂O₂ вызывает увеличение концентрации в цитозоле ионов кальция, выполняющих важную роль в процессах передачи сигнальной информации в геном растения [14]. Возможно, бактерии *B. subtilis* и *B. thuringiensis* способствуют ранней генерации АФК, индуцируют передачу сигналов, запускающих работу других защитных механизмов. Показано, что бактерии рода *Bacillus* повышают устойчивость растений к патогенам не только посредством секреции антибиотиков, но и в результате индукции накопления в зоне инфицирования фенолов и

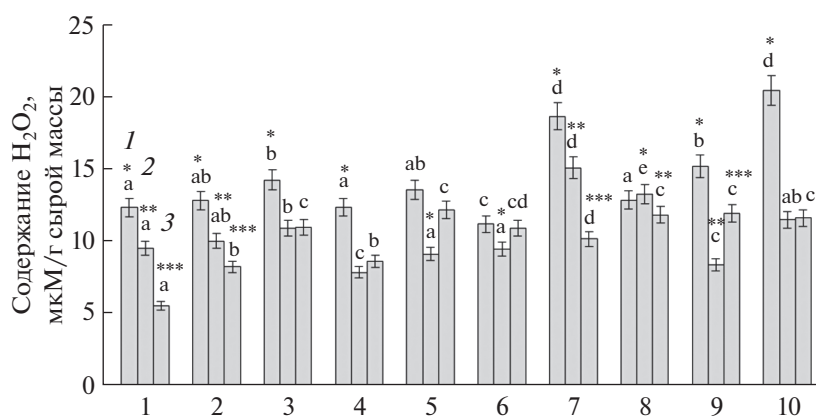


Рис. 2. Содержание H₂O₂ в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному времени эксперимента. Звездочками обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному варианту обработки, но различающиеся временем эксперимента.

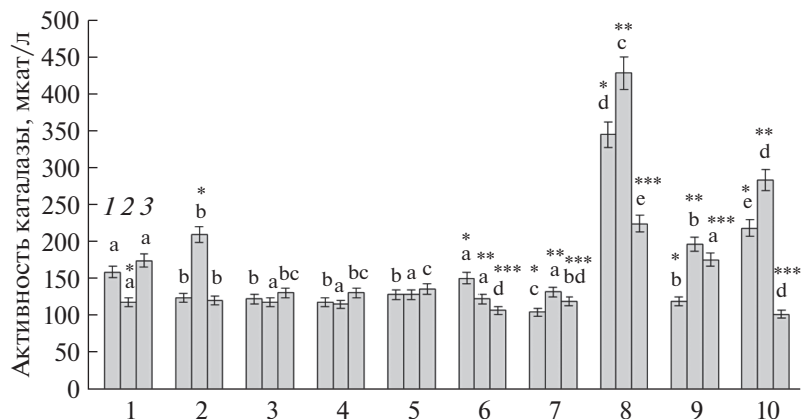


Рис. 3. Активность каталазы в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному времени эксперимента. Звездочками обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному варианту обработки, но различающиеся временем эксперимента.

ферментов про-/антиоксидантной системы [15]. Вероятно, СРРБ вызывают сенсбилизацию, то есть повышают чувствительность растительных тканей к проникновению патогенов и подготавливают защитную систему растений к последующим ранним ответным реакциям.

Влияние различных штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* на активность антиоксидантных ферментов в листьях картофеля при инфицировании *P. infestans*

Изменение концентрации H_2O_2 в растительных тканях при патогенезе может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности антиоксидантных ферментов. Важнейшим антиоксидантным ферментом является КАТ [16]. Активность КАТ в отсутствие заражения достоверно повышалась лишь в растениях, обработанных штаммом *B. subtilis* 26D (рис. 3). В необработанных растениях при заражении фитотфторой выявлено снижение активности КАТ в ходе инфекционного процесса. Существенное повышение активности КАТ проявлялось на протяжении 24 ч в инфицированных растениях, предобработанных штаммом *B. thuringiensis* B-6066, но особенно, штаммом *B. subtilis* 11BM (рис. 3).

Активность КАТ может существенно модифицироваться с участием сигнальных молекул. H_2O_2 является не только сигнальной молекулой, но и субстратом КАТ. В то же время ее воздействие на активность КАТ у растений неоднозначно. Например, в проростках пшеницы H_2O_2 в зависимости от концентрации либо ингибировала [17], либо сти-

мулировала [18] активность КАТ. Способностью к ингибированию КАТ обладает и салициловая кислота, что является одним из механизмов развития СВЧ-реакции. Ингибирование фермента под действием салициловой кислоты может приводить в дальнейшем к активации экспрессии гена КАТ и усилению синтеза фермента [19].

Ферментом, вовлеченным как в систему генерации, так и утилизации H_2O_2 , является пероксидаза (ПО). Основной функцией ПО является защита растительного организма от воздействия АФК и непосредственное участие в процессах дифференциации тканей и органов высших растений.

В незараженных растениях только обработка штаммом *B. subtilis* 11BM приводила к повышению активности ПО по сравнению с контрольными растениями (рис. 4). Активность ПО в зараженных растениях по сравнению с незараженными повышалась через 24 ч после инфицирования *P. infestans*. Можно отметить, что в инфицированных растениях все исследованные штаммы бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* вызывали повышение активности ПО по сравнению с контролем, подобно заражению фитотфторой.

Важной особенностью ПО является ее способность переключаться на каталазную активность, предотвращая образование избытка H_2O_2 . Такое явление, в частности, зарегистрировано для нескольких форм апопластных пероксидаз [20]. Обширное мультигенное семейство классических ПО растений класса III участвует также в укреплении клеточных стенок за счет окислительных реакций между белками и фенолами, катализируя процесс отложения лигнина, что повышает их

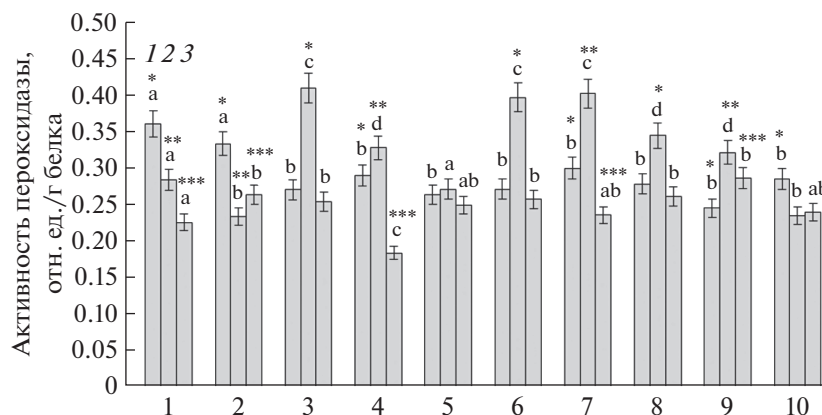


Рис. 4. Активность пероксидазы в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11ВМ, 4 – *B. thuringiensis* В-5351, 5 – *B. thuringiensis* В-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11ВМ + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* В-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* В-6066 + *P. infestans*): 1 – 6 ч, 2 – 24 ч, 3 – 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному времени эксперимента. Звездочками обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному варианту обработки, но различающиеся временем эксперимента.

устойчивость к действию гидролаз патогенов. Вероятно, регуляция содержания H₂O₂ в растениях картофеля под действием бактерий рода *Bacillus* может происходить различными путями: через снижение активности КАТ и путем модулирующего воздействия на активность ПО.

Влияние различных штаммов бактерий

B. subtilis и *B. thuringiensis* на транскрипционную активность генов ингибиторов протеазы и амилазы и активность ферментов в растениях картофеля при инфицировании *P. infestans*

Важнейшим компонентом оценки воздействия патогена на растения являются продуцируемые ими гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки растений и обеспечивающие его проникновение в ткани [21]. Ответная защитная реакция растений сопровождается синтезом ингибиторов этих ферментов [22].

Обработка всеми исследованными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, как и инфицирование *P. infestans*, стимулировала накопление транскриптов гена ингибитора амилазы в растениях картофеля по сравнению с контрольными растениями. Обработка штаммами бактерий *B. thuringiensis* В-5351 и *B. thuringiensis* В-6066 приводила к достоверному повышению уровня транскрипции гена ингибитора амилазы в инфицированных растениях по сравнению с неинфицированными. Следует отметить, что наибольший уровень транскрипционной активности гена ингибитора протеазы наблюдался при обработке картофеля штаммом бактерий *B. thuringiensis* В-6066 как в неинфицированных, так и в инфицированных растениях (рис. 5). Вероятно, в ответ

на инфицирование *P. infestans* в растениях картофеля могут синтезироваться *de novo* ингибиторы ферментов, которые способны подавлять активность амилаз и протеиназ. Повышение содержания ингибиторов гидролаз в растении происходит, как правило, не за счет увеличения концентрации конститутивных соединений, а за счет синтеза новых форм ингибиторов [23]. Наиболее распространенными в растениях являются ингибиторы протеаз и амилаз [20].

Известно, что амилолитическая активность характерна для представителей большинства таксономических групп возбудителей болезней растений, и почти всегда эти ферменты представлены конститутивными белками. Однако амилаза отсутствует у оомицетов, в частности у представителей рода *Phytophthora*, которые используют для расщепления крахмала ферменты картофеля, активируя их биосинтез в пораженных тканях [24]. Можно предположить, что повышение уровня транскрипционной активности высокоспецифичных ингибиторов амилаз под действием бактериальных метаболитов препятствует росту и развитию *P. infestans* в растительных тканях.

Наши исследования показали, что в обработанных *B. thuringiensis* В-5351 неинфицированных растениях активность амилаз была достоверно ниже, чем в контроле, в то же время обработка картофеля *B. subtilis* 11ВМ приводила к заметному повышению этого показателя (рис. 6). Активность протеаз в зараженных растениях достоверно понижалась при обработке *B. thuringiensis* В-6066.

Высокая протеолитическая активность в зараженных тканях не только обеспечивает аминокислотами рост и развитие патогенного микроорганиз-

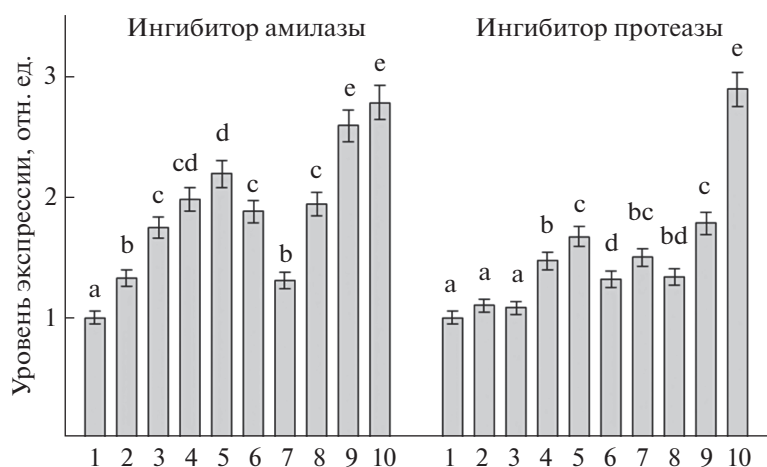


Рис. 5. Транскрипционная активность генов ингибиторов амилазы и протеазы в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному гену.

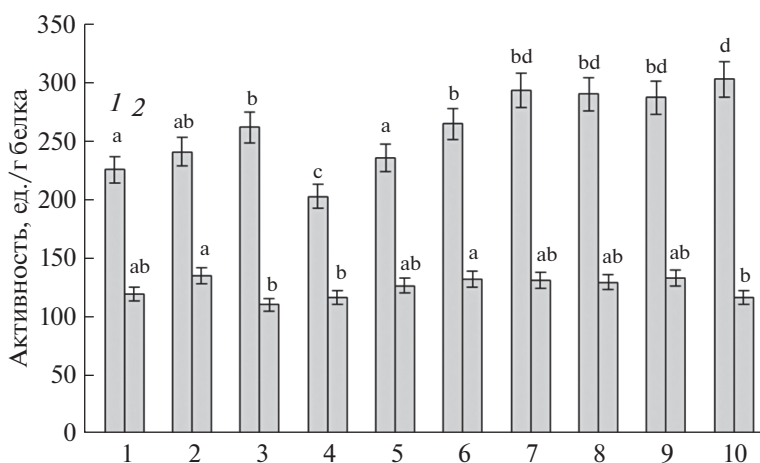


Рис. 6. Активность амилаз (1) и протеаз (2) в растениях картофеля при обработке различными штаммами бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* и инфицировании *P. infestans* (1 – контроль, 2 – *B. subtilis* 26D, 3 – *B. subtilis* 11BM, 4 – *B. thuringiensis* B-5351, 5 – *B. thuringiensis* B-6066, 6 – *P. infestans*, 7 – *B. subtilis* 26D + *P. infestans*, 8 – *B. subtilis* 11BM + *P. infestans*, 9 – *B. thuringiensis* B-5351 + *P. infestans*, 10 – *B. thuringiensis* B-6066 + *P. infestans*): 48 ч после инфицирования. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения, относящиеся к одному ферменту.

ма, но и может нейтрализовать защитные белки картофеля, такие как лектины – ингибиторы гидролаз. Так, показано, что экстрацеллюлярная металлопротеиназа фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* (Jones) Waldee расщепляет лектин картофеля, принимающий участие в защите растений [25]. Повышение транскрипционной активности гена ингибитора протеазы направлено на подавление активности ингибиторов экзогенных протеаз и способствует повышению устойчивости картофеля. Ключевую роль в инициации образования ингибиторов протеаз защитной реакции иг-

рает мембранный рецептор системин, белок с молекулярной массой около 160 кДа [26]. Реагируя на повреждение, он вызывает деполяризацию мембраны, что приводит к открытию ионных каналов и резкому повышению уровня внутриклеточного содержания ионов кальция. В результате активируются MAP-киназы и фосфолипазы, и в ходе ряда реакций образуется жасмоновая кислота, которая, вероятно, и служит активатором транскрипции генов защитных белков [27].

Предполагается, что у СРРМ существуют индивидуальные для каждого штамма соединения, вы-

рабатываемые и секретируемые во внеклеточную среду. Например, пептиды с антибиотическими свойствами, а также универсальные сигнальные молекулы – этилен, салициловая и жасмоновая кислоты [28]. Например, в формирование устойчивости растений перца к бактериальной гнили *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* под влиянием штамма *B. cereus* BS107 вовлекались гены защитных PR-белков, активируемых при патогенезе, часть которых, например, PR-1, индуцировались салициловой кислотой, часть (PR-4, PR-10) – жасмоновой кислотой и этиленом, а часть – H₂O₂ [29]. Показано, что инокуляция растений томата штаммом *B. subtilis* ВЕВ-DN приводила к усилению экспрессии ряда генов ИСУ, среди которых наибольшей активностью характеризовались гены ингибиторов протеаз и ферментов синтеза лигнина [30].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм активации защитных систем в растениях картофеля различными штаммами бактерий рода *Bacillus* связан с накоплением H₂O₂, повышением активности антиоксидантных ферментов и ингибиторов гидролаз. Выявленные различия в степени активации транскрипционной активности генов ингибиторов гидролаз под влиянием бактерий *B. subtilis* и *B. thuringiensis* предполагают штамм-зависимые пути формирования устойчивости картофеля к *P. infestans*.

Работа выполнялась частично по теме госзадания (номер государственной регистрации АААА-А21-121011990120-7), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-516-00005, на оборудовании Центра коллективного пользования “Биомика” (Отделение биохимических исследований и нанобиотехнологии Регионального центра коллективного пользования “Агидель”) и Уникальной научной установки “Кодинк”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новотельнова Н.С., Пыстина К.А., Голубева О.Г. Фитофторовые грибы (Сем. *Phytophthora* spp.). Л.: Наука, 1974. 208 с.
2. Verma P., Yadav A.N., Kumar V., Singh D.P., Saxena A.K. Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement // Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives / Eds. Singh D.P., Singh H.B., Prabha R. Singapore: Springer, 2017. P. 543.
3. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. Москва: Наука, 2007. 148 с.
4. Yarullina L.G., Kasimova R.I., Kuluev B.R., Surina O.B., Yarullina L.M., Ibragimov R.I. Comparative study of bunt pathogen resistance to the effects of fungicides in callus co-cultures *Triticum aestivum* with *Tilletia caries* // Agricultural Sciences. 2014. V. 5. P. 906. <https://doi.org/10.4236/as.2014.510098>
5. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. Jasmonic acid: biosynthesis, functions and role in plant development // Series Plant Science Research and Practices / Ed. Morrison L. USA: Nova Science Publishers, 2015. P. 33.
6. Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J., Ongena M. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 87. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
7. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoptotic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x>
8. Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И., Цветков В.О., Яруллина Л.М., Шпирная И.А. Цитохимические и биохимические методы исследования микроорганизмов – возбудителей болезней растений: учебное пособие. Уфа: РИЦ БашГУ, 2016. 92 с.
9. Maksimov I.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Abizgildina P.P. Regulation of peroxidase activity under the influence of signaling molecules and *Bacillus subtilis* 26D in potato plants infected with *Phytophthora infestans* // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 173. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020136>
10. Цветков В.О., Шпирная И.А., Максимова В.О., Ибрагимов Р.И. Определение активности амилазы и протеаз с использованием субстратов, иммобилизованных в полиакриламидном геле // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018. № 3–5. С. 81.
11. Yarullina L.G., Akhatova A.R., Kasimova R.I. Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant-pathogen interactions // Rus. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 193. <https://doi.org/10.1134/S1021443716020151>
12. Yarullina L.G., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Tsvetkov V.O. Signal regulation of activity of protective proteins in potato plants *in vitro* with the defeat potato late blight // Theoretical and Applied Ecology. 2019. № 4. P. 136. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-136-141>
13. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 11. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
14. Chanda B., Xia Y., Mandal M.K., Sekine K.T., Gao Q.M., Selote D. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants // Nat. Genet.

2011. V. 43. № 5. P. 421.
<https://doi.org/10.1038/ng.798>
15. White J.F., Torres M.S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? // *Physiol. Plant.* 2010. V. 138. P. 440.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01332.x>
 16. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. № 9. P. 405.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
 17. Bakalova S., Nikolova A., Wedera D. Isoenzyme profiles of peroxidase catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds // *J. Plant Physiol.* 2004. V. 30. P. 64.
 18. Колупнаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа. 2010. 352 с.
 19. Guan L.M., Scandalios J.G. Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. № 8. P. 1182.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00212-4)
 20. Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A., Beckett R.P., Luthje S., Vylegzhanina N., Buck F., Bottger M. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // *Plant, Cell & Environment.* 2009. V. 32. P. 497.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01944.x>
 21. Maksimov I.V., Sorokan' A.V., Cherepanova E.A., Surina O.B., Troshina N.B., Yarullina L.G. Effects of salicylic and jasmonic acids on the components of pro/antioxidant system in potato plants infected with late blight // *Rus. J. Plant Physiol.* 2011. V. 58. P. 299.
<https://doi.org/10.1134/S1021443711010109>
 22. Yarullina L.G., Kasimova R.I., Akhatova A.R., Maksimov I.V., Ibragimov R.I., Umarov I.A. Qualitative and quantitative changes of potato tuber proteome under the influence of signal molecules and infection with *Phytophthora infestans* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. P. 71.
<https://doi.org/10.1134/S0003683816010154>
 23. Lastochkina O.V., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat // *Wheat Production in Changing Environments. Responses, Adaptation and Tolerance* / Eds. Hasanuzzaman M., Nahar K., Hossain A. Singapore: Springer, 2019. P. 579.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7_23
 24. Gappa-Adachi R., Yano I.K., Takeuchi S., Morita Y., Uematsu S. Phytophthora blight of southern star (*Oxyptalum caeruleum*) caused by *Phytophthora palmivora* in Japan // *J. Gen Plant Pathol.* 2012. V. 78. P. 39.
<https://doi.org/10.1007/s10327-011-0351-9>
 25. Feng T., Nyffenegger C., Hojrup P., Vidal-Melgosa S., Yan K., Ulrik Fangel J., Meyer A.S., Kirpekar F. Characterization of an extension-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 24. P. 10077.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5877-2>
 26. Gancheva M.S., Malovichko Y.V., Poliushkevich L.O., Dodueva I.E., Lutova L.A. Plant peptide hormones // *Rus. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 171.
<https://doi.org/10.1134/S1021443719010072>
 27. Vasyukova N.I., Ozeretskorskaya O.L. Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues // *Rus. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 581.
<https://doi.org/10.1134/S102144370905001X>
 28. Schoonbeek H.J., Jacquat-Bovet A.C., Mascher F., Métraux J.P. Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007. V. 20. № 12. P. 1535.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-12-1535>
 29. Yang J.W., Yu S.H., Ryu C.-M. Priming of defense related genes confers root-colonizing Bacilli-elicited induced systemic resistance in pepper // *Plant Pathol. J.* 2009. V. 25. P. 389.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.2009.25.4.389>
 30. Valenzuela-Soto J.H., Estrada-Hernández M.G., Laclette E.I., Délano-Frier J.P. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development // *Planta.* 2010. V. 231. P. 397.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-1061-9>