

СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 2, 2021

ОБЗОРЫ

- Молекулярный диалог растений с патогенами: эволюция, механизмы и практическое использование
Э. Е. Хавкин 115
- Химические ингибиторы фотосистемы II
С. К. Жармухамедов, С. И. Аллахвердиев 132
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Пластидные РНК-полимеразы ядерного кодирования являются компонентами антероградного контроля гормональной регуляции экспрессии хлоропластных генов
И. А. Бычков, А. А. Андреева, Н. В. Кудрякова, Е. С. Пожидаева, А. С. Дорошенко, В. В. Кузнецов 151
- Влияние 24-эпибрассинолида на водный обмен отличающихся по засухоустойчивости сортов пшеницы при осмотическом стрессе
М. В. Безрукова, Г. Р. Кудоярова, А. Р. Лубянова, Д. Р. Масленникова, Ф. М. Шакирова 161
- Стимулирующий эффект лектинов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* на всхожесть и морфометрические характеристики проростков яровой пшеницы при смоделированных абиотических стрессах
С. А. Аленькина, В. Е. Никитина 170
- АФК-зависимое индуцирование гемом антиоксидантной системы и теплоустойчивости проростков пшеницы
Ю. Е. Колупаев, М. А. Шкляревский, Ю. В. Карпец, Н. В. Швиденко, А. А. Луговая 177
- Роль эпигенетических механизмов в регуляции активности 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при гипоксии
А. Т. Епринцев, Д. Н. Федорин, Г. Б. Анохина, М. О. Гатауллина 187
- Влияние светодиодного освещения на морфогенез, содержание аскорбиновой кислоты, Р, К, Са в растениях *Eruca sativa*
О. В. Наконечная, О. В. Грищенко, Ю. А. Хроленко, В. П. Булгаков, Е. В. Бурковская, В. П. Григорчук, Н. А. Прокуда, А. С. Холин, И. В. Гафицкая, А. В. Михеева, И. Ю. Орловская, М. Л. Бурдуковский, Е. П. Субботин, Ю. Н. Кульчин 194
-

ЛЕКЦИИ В ЖУРНАЛЕ

- О качественном составе липидов мембран растительных клеток
А. В. Жуков 206
-
-

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИАЛОГ РАСТЕНИЙ С ПАТОГЕНАМИ: ЭВОЛЮЦИЯ, МЕХАНИЗМЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

© 2021 г. Э. Е. Хавкин^а, *

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки,
Институт сельскохозяйственной биотехнологии Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: emil.khavkin@gmail.com

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 24.06.2020 г.

Принята к публикации 26.06.2020 г.

Болезни растений повсеместно угрожают устойчивости сельского хозяйства. С точки зрения экономики и экологии наиболее эффективным способом борьбы с болезнями является создание новых сортов растений с долговременной и стабильной устойчивостью. Успеху в решении этой задачи в последние годы немало способствовали поразительные достижения в изучении патогенов и растений-хозяев, которые во многом опираются на новейшие методы исследования строения и активности генов, в первую очередь, “омик” технологии. Эти достижения наглядно представлены в случае фитофтороза – экономически наиболее значимой болезни картофеля и томатов (*Solanum* L.). Фитофтороз часто служит моделью многомерных взаимодействий растений с микроорганизмами, и результаты новых исследований существенно меняют наши общие представления о молекулярном диалоге растения с патогеном и наши подходы к борьбе с болезнями. В этом обзоре основное внимание сосредоточено на геноме возбудителя болезни – оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и уже охарактеризованных генах вирулентности. Эволюция этого генома определяет исключительную генетическую и фенотипическую пластичность патогена. Особого внимания заслуживают сами орудия вирулентности – эффекторы, которые взаимодействуют с молекулами-мишенями картофеля, воздействуя на физиологию растения и способствуя его колонизации патогеном. Обращаясь к преградам, выстроенным растением для защиты от болезни, автор рассматривает полиморфизм и эволюцию генов *Solanum*, определяющих устойчивость картофеля к *P. infestans*. Репертуар генов вирулентности *P. infestans* в агроценозах и разнообразие генов устойчивости у дикорастущих сородичей картофеля анализируются в связи с практическим применением результатов новых молекулярных исследований фитофтороза. При многоплановом подходе к этой проблеме поиски новых генов устойчивости в генетических коллекциях, определение их функций и пирамидирование этих генов в сортах картофеля с целью создать новые доноры долговременной устойчивости сочетаются с оперативным анализом генов вирулентности патогена.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, виды *Solanum*, иммунитет растений, фитофтороз, картофель, долговременная устойчивость, взаимоотношения патогена с растением-хозяином, гены вирулентности, гены устойчивости, эволюция, секвенирование геномов и транскриптомов

DOI: 10.31857/S001533032102007X

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире болезни растений постоянно бросают вызов устойчивому земледелию. С точки

зрения экономики и экологии наиболее эффективным способом борьбы с болезнями является создание новых сортов растений с долговременной и стабильной устойчивостью. Устойчивость можно эмпирически определить как долговременную и стабильную (durable), если она сохраняется на высоком уровне при длительном возделывании культуры на значительной территории и в условиях, благоприятных для развития болезни. Различение “свой – чужой” – это ключ к реакции растений на вторжение патогена. В дарвиновской парадигме коэволюцию двух участников взаимодействия патогена с растением-хозяином при естественном отборе в ненарушенной природной среде можно сравнивать с процессами селекции растений в нарушенной среде агроценозов. В обоих случаях мы наблюдаем дорогостоящий

Сокращения: GM – генетическая модификация; AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism; Avr – Avirulence; CC-NB-LRR – Coiled Coil – Nucleotide Binding – Leucine Rich Repeat; dRenSeq – diagnostic Resistance gene enrichment Sequencing; ETI – Effector Triggered Immunity; HR – Hypersensitive Response; MAMP – Microbe Associated Molecular Pattern; NGS – next generation sequencing; PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern; PenSeq – Pathogen target enrichment Sequencing; PR proteins – pathogenesis-related proteins; PTI – PAMP-Triggered Immunity; QTL – Quantitative Trait Locus; RenSeq – Resistance gene enrichment Sequencing; RGA – Resistance Gene Analogue; RLK – Receptor-Like Kinase; Rpi – Resistance to *Phytophthora infestans*; RXLR – arginine-any amino acid-leucine-arginine motif; SNP – Single Nucleotide Polymorphism.

отбор (high fitness cost) — у патогена на вирулентность, а у растений на высокую устойчивость [1, 2]. Молекулярные исследования последних лет значительно углубили наше видение взаимодействия растений и патогенов, столь важного для эффективного контроля болезней. Поэтому выяснение генетических связей и молекулярных механизмов вирулентности и устойчивости необходимо для успешной селекции на долговременную устойчивость к болезням.

В последние годы успехам в создании долговременной устойчивости немало способствовали поразительные достижения в изучении патогенов и растений-хозяев, которые во многом опираются на новейшие методы исследования строения и активности генов, в первую очередь, “омик” технологии. Успехи этих исследований наглядно представлены в случае фитофтороза — экономически наиболее важной болезни картофеля и томатов (возбудитель — оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary). Фитофтороз часто служит моделью многоярусного взаимодействия растений с микроорганизмами, и результаты новых исследований существенно меняют как наши общие представления о молекулярном диалоге растения с патогеном, так и наши подходы к борьбе с фитофторозом.

Фитофтороз постоянно угрожает глобальной продовольственной безопасности, облагая картофелеводов налогом, достигающим 10 млрд. долларов в год, если учитывать прямые потери урожая и стоимость химической защиты растений [3–6]. Фунгициды (оомицетиды), которые применяют сегодня для борьбы с этим безжалостным патогеном, угрожают здоровью людей и биосфере в целом. По всей видимости, наиболее эффективным и экологически приемлемым путем сдерживания фитофтороза является создание новых сортов картофеля с долговременной устойчивостью к этой болезни [7–10]. Успешную селекцию на долговременную устойчивость к фитофторозу питает приток новых знаний о биологии патогена *P. infestans* и растения-хозяина *Solanum* L., в первую очередь, знаний о молекулах — инструментах вирулентности патогена и устойчивости растения [11–17].

Когда задачей селекции является долговременная и стабильная устойчивость к фитофторозу, пристальное внимание обращают на такие определяющие стороны *P. infestans*, как функциональное разнообразие факторов вирулентности патогена и невероятная пластичность его генома, которая обеспечивает быстрые изменения в составе факторов вирулентности и ярко проявляется в популяционном поведении патогена [5, 6, 18–20]. Молекулярные исследования играют все возрастающую роль в изучении многослойной защиты растений [1, 12, 21]. В результате мы во все большей степени можем оценить сложность молекулярного диалога между картофелем и *P. infestans*,

который так драматично проявляется в эпидемиях фитофтороза [5, 6, 22].

Наиболее наглядным проявлением устойчивости картофеля к *P. infestans* служит защитная реакция, связанная со смертью клеток в ходе реакции сверхчувствительности (hypersensitive response, HR) вслед за вторжением патогена в клетки растения и переносом в растение специфичных эффекторов, которые действуют как факторы (а)вирулентности (*Avr* факторы). Поэтому *Avr* генам и их продуктам — эффекторам, распознаваемым защитными системами растения, уделяется сегодня так много внимания в молекулярных исследованиях патогена [16, 23–26]. Не менее важны и механизмы, используемые растениями для распознавания и отпора патогенам. Лучше других изучены случаи, когда *Avr* гены распознаются соответствующими (matching) генами устойчивости к *P. infestans* (*Rpi* генами), кодирующими иммунные рецепторные белки. Все охарактеризованные к настоящему времени рецепторы эффекторов *P. infestans* у картофеля относятся к классу coiled coil — nucleotide binding — leucine rich repeat (CC-NB-LRR) внутриклеточных белков растений. Новые сведения об *Avr* и *Rpi* генах и их взаимодействиях быстро расширяют научную основу столь разных технологий селекции, как отдаленные скрещивания или транс- и цисгенез, используемые для переноса *Rpi* генов из дикорастущих видов *Solanum* в восприимчивые сорта картофеля [7–9, 27–29].

Тем не менее, вследствие быстрой эволюции генома и вторжения новых штаммов *P. infestans*, эпифитотии фитофтороза постоянно прорывают выстроенные селекционерами заграждения, обращая в ничто, иногда в течение нескольких дней, их многолетние усилия [5, 6, 19]. Поэтому неотложной задачей биологов растений является постоянный поиск новых источников устойчивости к фитофторозу, по преимуществу в генетическом материале дикорастущих видов *Solanum*, расширение круга *Rpi* генов, подробно исследованных и документированных молекулярными методами [17, 29–31], и выявление лучших сочетаний генов для включения их в перспективные сорта картофеля [32].

В случае картофеля молекулярные исследования с использованием новых методов анализа строения и активности *Avr* генов *P. infestans* и *Rpi* генов дикорастущих и культурных растений *Solanum* значительно способствуют борьбе с фитофторозом. Среди наиболее значимых методологических прорывов выделяются так называемые “омик” технологии (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и эффектормика), молекулярная цитогенетика, новые типы ДНК маркеров, поиск новых аллелей *Rpi* генов (allele mining) и, наконец, методы секвенирования нового поколения

(next generation sequencing, NGS) полноразмерных геномов и транскриптомов или избранных генов-мишеней (target genes) – в сочетании с биоинформационным анализом больших массивов данных о геномах и транскриптомах растения и патогена. Эти прорывные методологии позволили идентифицировать на молекулярном уровне многих участников взаимодействий ген-на-ген, описанных ранее классическими генетическими методами. Успехи этих исследований сделали фитотрофуз популярной моделью взаимодействия и коэволюции патогена и растения-хозяина [12, 15–17, 22, 28, 33–39]. В то же время новый контекст исследований геномов и новый молекулярный инструментарий этих исследований позволяют создавать более продуктивные сорта картофеля.

Во многих отношениях этот обзор следует за предыдущей публикацией автора [39]. Здесь в центре внимания оказались новейшие методологии исследования и недавние обзоры, объединившие инновационные идеи эволюции растений и микроорганизмов с новыми концепциями фитопатологии и селекции растений. Библиография доведена до июня 2020 г.

РАСПОЗНАВАНИЕ ПАТОГЕНА И ЗАЩИТНЫЕ БАРЬЕРЫ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Иммунитет, индуцированный молекулярными структурами (Pattern-triggered immunity). Чтобы распознавать многочисленных патогенов, сдерживать их вторжение и ограничивать повреждающее действие, растения создали сложную иммунную систему, которую часто описывают как два барьера или уровня защиты [1, 12, 40, 41]. Первый, все еще недостаточно исследованный барьер врожденного иммунитета (innate immunity) на поверхности клетки обычно обеспечивает широкий спектр устойчивости. Преграду для вторжения патогена на внеклеточном интерфейсе растение-микроорганизм (в апопласте клетки) описывают как иммунитет, запускаемый общими элиситорами, которые называют молекулярными структурами микроорганизма или патогена (microbe- and pathogen-associated molecular patterns, MAMPs and PAMPs); реакция на эти элиситоры получила общее название иммунитета, вызванного молекулярными структурами патогена (pattern-triggered immunity, PTI). Рецепторы на поверхности клетки, узнающие PAMPs или MAMPs, представлены преимущественно рецептор-подобными киназами (receptor-like kinases, RLKs) и рецептор-подобными белками (receptor-like proteins, RLPs). Далеко не все RLKs и RLPs служат рецепторами, некоторые являются ко-рецепторами, каркасными белками или другими участниками сигнальных путей [40, 42].

При вторжении патогена в апопласт в растениях накапливаются антимикробные соединения, при-

мером которых являются белки, связанные с патогенезом (pathogenesis-related, PR). Большинство PR генов индуцируются сигнальными соединениями: так, салициловая и жасмоновая кислоты или этилен экспрессируются волнами на протяжении процесса колонизации растения; помимо устойчивости к патогенам, PR белки служат специфичными маркерами системной приобретенной устойчивости, индуцированной патогеном [20, 43]. В свою очередь, *P. infestans* секретирует ферменты, которые могут подавлять такую защиту растений; к их числу относятся протеазы и ферменты, разрушающие клеточные стенки растения: пектацелилазы, полигалактуроназы, ксиланазы и т.д.

Полигенную и частичную устойчивость к фитотрофузу, возникающую вследствие РТИ, не адаптированного по отношению к определенному растению-хозяину, также называют полевой, количественной и расонеспецифичной устойчивостью. Она не является долговременной [9, 10, 14]. Более перспективными для создания долговременной устойчивости на основе РТИ представляются гены-кандидаты, выявляемые методами ассоциативных генетических исследований, полногеномных ассоциативных исследований и сравнительного анализа транскриптов (transcript profiling). Эти гены кодируют ключевые ферменты синтеза гормонов растений, которые участвуют в защитном сигналинге: аллен-оксид синтазу и липооксигеназы из жасмонатного сигнального пути, 3-окси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктазу из мевалонатного пути и цитохром P450, участвующий в биосинтезе терпенов, а также анионную пероксидазу, участвующую в процессе суберинизации клеточной стенки [44, 45].

Иммунитет, индуцированный эффекторами (Effector-triggered immunity). В отличие от неадаптированного апопластного иммунитета, адаптированные к определенному хозяину (host-adapted) патогены секретируют в клетки растений многочисленные эффекторы, которые кодируются генами вирулентности и доставляются в клетки растения-хозяина с помощью специфичных структур и механизмов [22, 24, 46, 47]. Патогенезу, в котором участвуют эффекторы, у растений противостоит вторая, цитоплазматический барьер, где эффекторы опознаются внутриклеточными RLKs. Этот процесс иммунитета, запускаемого эффекторами (effector-triggered immunity, ETI), специфично различает расы патогена. РТИ и ETI активируют сложную сеть передачи сигналов, которая включает каскады митоген-активируемых киназ и/или химический сигналинг при участии гормонов растений, а также регуляцию на уровне транскрипции: все эти сигналы приводят к таким физиологическим изменениям в растении, как HR, образование активных форм кислорода и упрочнение клеточной стенки [12, 21, 23, 40, 43, 48]. В обновленной модели взаимодействия растения

с патогеном интегрированы три уровня: распознавание, интеграция сигналов и реализация защитной реакции [22]. Сегодня этот континуум взаимодействия растения с патогеном стал горячей точкой молекулярной фитопатологии.

Когда-то новаторская парадигма “ген-на-ген” [49] предполагала, что устойчивость растения наблюдается, когда доминантный ген устойчивости растения встречается доминантный *Avr* ген патогена. Биохимической версией этой концепции является модель рецептор-лиганд, в соответствии с которой растения используют для защиты белки, распознающие продукты *Avr* генов патогена. Однако сегодня эту классическую модель считают сильно упрощенной, даже в случае моногенных взаимодействий ген-на-ген в цитоплазме растения. Во-первых, лишь в редких случаях засвидетельствованы прямые стерические взаимодействия белковых продуктов генов вирулентности и генов устойчивости, поэтому модель прямого взаимодействия по типу рецептор-лиганд дополнена моделями непрямого взаимодействия, например, “сторожа” (*guard*) и “ловушки” (*decoy*). Далее, наряду с моногенным взаимодействием, известно немало случаев, когда несколько генов или кластеры тесно сцепленных генов устойчивости распознают один единственный эффектор – и наоборот; кроме того, взаимодействия ген-на-ген для различных сочетаний патоген-растение в разной степени зависят от окружающей среды [23, 41, 48, 50]. Для описания эволюции и диверсификации генов устойчивости предложены две крайние концепции – “гонки вооружений” (*Arms Race*) и “окопной войны” (*Trench Warfare*), однако эволюция генов устойчивости, скорее всего, протекает в непрерывном пространстве взаимопользования (mutualistic) сожительства, которое часто использует механизмы и молекулярные компоненты защиты, описанные для обеих систем [12, 13, 46, 51, 52]. В наше время классические генетические исследования взаимодействия патогена с растением-хозяином дополняются молекулярными исследованиями участников этого взаимодействия и интегрируют существующие модели коэволюции и функции; такая интеграция поможет лучше понять быстрые изменения в агрессивности патогена и развитии болезни [5, 6, 20, 22, 24, 53, 54].

Среди многочисленных агентов ЕТI у *Phytophthora* лучше других исследованы RXLR эффекторы, продукты *Avr* генов этого патогена, и CC-NB-LRR рецепторы, продукты *Rpi* генов картофеля [11, 13, 16, 17, 25]; этим генам посвящены отдельные разделы обзора.

Phytophthora infestans: ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА И ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ

В основе нынешних представлений о геноме *P. infestans* лежат результаты секвенирования ге-

нома штамма T30-4 [55]. По своим размерам (240 млн п.н.) этот геном намного больше геномов других видов *Phytophthora*, прежде всего из-за избытия ДНК повторов, составляющих около 74% генома *P. infestans*. Самым удивительным свойством этого генома, определяющим этиологию фитопфтороза картофеля, является неравномерная плотность распределения генов. Участки, богатые “генами домашнего хозяйства” (*housekeeping genes*), чередуются с протяженными районами генома, в которых мало таких генов, но зато много повторов; эти участки содержат быстро эволюционирующие гены вредоносных (*pathogenic*) эффекторов. Примечательно, как столь необычное строение генома связано с поведением патогена. Быстро эволюционирующие гены эффекторов заключены в обширные и чрезвычайно динамичные участки генома, и такая локализация резко увеличивает частоту замен нуклеотидов, инсерций/делаций, перестроек и изменения копийности генов по сравнению с генами домашнего хозяйства. В результате эти участки хромосом оказываются уникальными нишами быстрой эволюционной диверсификации, которая определяет штамм-специфичный репертуар генов вирулентности [18, 53, 55, 56]. Naas и др. [55] постулировали, что такие динамические районы генома *P. infestans* определяют эволюционную пластичность генов эффекторов и создают столь характерную для эпидемии фитопфтороза повышенную генетическую изменчивость, позволяющую патогену преодолеть устойчивость растения.

Эти представления получили дальнейшее развитие по мере того, как секвенирование других геномов *P. infestans* и особенно транскриптомов принесло многочисленные данные, согласующиеся с концепцией определяющего участка повторов в увеличении размеров генома *P. infestans* [57, 58]. Концепция двухчастного генома и двухскоростной (или даже многоскоростной) эволюции генома выявляет те особенности архитектуры генома, которые определяют быстрые динамические перестройки и генетическую диверсификацию участков, связанных с вирулентностью, и служат колыбелью адаптивной эволюции *P. infestans* [18, 59]. Такая ускоренная адаптация, обусловленная специфичной архитектурой генома, особенно важна в случае искусственного отбора патогенов в агроценозах [60].

В большинстве случаев адаптацию *Phytophthora* определяют дубликации генов, негомологичные рекомбинации и делеции в участках, богатых транспозонами и генами эффекторов. Однако существуют и другие механизмы регуляции: к их числу относятся значительные изменения копийности генов, избирательная потеря генов, а также точечные мутации, сдвиг рамки считывания, повреждения старт- и стоп-кодонов и изменения в характере экспрессии генов [53, 61]. Сюда следует

прибавить и эпигенетическую регуляцию эволюции патогена [20, 62].

ОРУДИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ:

Avr ГЕНЫ И ЭФФЕКТОРЫ *P. infestans*

Новые физиологические и молекулярные методы позволили идентифицировать многочисленные цитоплазматические *Avr* гены и их продукты, эффекторы, которые патоген образует, чтобы модулировать многослойный иммунитет растения-хозяина, а также мишени этих эффекторов в растительных клетках [16, 24, 25, 46, 55, 63–68].

Гены эффекторов *P. infestans*. Среди многочисленных генов эффекторов в полностью секвенированных геномах *P. infestans* преобладают два типа структур. RXLR эффекторы – это модульные белки, на N-конце которых находится консервативный мотив R-x-L-R (аргинин – любая аминокислота – лейцин – аргинин), за которым обычно следует короткий EER (глутаминовая кислота – глутаминовая кислота – аргинин) домен, необходимый для переноса эффектора в растительную клетку. Изучение консервативных последовательностей в модельном геноме штамма T30-4 предсказало существование 563 RXLR генов. Примерно половина из них обнаруживает клональную (lineage) специфичность, которая, главным образом, и определяет разнообразие эффекторов, обусловленное эволюцией патогена. Куда меньше известно о генах CRN (crinkling- and necrosis-inducing proteins) эффекторов, обладающих неожиданным многообразием и сложным строением. Как и RXLR эффекторы, CRN эффекторы – это модульные белки, определяющей структурой которых служит чрезвычайно консервативный N-концевой LFLAK домен из 50 аминокислот; напротив, их C-концевые участки более разнообразны [26, 55].

Наряду с индукцией HR при специфичном взаимодействии генов эффекторов с соответствующими *Rpi* генами растений *Solanum*, можно привести несколько примеров других проявлений RXLR *Avr* генов. AVR1 влияет на накопление эффекторов вблизи гаусторий [67]. Другие эффекторы, включая хорошо известные AVR-BLB2, AVR2 и AVR3a, нарушают Ca²⁺-сигналинг, связанный с защитой растения, повышают восприимчивость растения и подавляют смерть клеток [69–71]. Различные эффекторы атакуют параллельные участки в цепях передачи сигналов, приводящих к HR [72]. RXLR эффекторы самым разным образом локализованы в растительных клетках, и ко-экспрессия нескольких RXLR эффекторов, поражающих различные иммунные системы, способствует колонизации по сравнению с одиночными эффекторами [67].

Когда эффекторы попадают в дикорастущие или культурные растения *Solanum*, они специфично узнают соответствующие им (matching) рецепторные белки, кодируемые *Rpi* генами. Основная на таком взаимодействии эффективная технология идентификации *Avr* и *Rpi* генов получила название эффекторомики. Для выявления соответствующих *Rpi* генов эффекторы транзитивно экспрессируются в листьях *Solanum*, и реакция клеточной смерти регистрируется невооруженным глазом. Чтобы убедиться в соответствии пар *Rpi*–*Avr* генов, гены-кандидаты ко-экспрессируют в листьях растений-тестеров, например, *Nicotiana benthamiana* Domin [15, 16, 65, 68].

Используемая ниже номенклатура *Avr* генов восходит к 11 *Rpi* генам, которые были обнаружены в генетическом материале *S. demissum* Lindl. и используются в стандартном Mastenbroek-Black наборе растений-дифференциаторов [73, 74] для различения штаммов (рас) *P. infestans*. Список эффекторов расширяется по мере обнаружения новых *Rpi* генов и их использования в опытах по эффекторомике [13, 16, 65]. Открытие, что многие AVR белки *P. infestans* принадлежат к классу RXLR эффекторов, позволило находить в генбанках новые гены эффекторов методами биоинформатики. К настоящему времени выявлены многочисленные мишени этих эффекторов, однако функции многих RXLR структур остаются неизвестными [13, 16, 22, 38, 47, 64, 67].

Генетический полиморфизм *Avr* генов. В полностью секвенированном геноме штамма T30-4 и других изолятов и штаммов *P. infestans* RXLR эффекторы были исследованы с помощью различных методов. Методы эффекторомики использовали, чтобы определить специфичную способность эффекторов вызывать клеточную смерть в листьях различных дикорастущих видов *Solanum* [65]. Эта работа существенно расширила круг известных *Rpi* генов и выявила значительное функциональное разнообразие уже известных RXLR *Avr* генов. Их структурное разнообразие возникает в результате дупликации *Avr* генов, их последующей рекомбинации и различной судьбы аллелей, отбираемых условиями окружающей среды, в первую очередь, самими инфицируемыми растениями [54].

Связь строения с функциональным полиморфизмом была впервые описана в случае гена *Avr3a*. Два аллеля этого гена кодируют белки AVR3aKI и AVR3aEM, которые различаются двумя аминокислотными остатками, непосредственно влияющими на реакцию растения-хозяина: первый из двух белков непосредственно активирует R3a киназу растения *Solanum* и вызывает иммунную реакцию, второй белок, вирулентный *Avr3a* обеспечивает вирулентность на протяжении биотрофной фазы патогенеза. Удаление C-концевого остатка тирозина у AVR3aKI не влияет на распознавание

R3a, но лишает AVR3aKI способности подавлять смерть клеток, продлевая биотрофную фазу [75].

Популяционные исследования существенно расширили наши знания о разнообразии RXLR *Avr* генов. Клонирование и секвенирование полигенного семейства *IpiO* из изолятов *P. infestans*, собранных в Гватемале, Таиланде и США, выявили широкий спектр аллелей, различающихся по строению и копияности. Разнообразие *IpiO* генов коррелировало с агрессивностью патогена. Ген *Rpi-blb1* картофеля опознавал эффектор IPI-01, однако другой представитель того же семейства IPI-04 избегал распознавания и угнетал HR, вызванную взаимодействием IPI-01 с *Rpi-blb1*. Вызванное IPI-04 подавление распознавания IPI-01 определяет повышенную агрессивность патогена [76].

Другим примером значительного аллельного полиморфизма генов эффекторов служит семейство *Avr-blb2*. У штамма T30-4 *P. infestans* вариации отмечены у 24 из 279 исследованных нуклеотидных последовательностей, при этом из 14 полиморфных сайтов десять были локализованы в С-концевом домене эффектора. Аминокислотный остаток в положении 69 определял защитную реакцию, опосредованную геном *Rpi-blb2*: среди четырех вариантов белка AVR-BLB2, Phe-69 препятствует активации *Rpi-blb2*, и это говорит о том, что вирулентный аллель возник для того, чтобы избежать его узнавания геном устойчивости [64]. Изучение строения гена *Avr-blb2* в глобальной метапопуляции *P. infestans* (352 изолята, собранных с 13 различных растений-хозяев в 23 странах) позволяет предположить, что *Avr-blb2* появился вначале у вида-прародителя как единственная копия гена, а затем дивергировал по мере того, как клоны этой линии *Phytophthora* инфицировали растения *Solanum* во всем мире. Удивительно, что в популяциях *P. infestans* мы сегодня находим все варианты *Avr-blb2*: очевидно, патогену выгодно поддерживать дублированные и функционально различные версии гена *Avr-blb2* [77].

Куда большие структурные различия между авирулентными и вирулентными формами были найдены у двух других *Avr* генов. Изучение последовательностей авирулентного AVR2 и вирулентного AVR2-like в серии линий и изолятов *P. infestans* обнаружило, что они различались 13 аминокислотными остатками, притом что полиморфизм внутри каждого класса не был столь значительным; некоторые изоляты были гомозиготными, а другие — гетерозиготными по гену *Avr2* [78]. Еще сильнее — по 38 аминокислотным остаткам — различались авирулентный AVR1 и вирулентный AVR1-like эффекторы [79].

Анализ генома у изолятов *P. infestans*, собранных в 1100 случаях эпидемического проявления фитофтороза картофеля в Великобритании, выявил значительную гетерогенность репертуара

RXLR эффекторов. В частности, наиболее агрессивный изолят I3_A2 содержал шесть новых *Avr* аллелей, включая вирулентный гомолог *Avr2*, которые отсутствовали у модельного штамма T30-4 [5]. Заметный аллельный полиморфизм гена *Avr-vnt1* обнаружен в популяциях *P. infestans* в Европе и обеих Америках [80], а также в Европе при сравнении польских и норвежских популяций [81]. Среди 96 изолятов *P. infestans*, собранных в шести районах Китая, которые различались погодными условиями и агротехникой возделывания картофеля, значительный полиморфизм гена *Avr3a* позволил выделить 51 гаплотип, кодирующий 38 аминокислотных вариантов [82].

В последние годы для идентификации генов эффекторов начали использовать новую чрезвычайно эффективную технологию Pathogen target enrichment Sequencing (PenSeq); эта технология облегчает анализ аллельного разнообразия эффекторов, давая возможность провести эволюционный анализ генома и популяционные исследования патогена. PenSeq также позволяет выполнить широко-масштабные исследования изменчивости (присутствие/отсутствие гена) и полиморфизма последовательностей ключевых генов патогена, что является предварительным условием эффективного использования генов устойчивости растения-хозяина. Так, использование PenSeq для анализа нескольких линий *P. infestans*, включая I3_A2 и EC-1, позволило обнаружить 16 последовательностей RXLR эффекторов, отсутствовавших в геноме линии T30-4, который использовали при синтезе “наживок” (baits) для обогащения *Avr* генов при секвенировании. Сравнение шести различных изолятов выявило особенности профилей (присутствие/отсутствие генов) и аллельный полиморфизм ранее охарактеризованных *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avr-Smira2=Avr8*, *Avr-Smira1=Avr9*, *Avr10*; *Avr-vnt1*, *Avr-blb1* и *Avr-blb2* генов. Кроме того, это PenSeq исследование расширило список *Avr* генов-кандидатов за пределы модельных последовательностей, использованных в качестве “наживок” для обогащения генов-мишеней; такое расширение списка генов было особенно заметным в случае комплексов генов, для которых характерен значительный аллельный полиморфизм [38]. Другим примером аллельной диверсификации *Avr* генов стало недавнее исследование *S. americanum* Mill., вида, который не является типичным растением-хозяином (non-host) *P. infestans*. У четырех изолятов *P. infestans*, авирулентных по отношению к растениям картофеля, несущим ген *Rpi-amr1* (EU13_A2, EC1_A1, EU6_A1 и US23), исследовали 47 генов эффекторов с высокой скоростью экспрессии с помощью одномолекулярного секвенирования в реальном времени (single-molecule real-time sequencing, SMRT RenSeq) и PenSeq долговчитаемых (long-read) последовательностей и кДНК. Новый ген был идентифици-

рован как *Avr-amr1* по HR, которую наблюдали при транзитной ко-экспрессии с соответствующим геном *Rpi-amr1* в растениях *N. benthamiana*. В геноме T30-4 вновь охарактеризованный локус *Avr-amr1* расположен вблизи уже известных генов эффекторов *Avr8* и *Avr-Smira1* [83].

С точки зрения биологии популяций и эволюции *P. infestans*, PenSeq анализ *Avr* генов обладает важным преимуществом: в условиях положительного, или балансирующего отбора он позволяет напрямую исследовать генетическую изменчивость агентов вирулентности, выявляя причины генетических изменений и характер адаптивной эволюции лучше, чем при секвенировании всего генома. Транскриптомные профили генов RXLR эффекторов, исследованные в ходе развития болезни, показали, что экспрессия этих генов резко усиливается на раннем биотрофном этапе заражения картофеля. Эти профили легко соотнести с конкретными инструментами устойчивости растения, взаимодействующего с патогеном.

Если демографические исследования эффекторов позволяют судить о потенциальном арсенале *P. infestans*, то профиль экспрессии *Avr* генов, вероятно, говорит об их активном репертуаре. Уникальная способность линии 13_A2 поражать сорта картофеля оказалась результатом изменений в кодирующих последовательностях *Avr* генов и характере экспрессии этих генов. В опытах *in planta* для этой линии показаны характерные изменения индукции генов во времени. В отличие от штамма T30-4, у этого генотипа специфично экспрессировались 20 генов RXLR эффекторов, при этом наиболее активно экспрессируемые гены, в том числе *Avr-blb1*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, сохраняли заметный уровень экспрессии в течение 2–3 дней после заражения, в полном согласии с кривой развития фитофтороза, и, вероятно, вносили важный вклад в нарастающую агрессивность линии 13_A2 [5].

Стратегию глубокого NGS транскриптомов, основанную на консервативности последовательностей генов RXLR эффекторов, использовали для сравнения пяти штаммов *P. infestans* из северо-западного и южного Китая и Европы, представляющих разные типы скрещивания, гаплотипы и патотипы; это исследование идентифицировало консервативные основные (core) гены RXLR эффекторов, определяющие вирулентность. Гены *Avr2*, *Avr3a*, *Avr-blb1*, *Avr-vnt1* и *Avr-Smira1* экспрессировались у всех исследованных штаммов, каждый из генов *Avr3b*, *Avr4*, *Avr-blb2* и *Avr-Smira2* экспрессировался у двух-четырех штаммов, а ген *Avr1* — только у одного [58]. В доминирующем в Андах клоне ЕС-1 были найдены многочисленные вариации структуры и числа копий *Avr* генов. Некоторые из них были связаны с потерей гетерозиготности в митозе. Однако самыми примеча-

тельными оказались различия изолятов по скорости экспрессии многих *Avr* генов — при полном отсутствии различий в последовательности этих генов. В этом случае сайленсинг гена эффектора позволял избежать его распознавания *Rpi* генами [60].

Solanum: ГЕНЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ ПАТОГЕНЫ И ПРОТИВОСТОЯЩИЕ ИМ

Картирование признаков и предполагаемых генов устойчивости к фитофторозу. С начала 1990 гг. для картирования *Rpi* генов-кандидатов у культурных и дикорастущих видов *Solanum* методами неравновесного сцепления или ассоциативного анализа используется несколько видов ДНК маркеров: RFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeats, — а позже Single Nucleotide Polymorphism (SNP) маркеры и diversity array technology. Наиболее надежны маркеры, последовательности которых расположены внутри последовательности гена или непосредственно примыкают к ее концам: в таких случаях рекомбинация между маркерным аллелем и признаком устойчивости встречается редко или вовсе не происходит даже после многочисленных скрещиваний. Такие основанные на ПЦР маркеры, как Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) или Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, позволили с высокой точностью картировать *Rpi* гены-кандидаты и локусы количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTLs) устойчивости к фитофторозу [17, 84–87]. Результаты полногеномного картирования и картирования высокого разрешения позволили создать различные наборы вырожденных праймеров, распознающих аналоги генов устойчивости (resistance gene analogues, RGAs) и их кластеры, и амплификация генома с этими праймерами в сочетании с AFLP анализом существенно расширила круг предполагаемых *Rpi* генов. Этот высокоразрешающий метод поиска и идентификации (tagging) новых аллелей, получивший название motif-directed profiling, был успешно использован для изучения новых геномов *Solanum* и полиморфизма индивидуальных геномов, а сочетание такого profiling с NGS обещает огромные преимущества в сравнении с технологией profiling, основанной на разделении фрагментов ДНК в геле [17, 30].

Чтобы синтезировать данные о картировании локусов полигенной устойчивости к фитофторозу, двадцать одна карта QTLs была совмещена с восемью опорными генетическими картами картофеля, полученными с помощью различных маркеров, в консенсусную карту, несущую 2141 маркер, и вся совокупность QTLs была представлена в виде мета-QTLs. Мета-QTLs устойчивости к фитофторозу были найдены на всех 12 хромосомах картофеля, и некоторые из этих локусов совпадали с положением уже известных *Rpi* генов [88]. Другие QTLs

устойчивости к фитофторозу не совпадали с такими *Rpi* генами и RGAs; в этих локусах можно искать новые *Rpi* гены. Области QTLs, картированные стандартными методами, покрывают на физической карте участки длиной несколько млн. п.н. и содержат множество генов с различными функциями. Чтобы преодолеть это затруднение, секвенируют большие фрагменты геномов или целые геномы. Скрининг коллекций картофеля методами эффектомики также расширяет круг *Rpi* генов на основе их функциональной активности [16, 17, 65, 66], однако эти данные часто трудно согласовать с результатами QTL анализа.

Обнаружение *Rpi* генов. Идентификация всего набора генов, определяющих устойчивость к *P. infestans*, – обязательное условие для понимания молекулярной природы различного течения болезни. За два последних десятилетия были найдены и клонированы более 20 *Rpi* генов дикорастущих видов *Solanum*. Секвенирование уже охарактеризованных *Rpi* генов показало, что все они принадлежат к CC-NB-LRR классу. Лучше других охарактеризованы ген *R1* и его аналоги в кластере генов на хромосоме 5 *S. demissum*, ген *R2* из *S. demissum*, его ортолог *Rpi-blb3* из *S. bulbocastanum* Dun. и их ортологи из нескольких других видов в большом кластере на хромосоме 4, ген *Rpi-blb2* из *S. bulbocastanum* на хромосоме 6, гены *Rpi-blb1* и *Rpi-bt1* из того же вида и *Rpi-sto1=Rpi-plt1=Rpi-pta* из *S. stoloniferum* Schlecht. et Bché., *S. polytrichon* Rydb. и *S. papita* Rydb. на хромосоме 8, ген *Rpi-vnt1* из *S. venturii* Hawkes et Hjerting и его ортологи из многочисленных южноамериканских видов *Solanum* на хромосоме 9 и гены *R8* и *R9a* из *S. demissum* на той же хромосоме, ген *Rpi-chc1* из *S. chacoense* Bitt. на хромосоме 10 и гены *R3a* и *R3b* из *S. demissum* на хромосоме 11 [10, 13, 14, 16, 17, 29, 37]. Последовательности еще нескольких идентифицированных *Rpi* генов-кандидатов пока не опубликованы. Сравнительное секвенирование отдельных *Rpi* генов и целых геномов клубненосных видов *Solanum* и за их пределами обнаружило функционально сходные формы *Rpi* генов и выявило обширный аллельный полиморфизм, который еще предстоит оценить селекционерам. В целом, клубненосные и не клубненосные виды *Solanum*, особенно виды из Южной Америки, открывают широчайшие возможности для эволюционных исследований *Rpi* генов и их использования в селекции картофеля [28, 29, 31, 89].

Анализ генома удвоенного моноплоида *S. tuberosum* группа *Phureja* клон DM [90] предсказал присутствие 361 CC-NB-LRR гена, расположенного на всех 12 хромосомах. Большинство этих генов физические организованы в кластеры, в основном гомогенные, что позволяет предполагать, что они сравнительно недавно дивергировали от общего предка. Примечательно, что в отличие от RXLR эффекторов, сосредоточенных в бедных другими

генами участках генома *P. infestans*, CC-NB-LRR гены находятся в участках генома картофеля, ничем не выделяющихся по плотности генов или повторов [91]. К настоящему времени полные последовательности геномов получены и опубликованы еще для нескольких культурных видов картофеля: полиплоидных *S. ×chaucha* Juz. et Buk., *S. curtilobum* Juz. et Buk., *S. juzepczukii* Buk. и *S. tuberosum* subsp. *andigena* Hawkes и subsp. *tuberosum* L. [92], и двух дикорастущих видов: *S. commersonii* Dun. [93] и *S. chacoense* [94]. Эти последовательности помогают оценить разнообразие структур, соответствующих CC-NB-LRR *Rpi* генам и их гомологам, и изучить кластерную организацию *Rpi* генов.

Характерно сходство в организации уже известных кластеров *Rpi* генов в различных геномах *Solanum*. По всей видимости, некоторые линии *Rpi* генов появились еще до дивергенции клубнеобразующих видов *Solanum*; далее, вслед за эволюцией геномов, которая определила нынешний ландшафт этих видов в двух Америках, начался независимый процесс адаптации различных *Rpi* генов к местным популяциям патогена [95]. Поражает случай контрастного распределения генов у дикорастущих видов картофеля: гены *Rpi-blb1=Rpi-sto1* найдены только у мексиканских видов серий *Bulbocastana* и *Longipedicellata*, в то время как ген *Rpi-vnt1* характерен для южноамериканских видов *Tuberosa* [16]. Удвоение всего генома, избирательная тандемная дупликация и удержание (retention) генов, равно как внутригенная и межгенная рекомбинация и конверсия CC-NB-LRR генов, описанные моделью эволюции генов устойчивости под названием “рождение-и-смерть”, наполняют резервуар генов картофеля чрезвычайно разнообразными структурами, которые служат материалом естественного и искусственного диверсифицирующего отбора; дело селекционеров – выбрать из этого огромного резервуара линии независимых генов со специфичностью к различным патогенам [1, 50]. Кластеризация генов может расширять полиморфизм их последовательностей благодаря внутри- и межгенной мейотической рекомбинации, приводя к появлению структур с новой специфичностью [13]. В качестве примера можно указать на эволюцию почти полностью идентичных структур у картофеля, в результате которой возникли два CC-NB-LRR гена устойчивости к столь различным болезням, как поражение чистообразующей нематодой *Globodera pallida* и *Potato virus X* [96].

Такие новые технологии секвенирования, как NGS, генерируют данные со скоростью, на несколько порядков величины превосходящей ту, что достигали традиционные технологии предшествующего периода. Технология RenSeq (Resistance gene enrichment Sequencing) включает конструирование “наживок” на основе последова-

тельностей известных семейств NB-LRR генов и секвенирование обогащенных таким образом образцов NB-LRR RGAs [34]. Выделение интересующих исследователя семейств генов позволяет изучить специфические компоненты генома. Благодаря существенному уменьшению размеров и упрощению состава анализируемых фрагментов генома еще до сравнительного секвенирования, этот метод значительно облегчает обнаружение *Rpi* генов и их высококачественную аннотацию. В случае генома клона DM *S. tuberosum* метод RenSeq выявил почти вдвое больше NB-LRR генов, чем полное секвенирование генома [90]. Эта технология позволила также быстро отобрать SNP маркеры, косегрегирующие с локусами устойчивости к *P. infestans* у нескольких видов *Solanum*, и с помощью этих маркеров выявить *Rpi* гены-кандидаты в еще не охарактеризованных геномах *Solanum*. Важным подспорьем в применении новых методов стало развитие высокоразрешающих биоинформатических методов обнаружения и исследования полиморфизма генов.

Однако возникает вопрос, какая доля CC-NB-LRR *Rpi* генов-кандидатов, обнаруженных при полном секвенировании генома или RenSeq методом, участвует в устойчивости к фитофторозу. Стабильная трансформация восприимчивых к фитофторозу сортов картофеля в устойчивые с помощью предполагаемых *Rpi* генов является надежным, но чрезвычайно дорогим и трудоемким доказательством их функциональности. Более доступными методами валидации *Rpi* генов являются эффекторика, основанная на транзиентной трансформации растений [66], мета-QTL анализ [88], маркерный анализ и транскриптомный анализ растений картофеля, инфицированных *P. infestans*.

NGS технологии [15, 17, 34, 35, 37] резко ускорили картирование высокого разрешения и обнаружение новых генов и открыли новые возможности для сравнительных исследований геномов (генотипирование путем секвенирования, полногеномное секвенирование, баркодинг и т.д.) и транскриптомов (RenSeq, Candidate gene-Sequencing, Bulk segregant RNA-Seq, QTL-Seq, dRenSeq и др.). Дальнейшим развитием серийного анализа экспрессии генов (serial analysis of gene expression, SAGE) стал DeepSAGE метод транскриптомного анализа; при изучении взаимодействия растения-хозяина с патогеном этот метод обнаруживает новые гены-кандидаты. При изучении этим методом совместимых и несовместимых взаимодействий растения и патогена по ходу развития болезни транскрипция полигенных семейств, как правило, отвечающих за РТІ защитные реакции, сильнее изменялась у восприимчивых растений [97]. Использование другой разновидности SAGE технологии, SuperSage, дало много новой информации о специфичном усилении или ослаблении транскрипции отдельных генов, включая гены устойчи-

вости к фитофторозу, при вторжении патогена [33]. При сравнении транскриптомов устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля методом RNA-Seq, у устойчивого сорта Sarpo Mira экспресировалось приблизительно на четверть больше предполагаемых генов устойчивости, чем у восприимчивого сорта Désirée, однако ни один из обнаруженных генов не принадлежал к уже известным *Rpi* генам [98].

При дальнейшем совершенствовании RenSeq технологии специфичные “наживки”, сконструированные для захвата и секвенирования фрагментов ДНК, были укорочены до размеров, соответствующих средней длине *Rpi* гена-кандидата, и для клонирования индивидуальных *Rpi* генов использовали SMRT RenSeq метод. Это позволяет собрать *de novo* *Rpi* гены, их регуляторные элементы и сложные локусы, даже работая с недостаточно охарактеризованным генетическим материалом, и быстро клонировать многочисленные новые *Rpi* гены [15, 35].

Расширение круга “наживок” для захвата генов-кандидатов привело к созданию еще одного мощного и экономически эффективного приложения RenSeq технологии как диагностического инструмента (dRenSeq). Метод определяет уже известные *Rpi* гены, надежно их идентифицирует, а также позволяет валидировать полные последовательности уже известных функциональных *Rpi* генов в генетических коллекциях и селекционных программах. В зависимости от условий гибридизации (stringency conditions, mismatch rates) при захвате *Rpi* генов и RGAs, метод dRenSeq позволяет также выявить ранее неизвестные полиморфизмы, перспективные для поиска новых *Rpi* генов и новых аллелей уже охарактеризованных *Rpi* генов у таких недостаточно охарактеризованных видов, как *S. americanum*, *S. andigena*, *S. pinnatisectum* Dun. и *S. verrucosum* Schlecht. [37, 38, 57, 99, 100]. В случае *S. andigena* этот метод успешно различил усиление и ослабление транскрипции отдельных генов: при совместимом взаимодействии гены восприимчивости индуцировались сильнее, чем при несовместимом взаимодействии. Чтобы связать устойчивость образца *S. andigena* 03112-233 к *P. infestans* с известными или вновь обнаруженными генами устойчивости, для dRenSeq анализа использовали 21 известный функциональный *Rpi* ген. Ни один из них не удалось выявить при этом анализе, так что, по всей видимости, за устойчивостью этого образца к *P. infestans* стоит неизвестный ген [57].

ВМЕСТО ЗАКЛЮЧЕНИЯ: ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФИТОФТОРОЗА

Сегодня мы стали свидетелями успешного использования результатов генетических и геном-

ных исследований картофеля в селекции картофеля. Экспериментальные данные, полученные благодаря новейшим молекулярным технологиям, и возникшие на их основе новые представления о вредоносности патогена и устойчивости растения оказывают заметное воздействие на селекцию картофеля на долговременную устойчивость к фитофторозу и способствуют развитию интегрированных методов борьбы с этой болезнью.

ГМ растения-дифференциаторы. Вот уже почти сто лет для различения патотипов (рас) *P. infestans* широко используют HR реакцию Mastenbroeck-Black растений-дифференциаторов [73, 74]. Исходно предполагали, что эти сорта картофеля содержат по одному *Rpi* гену, перенесенному из *S. demissum* [9]; однако некоторые из этих “моноклониальных” растений в действительности содержат более одного *Rpi*, что препятствует правильному диагнозу [101]. Кроме того, существующие наборы растений-дифференциаторов не содержат генов, которые в настоящее время наиболее успешно используются в селекции на долговременную устойчивость: *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-vnt1* и др. [8]. Радикальным выходом из создавшегося положения стала трансформация растений картофеля сорта Désirée каждым из десяти *Rpi* генов [101]. Такие по-настоящему моноклониальные растения-дифференциаторы обеспечивают более точное генотипирование изолятов *P. infestans*, однако их применение наталкивается на ограничения, вызванные их ГМ происхождением.

Эффектормика. Прямое изучение *Avr* генов, непосредственно определяющих вредоносность популяций *P. infestans*, открыло новые перспективы для мониторинга популяций патогена, отслеживания его перемещений в агроценозах и раннего предупреждения о появлении новых и, возможно, более агрессивных патотипов. Среди наиболее многообещающих диагностических приложений наших знаний об *Avr* генах следует назвать эффектормику – легкодоступный чувствительный и производительный метод анализа аллельного разнообразия *Avr* генов, поиска новых *Rpi* генов путем скрининга генетических коллекций и определения функций вновь обнаруженных генов в связи с селекцией на долговременную устойчивость к фитофторозу [66, 102]. Эффектормика дает уникальные сведения о составе *Avr* генов, которые могут стать частью интегрированной системы защиты картофеля, помогая, к примеру, планировать состав генов устойчивости путем сортосмены или схему применения фунгицидов [103].

Прямое определение репертуара *Avr* генов и использование арсенала эффекторов. Новые знания об эволюции и диверсификации *Avr* генов патогена позволяют разработать более сложные системы использования *Rpi* генов, которые сближают агроценозы с популяциями дикорастущих растений,

где лишь изредка наблюдаются эпидемии [32]. Если эффектормика различает гены авирулентных эффекторов по их функции, то все новые и новые успехи технологий секвенирования генома позволяют рано обнаружить новые структуры *Avr* генов и таким образом сигнализировать о появлении новых патотипов. Репертуар *Avr* генов, выявленный методами геномики, позволяет следить за распространением патогена в агроценозах и способствует селекции на устойчивость к фитофторозу, идентифицируя гены вирулентности в популяциях патогена и гены устойчивости и восприимчивости к этому патогену в инфицированных посадках картофеля [68]. Технология PenSeq призвана ответить на многие вопросы биологии патогена и преодолеть ограничения современных фитопатологических исследований благодаря широким параллельным исследованиям последовательностей генов, включая массовое определение аллельного полиморфизма ключевых *Avr* генов *P. infestans* и их положения на карте генома и на карте территории [38]. PenSeq выявляет *Avr* гены, определяющие потенциал долговременной устойчивости картофеля, достигнутой при интрогрессии *Rpi* генов. Более того, эта технология позволяет ре-аннотировать гены-кандидаты эффекторов в геноме *P. infestans*, тем самым расширяя поле будущего применения *Avr* генов как инструмента селекции.

Поиски новых *Rpi* генов. За два последних десятилетия значительно увеличилось число охарактеризованных последовательностей генома культурных и дикорастущих форм, принадлежащих к разным видам картофеля и регионам их произрастания. При всем недостатке знаний о генетическом разнообразии картофеля на уровне полных геномов, в предшествующий NGS период различные методы поиска новых аллелей смогли предложить селекционерам много перспективных *Rpi* генов [10, 13, 14, 17]. В эпоху NGS методы геномики позволяют по-новому и глубже взглянуть на разнообразие геномов в генетических коллекциях, выявить в истории культурного картофеля эволюционные процессы интрогрессии и гибридизации и идентифицировать гены, которые стали точкой приложения процессов одомашнивания, а затем и селекции [28, 31]. Новую dRenSeq технологию с успехом использовали для изучения аллельного полиморфизма *Rpi* генов и их аналогов, обнаружения *Rpi* генов в лучших сортах картофеля и идентификации новых аллелей этих генов у дикорастущих видов *Solanum* [37, 57, 99, 100, 104].

Использование *Rpi* генов для создания долговременной устойчивости к широкому спектру рас *P. infestans*. В полиплоидных геномах растений дикорастущих видов *Solanum* обычно поддерживается разнообразие многочисленных аллельных вариантов *Rpi* генов. Расширение наших знаний о поли-

морфизме и эволюции *Rpi* генов помогает выстроить стратегии пирамидирования *Rpi* генов, которые во многом сходны с процессами эволюции в популяциях дикорастущих форм, где редко происходят эпидемии. По мере увеличения разнообразия *Rpi* генов, сорта и гибриды картофеля постепенно достигают все более высокой устойчивости к болезням.

В природных экосистемах, примером которых служит долина Толука в Мексике [105], в результате совместной эволюции растений картофеля и *P. infestans* возникают популяции растений и микроорганизмов, в которых лишь изредка происходят эпифитотии. Напротив, в агроценозах, особенно при стремительном вторжении новых особо вирулентных штаммов патогена, эпидемии фитофтороза приводят к значительным потерям урожая [5, 6]. Одной из эффективных стратегий борьбы с фитофторозом является селекция на высокую и долговременную устойчивость, основанная на пирамидировании *Rpi* генов, распознающих различные *Avr* гены. Доступным источником такого генетического материала служат дикорастущие виды картофеля. Методами скрещивания или генетической инженерии многочисленные *Rpi* гены этих видов можно интрогрессировать в те сорта картофеля, которых требует рынок.

Подобная пирамида генов останется эффективной, пока растение содержит хотя бы один *Rpi* компонент, способный опознать соответствующий ему *Avr* ген патогена и запустить защитную реакцию. В основе пирамидирования (сборки) нескольких генов устойчивости в одном сорте с целью сделать его устойчивым долговременной лежит принцип, в соответствии с которым вероятность мутации сразу нескольких *Avr* генов из авирулентных в вирулентные низка и снижается с увеличением числа генов устойчивости в пирамиде. Теоретически, пирамида из четырех генов устойчивости устоит перед вторжением патогена — при условии, что эта пирамида и популяция патогена-колонизатора соответствуют нескольким критериям. Во-первых, собранные в пирамиду гены устойчивости должны проявляться полностью, чтобы исключить ситуацию, когда штамм патогена, несущий характерный *Avr* аллель, сможет инфицировать и колонизовать растение, несмотря на присутствие в нем соответствующего (*matching*) гена устойчивости. Во-вторых, не все гены устойчивости одинаково важны для устойчивости пирамиды; лучшие гены и их сочетания — это те, с которыми еще не сталкивалась инфицирующая популяция патогена. В-третьих, важна низкая частота рекомбинации генома патогена, поскольку при рекомбинации, когда, к примеру, в популяции *P. infestans* присутствуют два типа спаривания, частота независимых мутаций генов вирулентности окажется много выше, чем в исходно бесполой популяциях. В-четвертых, устойчивость будет долговременной при незначитель-

ной скорости распространения новых патотипов в полевых популяциях патогена [1, 32, 106].

В случае картофеля наиболее очевидным способом достигнуть долговременной устойчивости к *P. infestans* является вовлечение в селекцию новых *Rpi* генов и сосредоточение в одном сорте как можно большего числа этих генов. В два последних десятилетия такое пирамидирование опиралось на идентификацию и клонирование перспективных *Rpi* генов, в первую очередь, из разнообразных дикорастущих видов *Solanum*; особенный интерес представляют недостаточно изученные южноамериканские виды картофеля, которые ранее не вовлекались в практическую селекцию [28, 31, 36, 107, 108]. В создании селекционных источников долговременной устойчивости важную роль играют многие описанные выше “омик” технологии быстрой идентификации, клонирования и характеристики *Rpi* и *Avr* генов. При обогащении селекционных источников новым генетическим материалом путем идентификации и интрогрессии новых *Rpi* генов и новых аллелей уже охарактеризованных *Rpi* генов важно тщательно изучать уже существующие пулы *Rpi* генов, чтобы не включать в пирамиды те используемые селекционерами гены, которые уже преодолены местными штаммами патогена [9, 27–29, 31, 87, 108].

Внимание многих селекционеров сосредоточено на создании сортов картофеля с долговременной устойчивостью к фитофторозу методами генетической инженерии. Зарегистрированные в настоящее время сорта несут пирамиды, содержащие до трех *Rpi* генов широкой расовой специфичности, например, *Rpi-sto1:Rpi-vnt1.1:Rpi-blb3* или *Rpi-blb1:Rpi-blb2:Rpi-vnt1.1*. Хотя порознь эти гены иногда преодолеваются некоторыми изолятами *P. infestans*, вместе они обеспечивают долговременную устойчивость [109]. В сравнении с половой или соматической гибридизацией, важным преимуществом ГМ стратегий является то, что при этом не переносятся нежелательные сцепленные гены (*linkage drag*). Однако генетическая инженерия сельскохозяйственных растений — это дорогостоящий процесс; вдобавок, к ней отрицательно относятся многие потребители, и использование ГМ сортов ограничено законодательством многих стран, особенно в Европе [13, 110]. Чтобы преодолеть законодательные ограничения на использование трансгенных растений, голландские генетики и селекционеры предложили концепцию цисгенеза; в этом случае с помощью генно-инженерных методов *Rpi* гены переносятся только из тех дикорастущих видов *Solanum*, которые можно скрещивать с сортами картофеля [8, 27, 111, 112].

Традиционное пирамидирование *Rpi* генов, основанное на гибридизации, включает многочисленные этапы скрещивания и отбора потомства [9] и

поэтому оказывается чрезвычайно медленным и трудоемким процессом, даже при эффективном использовании молекулярных маркеров. Однако пока этим методом удается сосредоточить в одном растении больше *Rpi* генов, чем с помощью сегодняшних ГМ технологий. В качестве примера можно указать на многочисленные сложные (multiparental) гибриды, созданные отечественными генетиками и селекционерами путем отдаленного скрещивания с использованием десятка дикорастущих видов *Solanum*; эти гибриды несут SCAR маркеры до пяти *Rpi* генов на генотип. Клональные линии, полученные на основе этих гибридов, вот уже много лет отличает высокая устойчивость к фитофторозу, и они являются перспективными селекционными донорами таких генов широкого спектра устойчивости, как *Rpi-blb1=Rpi-sto1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-vnt1*, *R2=Rpi-blb3* и др. [113]. Важным преимуществом таких линий является сохранение генетического окружения расспецифичных *Rpi* генов, интрогрессированных из родительских форм, включая гены раснеспецифичной устойчивости [84]. Вместо одиночных генов при отдаленных скрещиваниях переносятся целые кластеры генов, что повышает устойчивость растений сразу к нескольким болезням. Эти свойства сложных гибридов — залог стабильности будущих сортов картофеля, которые будут препятствовать распространению в посадках картофеля более адаптированных штаммов патогена [107, 113]. Однако при столкновении с большими популяциями *P. infestans* со смешанным A1 и A2 типом спаривания и заметным перемещением *Avr* генов вследствие миграции патогена одним только пирамидированием *Rpi* генов нельзя добиться долговременной устойчивости. Для ее поддержания важна такая организация защиты растений, которая снижает эффективный размер популяции патогена, например, севооборот и применение фунгицидов [106].

Автор признателен Вл.В. Кузнецову и Е.В. Рогозиной за конструктивные замечания и предложения.

Работа поддержана Государственным заданием 0574-2019-0001.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Michelmore R.W., Christopoulou M., Caldwell K.S.* Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013. V. 51. P. 291.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102334>
2. *Brown J.K.M.* Durable resistance of crops to disease: A Darwinian perspective // *Annu. Rev. Phytopathol.*

2015. V. 53. P. 513.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045914>
3. *Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Visser R.G.F., van der Vossen E.A.G.* Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification // *Potato Res.* 2008. V. 51. P. 47.
<https://doi.org/10.1007/s11540-008-9089-y>
4. *Haverkort A., Struik P., Visser R., Jacobsen E.* Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans* // *Potato Res.* 2009. V. 52. P. 249.
<https://doi.org/10.1007/s11540-009-9136-3>
5. *Cooke D.E.L., Cano L.M., Raffaele S., Bain R.A., Cooke L.R., Etherington G.J., Deahl K.L., Farrer R.A., Gilroy E.M., Goss E.M., Grünwald N.J., Hein I., MacLean D., McNicol J.W., Randall E. et al.* Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen // *PloS Pathol.* 2012. V. 8: e1002940.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002940>
6. *Fry W.E.* *Phytophthora infestans*: new tools (and old ones) lead to new understanding and precision management // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016. V. 54. P. 529.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095951>
7. *Halterman D., Guenther J., Collinge S., Butler N., Douches D.* Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato // *Am. J. Potato Res.* 2016. V. 93. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s12230-015-9485-1>
8. *Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F.* Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh project // *Potato Res.* 2016. V. 59. P. 35.
<https://doi.org/10.1007/s11540-015-9312-6>
9. *Bradshaw J.R.* Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008 // *Potato Res.* 2009. V. 52. P. 141.
<https://doi.org/10.1007/s11540-009-9126-5>
10. *Du J., Vleeshouwers V.G.A.A.* New strategies towards durable late blight resistance in potato // *The Potato Genome. Compendium of Plant Genomes* / Eds. Kumar C.S., Xie C., Kumar T.J. Cham: Springer, 2017. P. 161.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_10
11. *Hein I., Birch P.R., Danan S., Lefebvre V., Odeny D.A., Gebhardt C., Trognitz F., Bryan G.J.* Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives // *Potato Res.* 2009a. V. 52. P. 215.
<https://doi.org/10.1007/s11540-009-9129-2>
12. *Hein I., Gilroy E.M., Armstrong M.R., Birch P.R.* The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions // *Mol Plant Pathol.* 2009b. V. 10. P. 547.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00547.x>
13. *Rodewald J., Trognitz B.* *Solanum* resistance genes against *Phytophthora infestans* and their corresponding avirulence genes // *Mol. Plant. Pathol.* 2013. V. 14. P. 740.
<https://doi.org/10.1111/mpm.12036>

14. *Sliwka J., Zimnoch-Guzowska E.* Resistance to late blight in potato // *Translational Genomics for Crop Breeding*, Vol. 1: Biotic Stress / Eds. Varshney R.K., Tuberosa R. Wiley, 2013. P. 221.
<https://doi.org/10.1002/9781118728475.ch12>
15. *Van Weymers P.S., Baker K., Chen X., Harrower B., Cooke D.E., Gilroy E.M., Birch P.R., Thilliez G.J., Lees A.K., Lynott J.S., Armstrong M.R., McKenzie G., Bryan G.J., Hein I.* Utilizing “omic” technologies to identify and prioritize novel sources of resistance to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* in potato germplasm collections // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 672.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00672>
16. *Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J.H., Champouret N., Oliva R., Segretin M.E., Rietman H., Cano L.M., Lokossou A., Kessel G., Pel M.A., Kamoun S.* Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011. V. 49. P. 507.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>
17. *Vossen J.H., Jo K.-R., Vosman B.* Mining the genus *Solanum* for increasing disease resistance. *Genomics of Plant Genetic Resources*, Vol. 2. Crop Productivity, Food Security and Nutritional Quality / Eds. Tuberosa R., Graner A., Frison E. Springer, 2014. P. 27.
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-7575-6>
18. *Dong S., Raffaele S., Kamoun S.* The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2015. V. 35. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.09.001>
19. *Fry W.E.* *Phytophthora infestans*: the itinerant invader; “late blight”: the persistent disease // *Phytoparasitica*. 2020. V. 48. P. 87.
<https://doi.org/10.1007/s12600-019-00778-3>
20. *Leesutthiphonchai W., Vu A.L., Ah-Fong A.M.V., Judelson H.S.* How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease // *Phytopathol.* 2018. V. 108. P. 916.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0130-IA>
21. *Dangl J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J.* Pivoting the plant immune system from dissection to deployment // *Science*. 2013. V. 341. P. 746.
<https://doi.org/10.1126/science.1236011>
22. *Wang Y., Tyler B.M., Wang Y.* Defense and counterdefense during plant-pathogenic oomycete infection // *Annu. Rev. Microbiol.* 2019. V. 73. P. 667.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120022>
23. *Cui H., Tsuda K., Parker J.E.* Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. P. 487
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>
24. *Białas A., Zess E.K., De la Concepcion J.C., Franceschetti M., Pennington H.G., Yoshida K., Upson J.L., Chanclud E., Wu C.H., Langner T., Maqbool A., Varden F.A., Derevnina L., Belhaj K., Fujisaki K. et al.* Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2018. V. 31. P. 34.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-08-17-0196-FI>
25. *Wang W., Jiao F.* Effectors of *Phytophthora* pathogens are powerful weapons for manipulating host immunity // *Planta*. 2019. V. 250. P. 413.
<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03219-x>
26. *Boevink P.C., Birch P.R.J., Turnbull D., Whisson S.C.* Devastating intimacy: the cell biology of plant–*Phytophthora* interactions // *New Phytol.* 2020.
<https://doi.org/10.1111/NPH.16650>
27. *Bradshaw J.E.* Review and analysis of limitations in ways to improve conventional potato breeding introgression of R genes in potato genomes by remote crosses and trans/cis-genesis // *Potato Res.* 2017. V. 60. P. 171.
<https://doi.org/10.1007/s11540-017-9346-z>
28. *Hardigan M.A., Laimbeer F.P.E., Newton L., Crisovan E., Hamilton J.P., Vaillancourt B., Wiegert-Rininger K., Wood J.C., Douches D.S., Farré E.M., Veilleux R.E., Buell C.R.* Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114: e9999.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1714380114>
29. *Ghislain M., Douches D.S.* The genes and genomes of the potato // *The Potato Crop* / Eds. Campos H., Ortiz O. Cham: Springer, 2020. P. 139.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_5
30. *Vossen J.H., Dezhsetan S., Esselink D., Arens M., Sanz M.J., Verweij W., Verzaux E., van der Linden C.G.* Novel applications of motif-directed profiling to identify disease resistance genes in plants // *Plant Methods*. 2013. V. 9. P. 37. <https://www.plantmethods.com/content/9/1/37>
31. *Bethke P.C., Halterman D.H., Jansky S.H.* Potato germplasm enhancement enters the genomics era // *Agronomy*. 2019. V. 9. P. 575.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9100575>
32. *Mundt C.C.* Pyramiding for resistance durability: Theory and practice // *Phytopathol.* 2018. V. 108. P. 792.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>
33. *Draffehn A.M., Li L., Krezdorn N., Ding J., Lübeck J., Strahwald J., Muktar M.S., Walkemeier B., Rotter B., Gebhardt C.* Comparative transcript profiling by SuperSAGE identifies novel candidate genes for controlling potato quantitative resistance to late blight not compromised by late maturity // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 423.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00423>
34. *Jupe F., Witek K., Verweij W., Sliwka J., Pritchard L., Etherington G.J., Maclean D., Cock P.J., Leggett R. M., Bryan G. J., Cardle L., Hein I., Jones J.D.G.* Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations // *Plant J.* 2013. V. 76. P. 530.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12307>
35. *Witek K., Jupe F., Witek A.I., Baker D., Clark M.D., Jones J.D.G.* Accelerated cloning of a potato late blight–resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing // *Nature Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 656.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3540>
36. *Gaiero P., Speranza P., de Jong H.* Introgressive hybridization in potato revealed by novel cytogenetic and genomic technologies // *Am. J. Potato Res.* 2018. V. 95. P. 607.
<https://doi.org/10.1007/s12230-018-9669-6>
37. *Armstrong M.R., Vossen J., Lim T.Y., Hutten R.C.B., Xu J., Strachan S.M., Harrower B., Champouret N., Gilroy E.M.,*

- Hein I. Tracking disease resistance deployment in potato breeding by enrichment sequencing // *Plant Biotech. J.* 2019. V. 17. P. 540.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12997>
38. Thilliez G.J., Armstrong M.R., Lim T.Y., Baker K., Jouet A., Ward B., van Oosterhout C., Jones J.D.G. Huitema E., Birch P.R.J., Hein I. Pathogen enrichment sequencing (PenSeq) enables population genomic studies in oomycetes // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 1634.
<https://doi.org/10.1111/nph.15441>
 39. Khavkin E.E. Potato late blight as a model of pathogen-host plant coevolution // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 408.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715030103>
 40. Zipfel C. Plant pattern-recognition receptors // *Trends in Immunology.* 2014. V. 35. P. 345.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>
 41. Kourelis J., van der Hoorn R.A.L. Defended to the Nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function // *Plant Cell.* 2018. V. 30. P. 285.
<https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579>
 42. Liang X., Zhou J. M. Receptor-like cytoplasmic kinases: central players in plant receptor kinase-mediated signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018. V. 69. P. 267.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040540>
 43. Yu X., Feng B., He P., Shan L. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2017. V. 55. P. 109.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
 44. Du J., Tian Z., Liu J., Vleeshouwers V.G., Shi X., Xie C. Functional analysis of potato genes involved in quantitative resistance to *Phytophthora infestans* // *Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 40. P. 957.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2137-3>
 45. Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M., Muktar M.S., Paulo M.J., Steinemann S., Li J., Draffehn A., Hofmann A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferber H.R., Walkemeier B., Gebhardt C. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans*, causing the late blight disease // *PLoS One.* 2016. V. 11: e0156254.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156254>
 46. Fawke S., Doumane M., Schornack S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015. V. 79. P. 263.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-15>
 47. Toruño T.Y., Stergiopoulos I., Coaker G. Plant-pathogen effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners // *Annu Rev Phytopathol.* 2016. V. 54. P. 419.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
 48. Couto D., Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. V. 16. P. 537.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>
 49. Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971. V. 9. P. 275.
 50. van Wersch S., Li X. Stronger when together: Clustering of plant *NLR* disease resistance genes // *Trends Plant Sci.* 2019. V. 24. P. 688.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.005>
 51. Andrivon D. The hard life of *Phytophthora infestans*: when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen // *Plant Pathol.* 2013. V. 62. P. 28.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12164>
 52. Pasco C., Montarry J., Marquer B., Andrivon D. And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans* // *New Phytol.* 2016. V. 209. P. 334.
<https://doi.org/10.1111/nph.13581>
 53. Upson J.L., Zess E.K., Białas A., Wu C.H., Kamoun S. The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant-microbe interactions across multiple timescales // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. V. 44. P. 108.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.003>
 54. Young G.K., Cooke L.R., Watson S., Kirk W.W., Perez F.M., Deahl K.L. The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations // *Plant Pathol.* 2018. V. 67. P. 1539.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12856>
 55. Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C., Jiang R.H.Y., Handsaker R.E., Cano L.M., Grabherr M., Kodira C.D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T.O. Ah-Fong A.M., Alvarado L., Anderson V.L., Armstrong M.R. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // *Nature.* 2009. V. 461. P. 393.
<https://doi.org/10.1038/nature08358>
 56. Fouche S., Plissonneau C., Croll D. The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes // *Curr. Opin. Microbiol.* 2018. V. 46. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.020>
 57. Duan Y., Duan S., Armstrong M.R., Xu J., Zheng J., Hu J., Chen X., Hein I., Li G., Jin L. Comparative transcriptome profiling reveals compatible and incompatible patterns of potato toward *Phytophthora infestans*. G3: Genes, Genomes // *Genetics.* 2020. V. 12. P. 1.
<https://doi.org/10.1534/g3.119.400818>
 58. Yin J., Gu B., Huang G., Tian Y., Quan J., Lindqvist-Kreuzer H., Shan W. Conserved RXLR effector genes of *Phytophthora infestans* expressed at the early stage of potato infection are suppressive to host defense // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 2155.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02155>
 59. Frantzeskakis L., Kusch S., Panstruga R. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens: Multiple “speeds” in phytopathogen genomes // *Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 20. P. 3.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12738>
 60. Pais M., Yoshida K., Giannakopoulou A., Pel M.A., Cano L.M., Oliva R.F., Witek K., Lindqvist-Kreuzer H., Vleeshouwers V.G.A.A., Kamoun S. Gene expression polymorphism underpins evasion of host immunity in an asexual lineage of the Irish potato famine pathogen // *BMC Evol. Biol.* 2018. V. 18. P. 93.
<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1201-6>

61. Knaus B., Tabima J., Shakya S., Judelson H., Grünwald N. Genome-wide increased copy number is associated with emergence of super-fit clones of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // mBio. 2020. V. 11:e00326-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00326-20>
62. Chen H., Chen H., Shu H., Wang L., Zhang F., Li X., Ochola S.O., Mao F., Ma H., Ye W., Gu T., Jiang T., Wu Y., Wang Y. et al. *Phytophthora* methylomes are modulated by 6mA methyltransferases and associated with adaptive genome regions // Genome Biol. 2018. V. 19. P. 181. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1564-4>
63. Birch P.R., Armstrong M., Bos J., Boevink P., Gilroy E.M., Taylor R.M., Wawra S., Pritchard L., Conti L., Ewan R., Whisson S.C., van West P., Sadanandom A., Kamoun S. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1133. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern353>
64. Oh S.-K., Young C., Lee M., Oliva R., Bozkurt T.O., Cano L.M., Win J., Bos J.I.B., Liu H.-Y., van Damme M., Morgan W., Choi D., Van der Vossen E.A.G., Vleeshouwers V.G.A.A., Kamoun S. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein *Rpi-blb2* // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2028. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068247>
65. Rietman H. Putting the *Phytophthora infestans* genome sequence at work; multiple novel avirulence and potato resistance gene candidates revealed. PhD thesis. Wageningen: Wageningen University, 2011. 169 p. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/406778>
66. Vleeshouwers V.G., Oliver R.P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens // Mol. Plant-Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 196. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0313-IA>
67. Wang S., McLellan H., Bukharova T., He Q., Murphy F., Shi J., Sun S., van Weymers P., Ren Y., Thilliez G., Wang H., Chen X., Engelhardt S., Vleeshouwers V., Gilroy E.M. et al. *Phytophthora infestans* RXLR effectors act in concert at diverse subcellular locations to enhance host colonization // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 343. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery360>
68. Gibriel H.A.Y., Thomma B.P.H.J., Seidl M.F. The age of effectors: Genome-based discovery and applications // Phytopathol. 2016. V. 106. P. 1206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0110-FI>
69. Boevink P.C., McLellan H., Gilroy E.M., Naqvi S., He Q., Yang L., Wang X., Turnbull D., Armstrong M.R., Tian Z., Birch P.R.J. Oomycetes seek help from the plant: *Phytophthora infestans* effectors target host susceptibility factors // Mol. Plant. 2016. V. 9. P. 636. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.005>
70. Naveed Z.A., Bibi S., Ali G.S. The *Phytophthora* RXLR effector Avrblb2 modulates plant immunity by interfering with Ca₂₊ signaling pathway // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00374>
71. Turnbull D., Wang H., Breen S., Malec M., Naqvi S., Yang L., Welsh L., Hemsley P., Zhendong T., Brunner F., Gilroy E.M., Birch P.R.J. AVR2 targets BSL family members, which act as susceptibility factors to suppress host immunity // Plant Physiol. 2019. V. 180. P. 571. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01143>
72. Ren Y., Armstrong M., Qi Y., McLellan H., Zhong C., Du B., Birch P.R.J., Tian Z. *Phytophthora infestans* RXLR effectors target parallel steps in an immune signal transduction pathway // Plant Physiol. 2019. V. 180. P. 2227. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00625>
73. Black W., Mastenbroek C., Mills W.R., Peterson L.C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives // Euphytica. 1953. V. 2. P. 173.
74. Malcolmson J.F. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain // Trans. British Mycol. Soc. 1969. V. 53. P. 417. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(69\)80099-9](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(69)80099-9)
75. Bos J.I.B., Armstrong M.R., Gilroy E.M., Boevink P.C., Hein I., Taylor R.M., Tian Z., Engelhardt S., Vetukuri R.R., Harrower B., Dixelius C., Bryan G., Sadanandom A., Whisson S.C., Kamoun S. et al. *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107:9909–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914408107>
76. Halterman D.A., Chen Y., Sopee J., Berduo-Sandoval J., Sánchez-Pérez A. Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance // PLoS One. 2010. V. 5: e10536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010536>
77. Oliva R.F., Cano L.M., Raffaele S., Win J., Bozkurt T.O., Belhaj K., Oh S.-K., Thines M., Kamoun S. A recent expansion of the RXLR effector gene *Avrblb2* is maintained in global populations of *Phytophthora infestans* indicating different contributions to virulence // Mol. Plant-Microbe Interact. 2015. V. 28. P. 901. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0393-R>
78. Gilroy E.M., Breen S., Whisson S.C., Squires J., Hein I., Kaczmarek M., Turnbull Boevink P.C., Lokossou A., Cano L.M., Morales J., Avrova A.O., Pritchard L., Randall E., Lees A. et al. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between *PiAVR2* and *PiAVR2*-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants // New Phytol. 2011. V. 191. P. 763. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03736.x>
79. Du Y., Weide R., Zhao Z., Msimuko P., Govers F., Bouwmeester K. RXLR effector diversity in *Phytophthora infestans* isolates determines recognition by potato resistance proteins; the case study AVR1 and R1 // Stud. Mycol. 2018. V. 89. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.003>
80. Pel M.A. Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato. PhD Thesis. Wageningen: Wageningen University,

2010. 209 p. <https://library.wur.nl/WebQuery/wur-pubs/392076>
81. *Stefańczyk E., Brylińska M., Brurberg M.B., Naerstad R., Elameen A., Sobkowiak S., Śliwka J.* Diversity of *Avr-vnt1* and *AvrSmira1* effector genes in Polish and Norwegian populations of *Phytophthora infestans* // *Plant Pathol.* 2018. V. 67. P. 1792. <https://doi.org/10.1111/ppa.12875>
 82. *Yang L., Ouyang H.B., Fang Z.G., Zhu W., Wu E.J., Luo G.H., Shang L.P., Zhan J.* Evidence for intragenic recombination and selective sweep in an effector gene of *Phytophthora infestans* // *Evol. Appl.* 2018. V. 11. P. 1342. <https://doi.org/10.1111/eva.12629>
 83. *Lin X., Song T., Fairhead S., Witek K., Jouet A., Jupe F., Witek A.I., Vleeshouwers V.G.A.A., Hein I., Jones J.D.G.* Identification of *Avramr1* from *Phytophthora infestans* using long read and cDNA pathogen-enrichment sequencing (PenSeq) // *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.095158>
 84. *Gebhardt C.* Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato // *Trends Genet.* 2013. V. 29. P. 248. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.006>
 85. *Tiwari J.K., Siddappa S., Singh B.P., Kaushik S.K., Chakrabarti S.K., Bhardwaj V., Chandel P.* Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: An update // *Plant Breed.* 2013. V. 132. P. 237. <https://doi.org/10.1111/pbr.12053>
 86. *Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., Sevillano R.H.B., Riseman A.* Review of potato molecular markers to enhance trait selection // *Am. J. Potato Res.* 2015. V. 92. P. 455. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9455-7>
 87. *Li Y., Colleoni C., Zhang J., Liang Q., Hu Y., Ruess H., Simon R., Liu Y., Liu H., Yu G., Schmitt E., Ponitzki C., Liu G., Huang H., Zhan F. et al.* Genomic analyses yield markers for identifying agronomically important genes in potato // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. P. 473. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.01.009>
 88. *Danan S., Veyrieras J.-B., Lefebvre V.* Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits // *BMC Plant Biol.* 2011. V. 11. P. 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-16>
 89. *Witek K., Lin X., Karki H.S., Jupe F., Steuernagel B., Stam R., van Oosterhout C., Fairhead S., Cocker J.M., Bhanvadia S., Barrett W., Song T., Vleeshouwers V.G.A.A., Tomlinson L., Wulff B.B.H. et al.* A complex non-host resistance locus in *Solanum americanum* recognizes a conserved *Phytophthora* effector // *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.15.095497>
 90. *The Potato Genome Sequencing Consortium.* Genome sequence and analysis of the tuber crop potato // *Nature.* 2011. V. 475. P. 189. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
 91. *Jupe F., Pritchard L., Etherington G.J., Mackenzie K., Cock P.J., Wright F., Sharma S.K., Bolser D., Bryan G.J., Jones J.D.G., Hein I.* Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-75>
 92. *Kyriakidou M., Achakkagari S.R., López G.J.H., Zhu X., Tang C.Y., Tai H.H., Anglin N.L., Ellis D., Strömvik M.V.* Structural genome analysis in cultivated potato taxa // *Theor. Appl. Genet.* 2020. V. 133. P. 951. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03519-6>
 93. *Aversano R., Contaldi F., Ercolano M.R., Grosso V., Iorizzo M., Tatino F., Delledonne M.* The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives // *Plant Cell.* 2015. V. 27. P. 954. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135954>
 94. *Leisner C.P., Hamilton J.P., Crisovan E., Manrique-Carpintero N.C., Marand A.P., Newton L., Pham G.M., Jiang J., Douches D.S., Jansky S.H., Buell C.R.* Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high-glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity // *Plant J.* 2018. V. 94. P. 562. <https://doi.org/10.1111/tj.13857>
 95. *Aguilera-Galvez C., Champouret N., Rietman H., Lin X., Wouters D., Chu Z., Jones J.D.G., Vossen J.H., Vissers R.G.F., Wolters P.J., Vleeshouwers V.G.A.A.* Two different *R* gene loci co-evolved with *Avr2* of *Phytophthora infestans* and confer distinct resistance specificities in potato // *Studies Mycol.* 2018. V. 89. P. 105. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.002>
 96. *Slootweg E., Koropacka K., Roosien J., Dees R., Overmars H., Lankhorst R.K., van Schaik C., Pomp R., Bouwman L., Helder J., Schots A., Bakke J., Smant G., Goverse A.* Sequence exchange between homologous NB-LRR genes converts virus resistance into nematode resistance, and vice versa // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 498. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00485>
 97. *Gyetvai G., Sønderkær M., Göbel U., Basekow R., Ballvora A., Imhoff M., Kersten B., Nielsen K.-L., Gebhardt C.* The transcriptome of compatible and incompatible interactions of potato (*Solanum tuberosum*) with *Phytophthora infestans* revealed by DeepSAGE analysis // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e31526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031526>
 98. *Frades I., Abreha K.B., Proux-Wéra E., Lankinen Å., Andreasson E., Alexandersson E.* A novel workflow correlating RNA-seq data to *Phytophthora infestans* resistance levels in wild *Solanum* species and potato clones // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 718. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00718>
 99. *Chen X., Lewandowska D., Armstrong M.R., Baker K., Lim T.-Y., Bayer M., Harrower B., McLean K., Jupe F., Witek K., Lees A.K., Jones J.D., Bryan G.J., Hein I.* Identification and rapid mapping of a gene conferring broad spectrum late blight resistance in the diploid potato species *Solanum verrucosum* through DNA capture technologies // *Theor. Appl. Genet.* 2018. V. 131. P. 1287. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3078-6>
 100. *Gu B., Cao X., Zhou X., Chen Z., Wang Q., Liu W., Chen Q., Zhao H.* The histological, effectoromic, and transcriptomic analyses of *Solanum pinnatisectum* reveal an upregulation of multiple *NBS-LRR* genes suppressing *Phytophthora infestans* infection // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3211. <https://doi.org/10.3390/ijms21093211>

101. Zhu S., Vossen J.H., Bergervoet M., Nijenhuis M., Kodde L., Kessel G.J.T., Vleeshouwers V., Visser R.G.F., Jacobsen E. An updated conventional- and a novel GM potato late blight R gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans* // *Euphytica*. 2015. V. 202. P. 219.
<https://doi.org/10.1007/s10681-014-1276-0>
102. Birch P.R.J., Boevink P.C., Gilroy E.M., Hein I., Pritchard L., Whisson S.C. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. P. 373.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.005>
103. Van de Wouw A.P., Idnurm A. Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management // *Biotechnol. Adv.* 2019. V. 37: e10738.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.009>
104. Jiang R., Li J., Tian Z., Du J., Armstrong M., Baker K., Tze-Yin Lim J., Vossen J.H., He H., Portal L., Zhou J., Bonierbale M., Hein I., Lindqvist-Kreuze H., Xie C. Potato late blight field resistance from QTL dPI09c is conferred by the NB-LRR gene *R8* // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 1545.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery021>
105. Grünwald N.J., Flier W.G. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. V. 43. P. 171.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906>
106. Stam R., McDonald B.A. When resistance gene pyramids are not durable — the role of pathogen diversity // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 521.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12636>
107. Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. С. 30.
<https://doi.org/10.18699/VJ17.221>
108. Halterman D.A., Jansky S.H., Spooner D.M. Discovery of new sources of disease resistance using wild potato germplasm // *Am. J. Potato Res.* 2017. V. 94. P. 211.
<https://doi.org/10.1007/s12230-017-9581-5>
109. Ghislain M., Byarugaba A.A., Magembe E., Njoroge A., Rivera C., Román M.L., Tovar J.C., Gamboa S., Forbes G.A., Kreuze J.F., Barekye A., Kiggundu A. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races // *Plant Biotech. J.* 2019. V. 17. P. 1119.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13042>
110. Halford N.G. Legislation governing genetically modified and genome-edited crops in Europe: the need for change // *J. Sci. Food Agricult.* 2019. V. 99. P. 8.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9227>
111. Haesaert G., Vossen J. H., Custers R., De Loose M., Haverkort A., Heremans B., Hutten R., Kessel G., Landschoot S., Van Droogenbroeck B., Visser R.G.F., Gheysen G. Transformation of the potato variety Desiree with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions // *Crop Protect.* 2015. V. 77. P. 163.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.018>
112. Kessel G.J.T., Mullins E., Evenhuis A., Stellingwerf J., Cortes V.O., Phelan S., van den Bosch T., Förch M.G., Goedhart P., van der Voeta H., Lotz L.A.P. Development and validation of IPM strategies for the cultivation of cisgenically modified late blight resistant potato // *Eur. J. Agron.* 2018. V. 96. P. 146.
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.01.012>
113. Fadina O.A., Beketova M.P., Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Smetanina T.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Anticipatory breeding: molecular markers as a tool in developing donors of potato (*Solanum tuberosum* L.) late blight resistance from complex interspecific hybrids // *Agr. Biol.* 2017. V. 52. P. 84.
<https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.1.84eng>

УДК 581.1

ХИМИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ФОТОСИСТЕМЫ II

© 2021 г. С. К. Жармухамедов^а, С. И. Аллахвердиев^{б, *}

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пушкино, Россия

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

*e-mail: suleyman.allakhverdiev@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2020 г.

После доработки 11.08.2020 г.

Принята к публикации 11.08.2020 г.

Несмотря на регулярное появление новых все более точных и более эффективных методов научных исследований, ингибиторный анализ по-прежнему все еще занимает далеко не последнее место среди широко используемых экспериментальных подходов. Химические ингибиторы фотосистемы II также используются в качестве инструмента научного познания во многих современных исследованиях. Разрабатываются и/или выявляются новые химические ингибиторы, открываются новые и/или существенно корректируются уже исследованные эффекты известных ингибиторов. В обзоре представлена обобщенная информация как об известных (диурон (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), диносеб (2,4-динитро-6-втор-бутилфенол), ADRY-агенты (агенты, вызывающие ускорение реакций дезактивации системы окисления воды (Acceleration of the Deactivation Reactions of the water-splitting enzyme system Y)), так и о недавно выявленных химических ингибиторах ФС II (производные перфторизопропилдинитробензола, металлоорганические комплексы), а также о действии ингибиторов карбоангидраз на фотохимическую активность ФС II.

Ключевые слова: фотосистема II, химические ингибиторы, диурон, диносеб, производные перфторизопропилдинитробензола, металлоорганические комплексы, фотохимическая, карбоангидразная активность ФС II

DOI: 10.31857/S0015330321020226

ВВЕДЕНИЕ

Развитие науки сопровождается появлением новых данных во всех областях знаний. Знания о молекулярных механизмах действия известных и широко используемых в экспериментальных исследованиях химических агентов постоянно дополняются новой информацией, выявляются неизвестные ранее эффекты, уточняются концентрационные зависимости уже исследованных явлений. Это касается и химических ингибиторов фотосинтеза. В соответствии со свойствами и эффектами на фотохимическую активность фотосистемы II химические ингибиторы подразделяют на две большие группы, производные мочевины и триазина (диурон, атразин) и ингибиторы фенольного типа (диносеб). Основные эффекты диурона исследованы, и этот агент широко используется во множестве научных работ в качестве “тонкого инструмента” исследований. В то же

время появляется много сообщений о неизвестных ранее эффектах диурона, диносеба, дибромтимохинона (ДВМІВ) и других ингибиторов. Кроме блокирования переноса электрона на акцепторной стороне ФС II описаны эффекты диурона и на донорной стороне этой фотосистемы [1, 2]. Показано, что обратимое фотовосстановление феофитина (Pheo) в кислород-выделяющих препаратах ФС II ингибируется диуроном и реактивируется последующим добавлением экзогенного донора электрона, аскорбата [3, 4], что может свидетельствовать о способности диурона ингибировать активность донорной стороны ФС II. Показано, что диносеб способен к окислительно-восстановительному взаимодействию с компонентами реакционного центра (РЦ) ФС II [5, 6]. Показано, что ДВМІВ значительно тушит возбужденные состояния хлорофилла антенны ФС II даже при низкой концентрации [7]. Доминирование тех или иных эффектов (на донорной или акцепторной стороне ФС II) зависит не только от концентрации ингибирующего агента, но и от концентрации биологического образца [8]. Несомненно, исследователям, использующим в своих

Сокращения: КА – карбоангидраза, КАА – карбоангидразная активность, КВК – кислород-выделяющий комплекс, ПФИПДНБ – перфторизопропилдинитробензол, РЦ – реакционный центр, ТЛ – термолюминесценция, ФСА – фотосинтетическая активность, НА – гидроксилламин.

работах такие “химические инструменты”, необходимо в полной мере владеть этой информацией, чтобы иметь возможность избежать неправильного толкования получаемых результатов. Выявлена новая группа высокоэффективных ингибиторов переноса электрона в ФС II, производных перфторизо-пропилдинитробензола (ПФИПДНБ), действие которых основано на формировании короткого циклического переноса электрона с участием первичного донора и акцептора электрона феофитина и хлорофилла P_{680} соответственно (или, возможно, Y_Z) [9–11], показана их способность (в отличие от используемых ранее ингибиторов) проявлять ингибирующее действие на уровне изолированных комплексов D1/D2/цитохром b_{559} – комплексы реакционных центров (РЦ) [12], предохранять ФС II от фотоингибирования за счет образования указанного выше циклического переноса электрона вокруг ФС II с их участием [13], защищать от фотодеструкции в комплексах РЦ преимущественно белок D2 [14], причем местом их связывания в отличие от традиционных ингибиторов (диурина и атразина), очевидно, является не белок D1, а белок D2. Об этом свидетельствуют также результаты исследований места связывания производных ПФИПДНБ [15] и отсутствие конкуренции за место связывания между этими ингибиторами и диуроном [16]. Исследовано несколько больших групп новых металлоорганических комплексов способных одновременно эффективно подавлять как фотохимическую, так и карбоангидразную активность ФС II, а также активность нескольких ключевых ферментов растительной клетки [17–19]. Все эти новые результаты требуют тщательного и подробного рассмотрения. Не менее важно, особенно для начинающих экспериментаторов, иметь подробную информацию о самых разных возможных проявлениях действия известных ингибиторов при измерении широко используемых реакций, характеризующих активность ФС II. В современных публикациях в основном описаны главные, устоявшиеся, общепринятые представления о механизмах действия ингибиторов, причем достаточно кратко. Однако почти полностью отсутствует описание детального проявления их действия. Эта информация хорошо отражена в первоначальных работах, в публикациях 70–90-х гг., в которых эффекты ингибиторов не только подробно описаны, но и не менее подробно и обоснованно объяснены. Поэтому еще одной задачей обзора было рассмотрение работ тех лет.

ИНГИБИТОРЫ ДИУРОНОВОГО И ТРИАЗИНОВОГО ТИПА

Диурон и монурон как ингибиторы фотосинтетического транспорта электрона впервые были описаны в работе Весельса и Ван-Дер-Вина в

1956 году [20]. Позже было показано, что эти соединения не ингибируют фотовыделение водорода в ФС I, циклическое фотофосфорилирование, фотовосстановление НАДФ⁺ от восстановленного 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). На основании гипотезы, что флуоресценция (F) хлорофилла ФС II тушится окисленной формой первичного акцептора электрона Q_A , и того факта, что диурон вызывает значительное увеличение выхода F (подобно воздействиям, приводящим к накоплению Q_A в восстановленном состоянии), было высказано предположение, что диурон блокирует перенос электрона между Q_A и вторичным акцептором электрона Q_B (пулом пластохинонов). Далее в целом ряде экспериментов было показано, что диуриновые и триазиновые ингибиторы блокируют транспорт электрона перед пулом пластохинонов; подавляют темновое реокисление электрон-транспортного компонента X-320 (Q_A) [20]. Позже [21, 22] было показано, что ингибиторы диуринового и триазинового типа блокируют транспорт электронов на уровне комплекса пластохинонов ($Q_A Q_B$) и что механизм их действия заключается в понижении среднеточечного окислительно-восстановительного потенциала Q_B относительно Q_A , делающим прямой перенос электрона от Q_A^- к Q_B термодинамически невозможным и тем самым предотвращающим транспорт электрона между ними. Это предположение подтверждалось рядом экспериментальных данных, которые можно было объяснить индукцией обратного потока электронов от Q_B^- к Q_A в присутствии ингибитора. В 1981–1982 гг. в исследованиях на пурпурных фотосинтезирующих бактериях [23] и на ФС II растений [24] было показано, что Q_B может замещаться молекулой ингибитора в Q_B -связывающем участке. При этом ингибирование транспорта электрона происходит вследствие того, что скорость освобождения молекулы ингибитора с Q_B -связывающего участка во много раз меньше скорости освобождения $Q_B H_2$ [25, 26]. Эти ингибиторы (триазины, мочевины), связанные с Q_B -участком, не могут восстанавливаться от Q_B^- , и транспорт электрона по этой причине прерывается. На основе предложенного механизма замещения пластохинона гербицидом можно объяснить отмеченный ранее [21, 22] факт индукции обратного потока электронов от Q_B^- к Q_A в присутствии ингибитора. Перенос электрона $Q_A^- Q_B \leftrightarrow (Q_A Q_B)^- \leftrightarrow Q_A Q_B^-$ обратим и происходит с константой равновесия 10–30 [23–27]. Попав на пластохиноновый комплекс ($Q_A Q_B$), электрон ~95% времени локализован на Q_B (состояние $Q_A Q_B^-$), а остаток времени – на Q_A (состо-

яние $Q_A^- Q_B^-$). В тот момент, когда $(Q_A Q_B)^-$ комплекс находится в состоянии $Q_A^- Q_B^-$, пластохинон может покинуть, а гербицид может занять связывающий участок, блокируя связывание нового пластохинона с Q_B^- -участком. Таким образом, создается впечатление, что ингибитор индуцирует обратный поток электрона от Q_B^- к Q_A [21]. В соответствии с этим объяснением, связывание гербицида значительно уменьшается в комплексах в состоянии $(Q_A Q_B)^-$ по сравнению с комплексами с окисленными пластохинонами [28]. $Q_B H_2$ слабо связан с D1-белком и значительно легче замещается молекулой ингибитора, чем Q_B^- . В то же время Q_B^- гораздо прочнее связан, чем Q_B [29]. Диурон [30] и атразин [31] замещают пластохинон PQ и пластохинол PQH₂, но не семихинон в Q_B^- -связывающем участке (измерено по бинарной осцилляции связывающего сродства ингибитора от номера вспышки). Связывание атразина ингибируется в присутствии либо эндогенного пластохинона (в восстановленной форме Q_B^-), либо экзогенного аналога пластохинона [32]. Отмытые от пластохинона тилакоиды эффективно связывают ¹⁴C-диурон, но это связывание нарушается добавлением пластохинона [33]. Замена одной аминокислоты в белке D1, приводящая к появлению устойчивости к целому ряду ингибиторов ФС II, сопровождается значительным (более, чем в 20 раз) уменьшением константы равновесия между Q_A^- и Q_B [23–27]. Это подтверждается также тем фактом, что устойчивые биотипы имеют квантовый выход разделения и стабилизации зарядов на 25–30% меньший, чем у чувствительных растений [34]. Имеется значительное количество данных, свидетельствующих о существовании дополнительных мест действия [35, 36] и целом ряде дополнительных эффектов ингибиторов диуронного и триазинового типов на уровне ФС II. Кроме блокирования переноса электрона на акцепторной стороне ФС II описаны эффекты диурона и на донорной стороне этой фотосистемы [1–4, 37–39]. Показано, что обратимое фотовосстановление Pheo в субхлоропластных кислород-выделяющих препаратах ФС II в анаэробных условиях ингибируется диуроном и реактивируется при последующем добавлении экзогенного донора электрона, аскорбата [3, 4], что может свидетельствовать о способности диурона ингибировать активность донорной стороны ФС II. Уменьшение флуоресценции, связанное с окислением Q_A^- под действием света 1 (свет, возбуждающий преимущественно ФС I, >710 нм), ингибируется диуроном и не реактивируется аскорбатом (в отличие от эффекта, связанного с фотовосстановлением феофитина под действием света 2 [3, 4].

Представлены результаты исследования мест действия четырнадцати ингибиторов ФС II, имеющих разную химическую природу и относящихся к разным типам ингибиторов ФС II [37]. Получены неопровержимые результаты, подтверждающие существование второго сайта ингибирования исследованными агентами на донорной стороне ФС II. Первоначально было обнаружено, что эти ингибиторы подавляют фотовосстановление силикомolibдата тилакоидами хлоропластов, использующими воду в качестве донора электронов [37]. Это указывало на сайт, отличный от хорошо охарактеризованного сайта ингибирования на акцепторной стороне ФС II на D1 белке. Кроме того, на основе данных флуоресценции и способности экзогенного донора электронов, дифенилкарбазида, преодолевать подавление реакции фотовосстановления DCIP в случае всех исследованных ингибиторов кроме бутиадола, сделано заключение о том, что существует второй участок действия этих ингибиторов на донорной стороне ФС II [37]. Исследовано влияние диурона на относительный средний выход кислорода на одну вспышку в зависимости от времени между вспышками в хлоропластах шпината [38]. Обнаружено, что в концентрации, при которой заблокировано около 80% цепей переноса электронов ФС II, относительный средний выход кислорода на вспышку уменьшается с увеличением темного интервала между вспышками [38]. Сделано заключение о том, что диурон не только действует как ингибитор акцепторной стороны ФС II, но также ускоряет спад положительных зарядов, хранящихся в КВК (кислород-выделяющем комплексе) ФС II [38]. Показано, что подкисление хлоропластов в темноте вызывает снижение способности ферроцианида восстанавливать окисленный цитохром b_{559} , которое обратимо при повышении pH [39]. Этот эффект подавляется, если в среду перед подкислением добавляется диурон в относительно низких концентрациях (примерно в 4 раза меньших концентраций, необходимых для подавления переноса электрона на акцепторной стороне ФС II) [39]. Выдвинуто предположение, что способность низких концентраций диурона оказывать специфический эффект на b_{559} подразумевает, что цитохром b_{559} может быть одним из основных сайтов действия диурона [39]. Исследованы эффекты диурона на переходный процесс индукции F хлорофилла (OJIP) у высших растений и обнаружено, что начальный (F_0) и максимальный (F_M) уровни F листьев, обработанных диуроном, не изменяются относительно контроля, если обработка проводится в полной темноте и диурон медленно диффундирует в листья [40]. Путем одновременного измерения пропускания при 820 нм (измерения потока электронов через ФС I) показано, что в образцах, обработанных диуроном, пул пластохинона остается окисленным во время свето-

вых импульсов, тогда как в необработанных листьях уровень F_M совпадает с уровнем F_M листьев с полностью восстановленной цепью транспорта электронов. Одинаковые значения величин F_M в обработанных и необработанных диуроном образцах указывают на то, что в неповрежденных листьях значение F_M не зависит от окислительно-восстановительного состояния пула пластохинонов [40]. Кроме того, показано, что обычно наблюдаемое увеличение F_0 , вероятно, связано с присутствием (даже очень слабого) света во время обработки диуроном, и что в тилакоидных мембранах в присутствии диурана уровень F_M ниже по сравнению с уровнем F_M контрольного образца [40]. Впервые представлена кристаллическая структура ФС II [41]. Коровые комплексы ФС II выделены из клеток термофильных цианобактерий *Thermosynechococcus elongatus* с ингибитором, связанным с ФС II, тербутрином, с разрешением 3.2 ангстрема [41]. Было обнаружено, что исследованный ингибитор связывается по крайней мере двумя водородными связями с Q_B -сайтом подобно тому, как это имеет место у аноксигенных пурпурных бактерий. Обсуждается связывание ингибиторов с ФС II с точки зрения влияния на окислительно-восстановительный потенциал Q_A [41].

ФЕНОЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ СРАВНЕНИЕ ИНГИТОРОВ ФЕНОЛЬНОГО И ДИУРОНОВОГО ТИПА

В 1979 году ингибиторы ФС II окончательно разделили на две большие группы: диуронового и фенольного типа [42]. Замещенные фенолы (диносеб, иоксинил, нитрофен, бромнитротимол, трифлуралин, тринитрофенол, динитро-о-крезол и т. д.) химически значительно отличаются от ингибиторов типа диурана и атразина и, тем не менее, имеют сходный эффект на электронный транспорт, подавляя восстановление пластохинона на акцепторной стороне ФС II [42]. Детальное рассмотрение ингибиторов фотосинтеза представлено в обзорах Гольдфельда и Карапетяна [43, 44]. Диурон вызывает увеличение флуоресценции хлорофилла ФС II, осциллирующее с периодом два в зависимости от номера вспышки [21]. Полагают, что этот подъем F является следствием переноса электрона от Q_B^- к Q_A индуцированного замещением Q_B ингибитором [28]. Подобная осцилляция F была найдена и для атразина, пирозола, диносеба, иоксинила и бромнитротимола с максимумом на четную (начиная с первой) и минимумом на четную (вторую) вспышки [45]. При этом измерение F проводили, используя слабый измерительный свет, не способный вызвать подъем F . Добавление гидроксилamina (НА) нарушает донорную сторону ФС II, а электроны, идущие на фотовосстановление Q_B , поставляют-

ся (НА) [46]. Увеличение уровня F_0 , индуцированное добавлением ингибитора после темновой адаптации предварительно освещенных хлоропластов в этих условиях, свидетельствует о блокировании потока электронов на акцепторной стороне ФС II. Иоксинил, трифлуралин и нитрофен, в отличие от диурана, не вызывали увеличения F_0 [22]. В то же время, в работе [45] показано, что иоксинил вызывает увеличение F_0 . При непрерывном освещении нитрофен, трифлуралин, подобно диурону вызывают возрастание F_0 хлорофилла ФС II, а диносеб и иоксинил – нет [22]. В работе [45], наоборот, показано, что только иоксинил вызывает увеличение F_0 . Показано, что фенольные ингибиторы (так же как диурон) блокируют процесс фотопереноса электрона между Q_A и Q_B на серию вспышек света [47], измеряемого по ΔA при 320 нм, связанным с образованием анион-радикала семихинона. Эти ΔA осциллируют с периодом два (с уменьшением поглощения в состояниях $Q_A Q_B$ и $Q_A Q_B H_2$ и увеличением поглощения в состоянии $Q_A Q_B^-$) поскольку состояние $Q_A^- Q_B$ за ~ 200 пс переходит в состояние $Q_A Q_B^-$. Однако после обработки хлоропластов (НА) в темноте и нескольких циклов освещения диносеб вызывает инвертирование ΔA при 320 нм с увеличением на первую и уменьшением на вторую вспышки [47]. Подобный эффект наблюдается при добавлении 4-динитрофенилового эфира 2-иод-4-нитротимола – ингибитора реокисления PQ_{B_2} пластохинон-пластоцианин оксидоредуктазой [42]. Фенольные ингибиторы значительно отличаются от ингибиторов диуронового и триазинового типа по эффектам на ЭПР-сигналы $Q_A-Fe(II)$ и $Pheo^-$ [48]; полосы термолюминесценции ФС II [49]. Ингибирование переноса электрона между Q_A и Q_B ингибиторами диуронового и триазинового типа приводит к исчезновению В-полосы термолюминесценции ($+30^\circ C$), связанной с рекомбинацией зарядов (B1) $S_2 Q_B^-$, и (B2) $S_3 Q_B^-$ [49]. Вместо нее появляется новая полоса ($10^\circ C$), связанная с рекомбинацией зарядов $S_2 Q_A^-$. Ее обозначают D или Q [49]. Фенольные ингибиторы вызывают сдвиг D-полосы ($15^\circ C$) [49]. Сохранение D(Q) полосы в присутствии фенольных ингибиторов свидетельствует об их действии между Q_A и P_Q -пулом. Разное действие фенольных и диурановых-триазиновых ингибиторов на D-полосу используется для исследования их конкуренции [49]. Применение термолюминесценции для исследования фотосинтетических объектов и действия на них гербицидов подробно описано [49]. Ряд фактов указывают на существование второго места действия фенольных ингибиторов на донорной стороне ФС II. Так, нитрофлуор-

фен, иоксинил, бутидазол, бромиксинил, диносеб подавляют фотовосстановление молибдата кремния [37], акцептирующего электроны до или от Q_A^- . Искусственные доноры электрона (H_2O_2 и дифенилкарбазид) предотвращают блокирование этими ингибиторами фотовосстановления дихлорфенолиндофенола [37]. Однако в более ранней работе [22] показано, что иоксинил и диносеб не подавляют фотосинтетическое выделение кислорода с молибдатом кремния в качестве акцептора электрона. Добавление диурана, атразина, диносеба, иоксинила и бромнитротимола вызывает после предварительной вспышки света высвечивание замедленной люминесценции ФС II. Она обусловлена рекомбинацией отрицательного заряда на Q_A^- и положительного заряда, запасенного на донорной стороне ФС II [45]. При внесении ингибитора диуранового типа замедленная люминесценция на последующие вспышки остается высокой и неизменной. В случае производных фенола происходит постепенное (от вспышки к вспышке) понижение уровня замедленной люминесценции, подобно тому, как это имеет место при добавлении гидроксиланамина (0.1 мМ) [45]. В присутствии диурана вспышка света вызывает подъем F до максимального уровня F_M . Спад F в этом случае происходит в основном за счет рекомбинации отрицательного заряда на Q_A^- и положительного заряда, запасенного на донорной стороне ФС II. Разрушение кислородвыделяющего комплекса гидроксиланмином предотвращает рекомбинацию. В этом случае F сохраняется на максимальном уровне [45]. F_0 измеряли слабым измерительным светом, а перенос электрона индуцировали 25 мс вспышками, следующими с 20 с темновым интервалом. В подобных экспериментах, в отсутствие диурана и НА, показано, что бромнитротимол, диносеб и иоксинил вызывают постепенное увеличение уровня F. При этом десять 25 мс вспышек оказались в 10 раз эффективнее одной 250 мс вспышки. В то же время, определяющей оказалась и длительность темнового интервала [45]. Сделан вывод, что в ингибировании донорной стороны фенольными ингибиторами, происходящем, вероятно, на участке действия НА, задействован некий продукт, образующийся в фотоакте и претерпевающий модификацию в последующей темновой стадии. Ингибиторы диуранового типа не вызывают подобных эффектов. ЭПР сигнал P_S , приписываемый катион-радикалу тирозина-160 белка D2 ФС II, присутствующий в неосвещенных мембранах ФС II, полностью исчезает при добавлении диносеба, но практически не изменяется в присутствии диурана [48]. Подобный эффект вызывают восстановители и некоторые ADRY-агенты [50]. Фенольные ингибиторы вызывают также ускорение темнового спада ЭПР-

сигнала P_S , связанного с фотоокислением вторичного донора электрона тирозина 161 D-белка, в трис-обработанных препаратах ФС II [50]. Этот факт указывает на прямое донирование электрона от ингибитора к Y_Z^+ либо является следствием индуцированных ингибитором изменений, модифицирующих нормальный путь транспорта электронов в ФС II [51]. Диносеб также превращает восстановленную высокопотенциальную форму цитохрома b_{559} , обычно присутствующую в неосвещенных мембранах ФС II, в окисленную низкопотенциальную форму [48]. Добавление фенольных ингибиторов приводит к фотоокислению каротиноидов, регистрируемому по характерному увеличению поглощения при 990 нм после возбуждения вспышкой света, тогда как ни атразин, ни диуран, ни о-фенантролин таких эффектов не вызывают [51]. В порядке уменьшения эффективности окисления каротиноидов они могут быть расположены в следующий ряд: диносеб, бромнитротимол, тринитрофенол, иоксинил, динитро-о-крезол, 2,4-динитрофенол. Количество катион-радикала каротиноида, образованного в присутствии ингибитора, зависит от pH среды и значительно увеличивается при pH ниже 5.5 [51]. При низких значениях pH скорость фотообразования катион-радикала каротиноида в присутствии ингибитора уменьшается при разрушении водоокисляющей системы ФС II [51]. Большинство из рассмотренных свойств характерно для группы соединений, обозначаемых как ADRY-агенты — химических соединений, ускоряющих спад запасающих заряд S-состояний кислородвыделяющего комплекса ФС II [50, 52, 53]. Предполагается, что многие из этих эффектов фенольных ингибиторов обусловлены их прямым взаимодействием с компонентами донорной стороны ФС II. В пользу того, что некоторые ингибирующие эффекты фенольных производных обусловлены их способностью к окислительно-восстановительному взаимодействию с компонентами ФС II свидетельствует ряд литературных данных. Так показано сенсibilизированное хлорофиллом фотовосстановление орто- и пара-динитробенzenов, при этом эффективность восстановления связана с окислительно-восстановительным потенциалом исследованных соединений. Сообщается о восстановлении нитрогрупп до аминогрупп известного ингибитора фенольного класса — диносеба [54]. Показано, что механизм ингибирования фотохимической активности ФС II ингибиторами фенольного класса — ионолом и его аналогами (антиоксидантами фенольной природы A1—A0), вероятно, заключается в способности этих соединений донировать электрон в условиях конкуренции с процессами фотосинтетического окисления воды [55]. Об окислительно-восстановительных превращениях фенольных соединений в хлоропластах сообщается в работе [56].

Показано, что фенольный ингибитор кверцетин эффективно подавляет фотосинтетический транспорт электрона, причем в основе механизма его действия лежит способность к окислительно-восстановительному взаимодействию с ФС II, а именно в способности кварцетина при определенных условиях выступать в качестве экзогенного конкурентного донора электрона, альтернативного кислород-выделяющему комплексу ФС II [56]. Обнаружена способность фенольного гербицида диносеба к окислительно-восстановительному взаимодействию с компонентами РЦ ФС II – феофитином и хлорофиллом P_{680} [57]. Показано, что добавление диносеба в концентрации 5 мкМ и выше к субхлоропластным препаратам ФС II гороха вызывает ускорение темновой релаксации и уменьшение величины изменений поглощения (ΔA) и флуоресценции (ΔF), связанных с фотовосстановлением Pheo в анаэробных условиях. Диносеб вызывает также подавление фотоиндуцированных изменений F (ΔF), отражающих фотовосстановление акцептора электрона Q_A и фотоиндуцированных изменений поглощения (ΔA), характеризующих фотоокисление P_{680} [57]. При добавлении дитионита, вызывающего темновое восстановление диносеба, все описанные выше эффекты исчезают. При этом у диносеба появляется способность к блокированию электрона(ов) на РЦ ФС II. Предполагается, что окислительно-восстановительное взаимодействие с первичной ион-радикальной парой вызывающее уменьшение ее времени жизни, вносит вклад в общий эффект ингибирования диносебом переноса электронов в ФС II [57].

Термолюминесценция (ТЛ) как проба фотохимии ФС II; природа пиков ТЛ ФС II хлоропластов в отсутствие и в присутствии ингибиторов ФС II; данные о действии ингибиторов ФС II, подавляющих поток электронов на акцепторной стороне ФС II, а также о том, как ингибиторы ФС II влияют на ее донорную сторону и вызывают сдвиг окислительно-восстановительного потенциала S-состояний, полученные методом ТЛ; наиболее характерные изменения кривой свечения ТЛ хлоропластов, обработанных химически разными ингибиторами ФС II; метод ТЛ как инструмент изучения конкурентного вытеснения разных ингибиторов ФС II с Q_B -связывающего сайта; влияние ингибиторов ФС II на ТЛ хлоропластов, обработанных трипсином; определение участков действия гербицидов с помощью данных полученным методом измерения кривых ТЛ; механизмы действия химически разных ингибиторов ФС II (мочевина, пиридазины, фенилкарбаматы, триазины, гидросихинолины, гидросибензонитрилы и динитрофенолы) на фотосинтетический перенос электронов и в целом на фотохимию ФС II на

основе данных полученных методом ТЛ; классификация ингибиторов ФС II на основе термодинамических параметров, рассчитанных по результатам исследований термолюминесценции хлоропластов, в присутствии ингибиторов, приводятся в обзоре [58]. Показано, что связывание ингибиторов ФС II влияет на редокс потенциал (E_m) пары Q_A/Q_A^- ФС II. Фенольные ингибиторы снижают E_m примерно на 45 мВ, в то время как диурон повышает E_m на 50 мВ. Эти сдвиги выявляются по изменению температуры пиков полос ТЛ, возникающих в результате рекомбинации зарядов в ион-радикальных парах с участием Q_A^- [59]. Полученные данные позволяют объяснить увеличение чувствительности ФС II к свету при действии фенольных гербицидов и снижение фотоповреждения после обработки диуроном. Предполагается, что продукт рекомбинации зарядов пары [$P_{680}^+ Q_A^-$] определяется величиной свободной энергии между радикальными парами [$P_{680}^+ Q_A^-$] и [$P_{680}^+ Pheo^-$]. Когда этот зазор невелик (то есть, когда $E_m Q_A/Q_A^-$ снижается), предпочтительна истинная обратная реакция, при которой образуется [$P_{680}^+ Pheo^-$], состояние, которое распадается с образованием значительного выхода триплета P_{680} . Это триплетное состояние хлорофилла реагирует с кислородом, образуя синглетный кислород, ответственный за фотоповреждения ФС II. Когда величина свободной энергии увеличивается (при возрастании $E_m Q_A/Q_A^-$), выход [$P_{680}^+ Pheo^-$] уменьшается, и большая часть радикальной пары [$P_{680}^+ Q_A^-$] распадается альтернативным менее разрушительным для ФС II способом [59]. Подробно исследованы эффекты 2,4,6-тринитрофенола (ТНР) и других фенольных ингибиторов, бромоксила и диносеба, на энергетику ФС II [60]. В интактной ФС II фенольные ингибиторы связываются только с 90–95% сайтов Q_B даже при насыщающих концентрациях. В оставшихся РЦ ФС II (5–10%) изменяется перенос электронов от Q_A к Q_B , но при этом сохраняется уязвимость к ингибиторам класса мочевины/триазина. Связывание фенольных ингибиторов с Q_B -сайтом было в 30–300 раз медленнее, чем у ингибиторов класса мочевины/триазин (диурона и атразина) [60]. В первом типе РЦ состоянии $S_2 Q_A$ было в 10 раз менее стабильным в присутствии фенольных ингибиторов, по сравнению с ингибиторами класса мочевины/триазин. Аффинность связывания фенольных гербицидов снижалась в 10 раз в состоянии $S_2 Q_A$ по сравнению с состоянием $S_1 Q_A$. Удаление КВК с внешними белками промывкой НА устраняет медленную кинетику связывания, а также дестабилизирующие эффекты на $S_2 Q_A$ состояние [60].

Предложена модель, согласно которой редокс потенциал Q_A снижается за счет краткосрочных конформационных изменений, вызванных связыванием фенольного ингибитора в Q_B -нише. Обработка НА устраняет это взаимодействие, возможно, обеспечивая большую гибкость в Q_B -сайте [60]. Выявлен новый участок преимущественного связывания диурона, диносеба, ТФБ и ADRY-агентов с новым хинон-связывающим сайтом Q_C и показано, что результатом такого связывания является сдвиг среднеточечного потенциала E_m высокопотенциальной формы цитохрома b_{559} в сторону отрицательных величин в результате окисления гемовой группы цитохрома этими агентами [61]. Представлены данные об эффектах кратковременной обработки клеток зеленой водоросли *Chlorella kessleri* и цианобактерии *Synechocystis salina*, имеющих разную организацию ФС II, ингибиторами семейства фенилмочевин (диурон, изопротурон) и фенольного типа (иоксинил), исследованных методом РАМ-флуориметрии F хлорофилла ФС II и по скорости фотосинтетического выделения кислорода с помощью электродов типа Кларка и типа Жолио [62]. По эффективности ингибирования агенты были расположены в следующем порядке диурон > > изопротурон > иоксинил. Предполагается, что исследованные ингибиторы влияют не только на акцепторную, но и на донорную сторону ФС II, модифицируя Mn-кластер КВК, и что одной из причин разного ингибирования ФС II этими агентами является их влияние в разной степени на кинетические параметры реакций, связанных с выделением кислорода (начальное распределение состояний S_0-S_1 , количество заблокированных центров S_B , время оборота состояний S_i , промахов и двойных попаданий). Обсуждается связь между ингибированием гербицидом и изменением кинетических параметров [62]. Показано, что причиной гибели растения, обработанного ингибиторами ФС II, являются повреждения, вызванные развитием окислительного стресса на свету в результате образования синглетного кислорода в РЦ ФС II. Подробно рассмотрены механизмы развития окислительного стресса при действии на ФС II ингибиторов, относящихся к разным семействам (производные мочевины и триазина и фенольные ингибиторы ФС II) [63]. Методом спиновой ловушки показано фотоиндуцированное образование АФК в ФС II, обработанной ингибитором [64]. Установлено, что в отличие от гидроксильного радикала и супероксидного анион радикала, фотогенерация которых происходила независимо от ингибитора, генерация синглетного кислорода в присутствии ингибиторов была выше, чем без них, причем в случае фенольных ингибиторов в два раза больше, чем с ингибитором на основе мочевины [64]. Это коррелирует с

данными о влиянии этих ингибиторов на редокс свойства семихинона Q_A^- и согласуется с гипотезой о том, что синглетный кислород образуется в реакциях рекомбинации заряда, которые стимулируются связыванием ингибитора и модулируются его природой. В случае, когда с ФС II связаны фенольные ингибиторы, рекомбинация заряда на уровне первичной ион-радикальной пары [$P_{680}^+ \text{Pheo}^-$] термодинамически благоприятствует образованию триплета хлорофилла и, следовательно, синглетному кислороду. В случае ингибиторов на основе мочевины этот путь менее благоприятен [64]. В результате исследования разностных спектров Фурье-спектроскопии (FTIR – Fourier-transform infrared spectroscopy) при фотовосстановлении предварительно окисленного негемового железа (разница Fe2p/Fe3p) на мембранах ФС II в присутствии бромоксирила или иоксинила получены данные о структуре, взаимодействии и расположении фенольных ингибиторов в Q_B -сайте, которые помогли прояснить молекулярный механизм сдвигов редокс потенциала Q_A в присутствии этих агентов [65]. Расчеты взаимодействия ингибиторов с Q_B -сайтом, произведенные на основе полученных данных, подтвердили связывание депротонированного бромоксирила с D1-His215, тогда как протонированная форма бромоксирила и диурон связывались с противоположной стороной Q_B -кармана без взаимодействия с D1-His215. На основании этих результатов предполагается, что сильная водородная связь фенолятной СО-группы с D1-His215 вызывает изменение прочности водородной связи Q_A -СО-группы через мостик Q_A -His-Fe-His-фенолят, вызывая соответствующий сдвиг редокс потенциала Q_A [65].

ADRY-АГЕНТЫ

Ранее были описаны соединения, дестабилизирующие S_2 и S_3 состояния КВК (ANT-2p, ANT-2s, TPB и FCCP) [52, 66, 67], которые были обозначены как ADRY-агенты (Acceleration of the Deactivation Reactions of the water splitting system Y). ANT-2p считается наиболее эффективным среди ADRY-агентов [52]. Внесение только одной молекулы ANT-2p на 40 реакционных центров ФС II оказывается достаточным, чтобы вызвать значительное ускорение спада всех 5-ти состояний. ADRY-агенты действуют как очень подвижные катализаторы внутри тилакоидной мембраны, реагируя с водоокисляющей ферментной системой независимо от ее окислительно-восстановительного состояния и образуя с ней переходный комплекс. Предполагается, что происходит быстрый обмен молекулы ADRY-агента между связывающими участками. Многочисленные вычисления и эксперименты по измерению ТЛ [68] свидетельствуют о

высоком сродстве ADRY-агентов к водоокисляющей ферментной системе, с константой диссоциации порядка 0.01 мкМ. В хлоропластах с неповрежденным КВК компонент, D_1^+ окисленный хлорофиллом P_{680}^+ , ревосстанавливается электронами от КВК менее, чем за 1 мс, так что ADRY-агенты практически не могут предотвратить образование S_2 и S_3 состояний, не успевая конкурировать с ними за восстановление D_1^+ . Поэтому считается, что S_2 и S_3 состояния атакуются непосредственно ADRY-агентами. В обработанных трисом хлоропластах D_1^+ сохраняется в окисленном состоянии, и в этом случае индуцированный ADRY-агентами восстанавливающий эффект на донорной стороне направлен уже на D_1^+ , скорее всего, посредством еще не установленного эндогенного донора электронов [69]. В нормальных хлоропластах, в которых спад S_2 и S_3 состояний, индуцированный ADRY-агентами, происходит через одноэлектронный переход, D_1^+ мог бы участвовать в индуцированном ADRY-агентами восстановлении S_2 и S_3 состояний, действуя как интермедиат в переносе электрона [66, 67]. ADRY-агенты не влияют на свойства $S_0 \rightarrow S_1$ перехода [69]. Показано, что все ADRY-агенты – разобшители, которые имеют кислую NH или OH группу с рК между 5.5 и 6.0 [70], ковалентно связанные с ароматической системой электронов. После замещения протона в вышеназванных группах эти вещества полностью теряют их ADRY-активность [66]. Высокие концентрации (>10 мкМ) СССР, типичного разобшителя фосфорилирования, ингибируют реакцию Хилла в изолированных хлоропластах [71]. Это ингибирование стимулируется светом [72] и сопровождается обесцвечиванием каротиноидов [73], которое может предотвращаться восстанавливающими агентами и диуроном [73]. СССР в этих же концентрациях понижает выход флуоресценции хлорофилла ФС II [72]. Ингибирование, индуцированное СССР, отличается от ингибирования аминами тем, что ни один из известных доноров электрона не способен восстановить транспорт электронов в ФС II, ингибированной СССР [71, 74], или повысить подавленную СССР флуоресценцию хлорофилла [72, 74]. Добавление диурана или дитионита все же увеличивает выход флуоресценции хлорофилла, но этот стимулирующий эффект быстро исчезает, если концентрация СССР превышает 0.1 мМ. При этом не происходит освобождения Mn [74], поэтому было высказано предположение, что СССР действует непосредственно на первичный донор электрона ФС II [72] или в непосредственной близости к нему [74]. Тетрафенилборон обладает всеми эффектами СССР, и его ингибирующее действие связано со

способностью восстанавливать некий окисленный донор электрона в ФС II [75]. Низкие концентрации СССР значительно укорачивают время жизни интермедиатов КВК. Аминотиофены обладают подобным эффектом [76]. ADRY-соединения индуцируют образование цикла внутри ЭТЦ ФС II, в котором некий донор электрона (отличный от Q_A) восстанавливает S_2 и S_3 состояния [67]. В присутствии СССР выход O_2 на вспышку уменьшается, если темновой интервал между вспышками увеличивается [77]. ADRY-агенты полностью ингибируют замедленную люминесценцию (по крайней мере, в диапазоне >50 мс) [78]. ЭПП сигнал II спадает на 50–60% в течение 12 ч в темноте *in vivo* и за 1 час *in vitro*. Спад этого сигнала значительно ускоряется в присутствии СССР или NH_2OH [79]. ANT-2p, TPB и FCCP (подобно липофильным анионам) стимулируют фотообразование катиона каротиноида [53], возможно, понижая величину среднеточечного редокс потенциала, (E_M) каротиноидов и позволяя, таким образом, P_{680}^+ стать эффективным окислителем. TPB, FCCP, СССР и TMPD окисляют цитохром b_{559} (вызывают превращение цитохрома b_{559} из высокопотенциальной в низкопотенциальную форму после их окисления вторичным донором электрона ФС II– Y_Z^+ или катион-радикалом Car^+ [80, 81]. Многие свойства FCCP и других разобшителей пытаются объяснить их способностью образовывать липофильные анионы [53, 82]. В то же время способность стимулировать фотообразование катиона каротиноида не зависит ни от pH, ни от рК (для FCCP рК = 5.9) исследованных ADRY-агентов [51]. Способность выступать в качестве окислительно-восстановительного катализатора при взаимодействии с компонентами ФС II была проанализирована на основе данных об электрохимических свойствах ANT-2p и некоторых его структурных аналогов (ANT-2a и ANT-2f) [83]. При проведении циклической вольтамперометрии в водных средах на платиновом электроде ANT-2p и его аналога ANT-2a в каждом случае был выявлен отчетливо выраженный пик окисления в диапазоне потенциалов от +0.9 до +1.0 В. Отсутствие пика при развертке потенциала в восстановительную сторону показало, что образовавшийся продукт окисления этих агентов не способен обратно восстанавливаться. Однако в случае ANT-2f (аналога, не обладающего ADRY-активностью даже при соотношении 50 молекул на ФС II) имелись четко выраженные пики восстановления продукта окисления этого агента [83]. Полученная величина потенциала окисления ANT-2p (1.0 В) показывала, что в ФС II ANT-2p может быть окислен только первичным донором электрона, хлорофиллом P_{680} . На основе полученных данных был сделан вывод о том, что ADRY-эффект ANT-2p, обуслов-

ленный обратимой окислительно-восстановительной реакцией, представляется маловероятным [83]. Показано, что ни ANT-2p, ни о-фенантролин, ни диурон не способны подавлять фотохимическую активность изолированных D1/D2/цит. b_{559} реакционных центров ФС II [84]. Ни один из этих указанных выше агентов не ингибировал фотоиндуцированный перенос электрона от экзогенного донора электрона дифенилкарбазида к экзогенному акцептору электрона силикомолибдату независимо от того, добавлялись указанные агенты до или после добавления силикомолибдата [84]. Показано, что в хлоропластах Ant-2p по-разному действует на разные популяции высокопотенциальной формы цитохрома b_{559} (cyt b_{559} HP) [85]. В присутствии Ant-2p, начиная с 1 мкМ и выше, примерно половина cyt b_{559} подвергается автоокислению в темноте. Эта фракция cyt b_{559} HP подвергается быстрому фотовосстановлению с последующим повторным окислением в темноте. Фотовосстановление может ингибироваться диуроном, но не DBMIB, что предполагает участие в этой реакции Q_A или пула пластохинонов. Другая фракция cyt b_{559} HP подвергается медленному необратимому фотоокислению в присутствии более низких концентраций Ant 2p [85]. Получены экспериментальные данные об электрохимических свойствах ADRY-агента, (2-(3-хлор-4-трифторметил)-анилин-3,5-динитрофенола) – ANT-2p [86]. Выяснено, что в апротонных растворителях ANT-2p необратимо окислялся при потенциале 1.35 В и необратимо восстанавливался при потенциале –0.03 В. Методом циклической вольтамперометрии определены потенциалы продуктов окисления и восстановления, они составили 0.45 и 0.27 В соответственно [86]. Высказано предположение от том, что наиболее вероятным механизмом взаимодействия ANT-2p с компонентами ФС II может быть первичное восстановление этого агента на акцепторной части ФС II, окисление его образовавшейся восстановленной формы любым окисленным компонентом донорной стороны ФС II и последующая регенерация окисленной формы на акцепторной стороне этой фотосистемы [86]. Возможен был и другой путь (окислительный), когда первичным актом было бы окисление на акцепторной стороне ФС II. Однако авторы публикации считают его менее вероятным с энергетической точки зрения [86]. Показано, что карбонилцианид м-хлорфенилгидразон (СССР) в хлоропластах ингибировал реакцию Хилла с феррицианидом (Fe_3Cu) в качестве экзогенного акцептора электрона и сопряженное с этой реакцией фотосинтетическое выделение кислорода изолированными хлоропластами [87] и подавлял фотосинтетическое выделение кислорода, сопряженное с фотовосстановлением силикомолибдата (SiMo) [87], но лишь незначительно

уменьшал фотовосстановление SiMo. Аналогичные результаты были получены и для другого ADRY-агента, ANT2p [87]. Ингибирование указанных фотореакций было максимальным при значениях pH, соответствующих рК СССР (5.95). СССР не ингибировал перенос электрона от восстановленного TMPD или дурухинола к метилвиологену, т. е. с участием только ФС I [87]. СССР не влиял на наносекундную флуоресценцию хлорофилла в хлоропластах, инкубированных при низкой интенсивности света, но приводил к ее уменьшению при высокой интенсивности света. Эффективность ингибирующего действия СССР на фотовосстановление $FeCu$ зависит от скорости потока электронов, которая контролируется интенсивностью света [87]. Методом циклической вольтамперометрии СССР в водном буфере выявлен хорошо разрешаемый пик окисления с соответствующим окислительно-восстановительным потенциалом равным +1.17 В. Последующая восстановительная развертка вольтамперограммы показала пик восстановления с окислительно-восстановительным потенциалом равным +0.34 В [87]. Сделано заключение, что СССР окисляется на донорной стороне ФС II с последующим восстановлением на акцепторной стороне электронами от мембранного пула пластохинона, конкурируя за электроны с Fe_3Cu и комплексом цитохрома b/f и образуя, таким образом, циклическую цепь переноса электронов вокруг ФС II. Предполагается, что исследованные агенты служат донорами протонов, а не просто донорами электронов на окисляющей стороне ФС II [87]. Получены данные о влиянии СССР на ФС II в тилакоидах методом регистрации полифазных кинетик индукции быстрой флуоресценции хлорофилла ФСII (OJР-тест) [88]. Показано, что в отсутствие других добавок СССР в малых концентрациях увеличивал величину выхода F хлорофилла на J-этапе, выход F на P-этапе оставался неизменным. При постепенном повышении концентрации СССР выход флуоресценции на J-шаге продолжал постепенно увеличиваться, а выход F на P-шаге начинал постепенно уменьшаться. Кроме того, уже при этих концентрациях СССР подобно диурону начинал проявляться эффект постепенного увеличения уровня F на шаге O (F_0), наиболее выраженным это увеличение становилось при более высоких концентрациях СССР (60 мкМ и особенно 290 мкМ) [88]. В высокой концентрации СССР вызывал ярко выраженное снижение F на шаге P. Возможные детали действия СССР на ФС II в тилакоидах на полифазную кинетику индукции быстрой флуоресценции хлорофилла ФС II на этапе от J к P были исследованы в присутствии окисленной формы TMPD (TMPD-ox – агент, увеличивающий мембранный пул окисленного пластохинона за счет окисления пластохинола) в условиях, инициирующих фотоинду-

цированное проявление отчетливого I-пика в ОJР-кинетике [88]. Показано, что в присутствии TMPD, СССР при постепенном повышении концентрации, начиная с малых концентраций, также постепенно увеличивал выход F хлорофилла на J-этапе и уровень O (F_0) и приводил к постепенному снижению выхода F на P-этапе. Зависимое от концентрации СССР возрастание выхода F на J-этапе происходило до достижения максимума равного F на I-этапе, тогда как величина F на этапе P продолжала уменьшаться [88]. Ускоренное возрастание F на J-этапе, вызванное СССР, вероятно, можно объяснить подавлением нефотохимического тушения F Хл ($S_2 + S_3$)-состояниями кислород-выделяющего комплекса и окисленного P_{680} , первичного донора электрона ФС II [88].

ПРОИЗВОДНЫЕ ПФИПДНБ

Недавно была разработана и синтезирована группа новых химических агентов, производных ПФИПДНБ, как ожидалось, возможных потенциальных ингибиторов фотосинтетической активности. Был проведен первичный скрининг, отобраны агенты, действовавшие с разной степенью эффективности на фотосинтетическую активность тилакоидов, и подробно исследовано их действие на функциональную активность фотосинтетического аппарата [6, 9–16]. Далее будет использовано также обозначение К15 – одного из самых эффективных соединений (4-[метоксибис(трифторметил)метил]-2,6 динитрофенилгидразон метил кетона), чье действие на исследованные реакции характерно практически для всей группы исследованных агентов. Было показано, что производные ПФИПДНБ подавляли индуцированное светом выделение O_2 и восстановление НАДФ⁺ хлоропластами, нарушая транспорт электронов от воды к НАДФ⁺, но не влияли на фотовосстановление НАДФ⁺ в условиях, когда в эту реакцию была вовлечена только ФС I. Эти данные, тот факт, что производные ПФИПДНБ подавляли также индуцированные светом ΔF ФС II у хлоропластов и у субхлоропластных препаратов ФС II, а также совпадение зависимостей этих эффектов от концентрации К15 указывало на то, что место действия данных соединений находится на уровне ФС II.

Было показано, что уже в концентрации 10–15 нМ К15 вызывал снижение уровня F_M за счет уменьшения величины ΔF на 15%. В концентрации 80–360 нМ К15 еще больше снижал фотоиндуцированные ΔF вплоть до 90%. Величина I_{50} , концентрация ингибитора, вызывающая 50%-е подавление ΔF , для К15 равнялась 70 нМ [9]. Ингибирующее действие на ΔF полностью сохранялось при длительном (>5 мин) освещении акти-

ничным светом даже при использовании очень малых концентраций ингибитора. Этот факт, а также отсутствие ускорения темновой релаксации ΔF , связанной с фотовосстановлением Q_A , свидетельствовали о том, что подавление ΔF и понижение общего уровня F, вероятно, не являлось следствием акцептирования электронов агентом К15 от Q_A^- [9]. С другой стороны, ΔF ФС II, подавленные агентом К15, не реактивировались последующим добавлением экзогенных доноров электрона ФС II независимо от последовательности внесения реагентов [9]. Известно, что понижение F_M за счет подавления ΔF наблюдалось в результате полного удаления эндогенного Mn при инактивации донорного участка ФС II. Однако при этом, в отличие от К15, добавление экзогенных доноров электрона ФС II восстанавливало ΔF практически до исходного значения, как это неоднократно отмечалось и ранее [3]. Было предположено, что подавление фотоиндуцированных ΔF ФС II агентом К15, вероятно, не связано с блокированием переноса электронов на донорной стороне ФС II [9].

В отличие от диурана, К15 не блокировал перенос электрона на акцепторной стороне ФС II, т. к. не приводил ни к увеличению уровня F_0 ни к замедлению темнового спада ΔF [9]. Кроме того, К15 (в отличие от диурана) не приводил к прерыванию взаимодействия ФС II и ФС I через цепь переноса электронов, измеряемого по уменьшению F ФС II вследствие окисления Q_A при дополнительном возбуждении ФС I в хлоропластах.

Ингибирующие эффекты К15 на ΔF ФС II полностью устранялись в присутствии дитионита (>0.8 мг/мл). Флуоресценция поднималась до максимального уровня. Включение актиничного света приводило к тому, что F уменьшалась, приводя к отрицательным значениям ΔF , отражающим восстановление Pheo. Полосы поглощения К15 при 200–500 нм с максимумом при 420 нм исчезали, свидетельствуя о темновом восстановлении К15 дитионитом [9].

Ранее [4] было показано, что индуцированное светом восстановление Pheo до Pheo⁻ в ФС II возможно в анаэробных условиях. В этом случае F также достигала уровня F_M вследствие фотовосстановления Q_A до Q_A^- слабым измерительным светом, а при освещении актиничным светом наблюдалось уменьшение флуоресценции ($-\Delta F$) и изменения поглощения (ΔA), связанные с обратимым восстановлением Pheo. Внесение 30–40 нМ К15 приводило к резкому (более, чем в 15–20 раз) ускорению темновой релаксации соответствующих ΔA и $-\Delta F$, указывая на возрастание скорости темнового окисления Pheo⁻ [9].

В больших концентрациях агент К15 вызывал значительное уменьшение фотоиндуцированных

$-\Delta F$ и ΔA , а также уменьшение уровня F_M . При этом освещение актиничным светом не вызывало увеличения F , связанного с фотовосстановлением Q_A . Однако при использовании вместо К15 известных акцепторов электрона ФС II, вызывающих темновое окисление Q_A , подобное уменьшение F в анаэробных условиях сопровождалось появлением фотоиндуцированного увеличения F . Диурон в концентрации до 50–100 мкМ не изменял ни кинетику, ни величину ΔA и $-\Delta F$, связанных с фотовосстановлением Pheo, ни величину F_M в анаэробных условиях [9].

В дополнительных экспериментах было показано, что К15 в концентрации до 100 мкМ не уменьшает F хлорофилла светособирающих пигмент-белковых комплексов, а также раствора хлорофилла в 1% тритоне X-100. Резкое ускорение темновой релаксации спектральных эффектов, отражающих светоиндуцированное восстановление Pheo в результате реакции $[P_{680}Pheo]Q_A^- \rightarrow [P_{680}Pheo^-]Q_A^-$, и, как следствие этого, уменьшение величины этих эффектов свидетельствовали в пользу того, что в присутствии К15 значительно сокращается время нахождения Pheo в восстановленном состоянии ввиду его быстрого реокисления. Тогда уменьшение величины положительных ΔF в аэробных условиях и понижение уровня F_M в анаэробных условиях могло быть интерпретировано как результат ускорения распада пары $[P_{680}^+Pheo^-]$, индуцированного соединениями К15 вследствие окисления Pheo⁻ [9].

Можно было бы предположить, что действие К15 на окислительно-восстановительное состояние Pheo было обусловлено не прямым его участием в акцептировании электрона от Pheo⁻, а, например, вследствие увеличения доступа кислорода к Pheo⁻. Однако сохранение характерной эффективности ингибирующего действия К15 и в анаэробных условиях свидетельствовало против этого предположения [9].

В то же время ингибирующее действие соединений К15 нельзя было объяснить только акцептированием электронов от Pheo⁻. Ведь в таком случае должен был бы наблюдаться эффект истощения ингибирующего действия К15 при длительном освещении вследствие накопления ингибиторов в восстановленном состоянии, чего в действительности не происходило [9].

Ранее было показано, что скорость фотоиндуцированных ΔF , отражающих обратимое фотовосстановление Pheo, в восстановительных условиях (в присутствии дитионита) на препаратах ФС II, лишенных Mn, возрастает в 1.5–2 раза при добавлении экзогенного донора электрона, Mn^{2+} [3]. Подобный эффект наблюдался также в присутствии К15 [9]. Скорость темнового окисле-

ния Pheo⁻ при этом не изменялась. Ускорение реакции фотовосстановления Pheo при добавлении К15 в присутствии дитионита указывало на способность восстановленной дитионитом формы К15 донировать электроны на компоненты РЦ ФС II.

Добавление К15 приводило к уменьшению величины фотоиндуцированных ΔA при 678 нм, связанных с фотоокислением первичного донора электрона P_{680} , в препаратах ДТ20, лишенных Mn, в присутствии феррицианида калия и молибдата кремния. Подобное уменьшение величины ΔA при 678 нм наблюдалось также и ранее при добавлении к таким препаратам Mn^{2+} (0.1–3 мкМ), приводящим к реактивации донирования электрона на РЦ ФС II [9]. Агент К15 подавлял также ΔA при 820 нм, связанные с фотоокислением P_{680} при измерении этой фотореакции с микросекундным временным разрешением как в присутствии, так и в отсутствие феррицианида калия и молибдата кремния. Кроме того, производные ПФИПДНБ подавляли также фотоиндуцированный ЭПР-сигнал II, связанный с фотоокислением вторичного донора электрона Z.

Было показано, что производные ПФИПДНБ (К15) ингибировали перенос электрона в изолированных комплексах D1/D2, цит. b_{559} РЦ ФС II, измеренный по фотохимическому восстановлению молибдата кремния в присутствии дифенилкарбазида и фотоокислению хлорофилла P_{680} с эффективностью, сравнимой с таковой для субхлоропластных препаратов, обогащенных ФС II [12].

Производные ПФИПДНБ вызывали резкое падение квантового выхода и уменьшение длительности медленной (наносекундной) компоненты кинетики затухания F . Длительность и амплитуда быстрой (300 пс) компоненты F практически не изменялась. В присутствии дитионита ПФИПДНБ не влияли на ФС II, при этом длительность и относительный вклад квантового выхода медленной компоненты F принимали свои исходные значения, а кинетика затухания полностью, совпадала с контрольной [6]. Эти данные указывали на увеличение скорости распада первичной ион-радикальной пары $[P_{680}^+Pheo^-]$ за счет взаимодействия ПФИПДНБ с компонентами РЦ ФС II [6].

Совпадение концентрационных зависимостей ингибирующего действия ПФИПДНБ для всех рассмотренных выше фотореакций, а именно: 1) фотоиндуцированных ΔF , связанных с фотоиндуцированным восстановлением Q_A , 2) величины F_M в анаэробных и в аэробных условиях, 3) фотоиндуцированных $-\Delta F$ и ΔA при 685 нм, связанных с фотоиндуцированным восстановлением Pheo, а также 4) фотоиндуцированных ΔA при 678 нм, связанных с фотоокислением хлорофилла

P_{680} , свидетельствовало об единой природе их ингибирования [9]. Предполагалось, что ПФИПДНБ, принимая электрон от P_{heo}^- и передавая его на Y_Z^+ (или непосредственно на P_{680}^+), замыкали перенос электрона в ФС II. Не исключалось, что производные ПФИПДНБ, попадая в РЦ ФС II, выполняли роль, подобную Q_A , или даже замещали Q_A . Было показано, что окислительно-восстановительный потенциал ПФИПДНБ лежит в области -400 мВ. Вследствие этого, принимая электрон от P_{heo}^- , производные ПФИПДНБ, (в отличие от Q_A , имеющего потенциал около -0.130 мВ), не способны задерживать его на достаточно длительное время, и он вновь возвращается на P_{680}^+ или на Y_Z^+ , что и приводило к нарушению базального переноса электрона в ФС II [9].

Было показано, что величина I_{50} для подавления реакций ФС II в случае наиболее активных ПФИПДНБ составляет от 50 нМ до 0.1 мкМ, что соответствует примерно одной молекуле ингибитора на РЦ ФС II. У менее активных соединений она достигала значения 1 мМ, т. е. более 1000 молекул на РЦ ФС II [10]. В результате исследований зависимости ингибирующей эффективности в ряду ПФИПДНБ от некоторых физико-химических свойств молекулы ингибитора было показано, что более высокая (в ~ 100 раз) ингибирующая активность в ряду исследованных ПФИПДНБ у соединений, имеющих две нитрогруппы (NO_2) в структуре молекулы по сравнению с соединениями с одной нитрогруппой [10]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что в окислительно-восстановительные превращения, ответственные за процесс подавления электронного транспорта в ФС II, вовлечены, вероятно, нитрогруппы бензола. Была выявлена положительная зависимость между повышением ингибирующей эффективности и увеличением степени гидрофобности молекулы исследованных ПФИПДНБ, а, следовательно, степени доступности молекулы ингибитора к участку ее связывания, находящемуся, судя по функциональным данным, на уровне промежуточного акцептора электрона ФС II феофитина, расположенного в гидрофобной области РЦ [10]. Для исследованных производных ПФИПДНБ был проведен поиск количественных соотношений структура-свойство — QSAR-анализ (Quantitative Structure-Activity Relationship). Были получены данные количественной зависимости эффективности ингибирования от структуры ингибитора, которые показали, что эффективность ингибирующего действия соединений типа K15, в основном, зависит от наличия второй нитрогруппы в составе молекулы и степени липофильности боковых заместителей [89]. Зависимость ингибирующей активности от степени гидрофобности для известных гербицидов (в том числе и фенольного класса) отмечалась и

ранее [8]. С другой стороны, заместители боковой цепи ингибитора, вероятно, влияют на степень пространственного соответствия между структурой молекулы ингибитора и конфигурацией связывающей ниши [10].

В водных растворах в присутствии детергента при pH 8.0 большая часть исследованных ПФИПДНБ принимает первый электрон при потенциалах от -0.28 до -0.41 В (нормальный водородный электрод). Восстановление не обратимо, зависимость потенциала восстановления от pH составляет 60 мВ/pH, что свидетельствует о протонировании восстановленных форм [11]. Наибольший интерес представляет поведение ингибиторов в неводных растворах, в апротонной среде, поскольку вследствие своей липофильности они способны встраиваться в гидрофобные области фотосинтетических мембран. Показано, что в безводном диметилформамиде большинство исследованных ПФИПДНБ способно к одноэлектронному обратимому восстановлению при потенциалах от -0.3 до -0.53 В [11]. Эти результаты позволяют обосновать предложенный выше механизм ингибирующего действия ПФИПДНБ, заключающийся в их окислительно-восстановительном взаимодействии с парой [$P_{680}^+P_{heo}^-$]. Значения редокс-потенциалов ингибиторов подтверждают их способность к перехвату электрона в реакционных центрах ФС II на уровне P_{heo}^- , а обратимость восстановления указывает на возможность быстрого возврата электрона от восстановленного ингибитора на подходящей акцептор, которым могут быть P_{680}^+ или Y_Z^+ . Показана зависимость ингибирующего действия от редокс-потенциала исследованных соединений [11].

В пользу достоверности предполагаемого механизма действия производных ПФИПДНБ свидетельствует также данные полученные в работе Аллаhverдиева с соавт. [13]. Было показано, что циклический транспорт электронов вокруг ФС II, образующийся при участии агента K15, эффективно защищает ФС II от фотоингибирующего повреждения как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Тушение максимального уровня флуоресценции и уменьшение изменений оптической плотности при 685 нм, связанные с фотовосстановлением феофитина, наблюдаемым при фотоингибирующем освещении необработанных или лишенных эндогенного Mn субмембранных фракций ФС II; фотодеградация цитохрома b_{559} и фотообесцвечивание β -каротина и хлорофилла-670 измеренные в препаратах, лишенных эндогенного MnФС II, значительно ослабляются в присутствии K15 [13].

Для идентификации ПФИПДНБ использовали их способность испускать характерную флуоресценцию при 440–450 нм при возбуждении на

длине волны 270 нм. Показано, что ПФИПДНБ прочно связываются с ФС II: только промыванием в присутствии детергента удается удалить K15 из препаратов ФС II. Это свидетельствует в пользу высокой аффинности связывания ПФИПДНБ в ФС II, которое имеет, вероятно, нековалентную природу [15].

Методом фотоаффинного мечения с использованием азидсодержащего аналога ПФИПДНБ (K15-N₃) показано, что в препаратах ФС II до и после удаления суммы водорастворимых белков ПФИПДНБ интенсивно метят одну белковую полосу в области 30–34 кДа (исходя из условий проведения ПААГ электрофореза, вероятно, D2-белок) и, в меньшей степени, полосу в области 65–55 кДа (гетеродимер D1- и D2-белков) [15].

В препаратах РЦ ФС II в присутствии 6 М мочевины удается отчетливо разделить полосы D1- и D2-белков. В этих препаратах фотоаффинно связанные ПФИПДНБ метят только полосы 30 кДа и 55 кДа. Учитывая данные об аномальном изменении электрофоретической подвижности гербицид-хинон-связывающего белка D1 в зависимости от концентрации мочевины в среде [90, 91], сделан вывод о том, что местом связывания исследованных ПФИПДНБ, вероятно, может быть D2-белок [15]. В пользу достоверности этого предположения свидетельствуют также данные о преимущественной защите белка D2 от фотодеструкции в изолированных комплексах D1/D2/цитохром *b*₅₅₉ с помощью K15 [14].

В результате исследований способности диурона “снимать” ингибирующее действие ПФИПДНБ путем регистрации тушения уровня F_M хлорофилла ФС II (связанного с восстановлением Q_A) в анаэробных условиях, в присутствии ПФИПДНБ (K15) было показано отсутствие конкуренции между ПФИПДНБ и диуроном за участок связывания с РЦ ФС II [16]. Этот факт подтверждает предположение о том, что местом связывания ПФИПДНБ служит, вероятно, белок D2, несущий на себе, как известно, акцептор Q_A . Полученные результаты отклоняются от принятой схемы связывания гербицидов с ФС II, но в то же время согласуются с результатами функциональных измерений, обосновывающими предполагаемый механизм ингибирующего действия ПФИПДНБ на ФС II [6, 9–16].

МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ

Исследовано действия новых химических соединений производных сульфида и их комплексов с ионами меди (Cu), никеля (Ni), хрома (Cr), кобальта (Co) и цинка (Zn) (30 соединений) на обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода и скорость фотосинтетического транспорта электрона осуществляемых ФС II [17]. Из них

одиннадцать агентов являются органическими основаниями, двадцать четыре – их органическими производными, а четырнадцать – их комплексами с некоторыми атомами металлов. Эти соединения исследованы на предмет выявления их действия на фотосинтетическую активность (ФС II), а также на карбоангидразную активность (КАА) ФС II и альфа карбоангидразы (КА) из эритроцитов быка. Среди этих агентов было выявлено несколько групп ингибиторов [17]. Некоторые из них оказались способны подавлять одну, две или все из исследованных активностей. Примером подавления всех исследованных активностей служит, медь(Cu(II))-содержащий комплекс производного фенилсульфонилгидрозола (соединение 25), который подавляет КАА альфа-КА на 88%, КА ФС II на 100% и ФС II на 66.2%. Агенты на основе Шиффова основания (соединения 12 и 15) и медь(Cu(II))-содержащие комплексы на основе фенилсульфонилгидрозола (соединения 25 и 26) значительно ингибируют КАА и ФС II [17]. Методами циклической вольтамперометрии, квадратно-волновой вольтамперометрии, хроноамперометрии, а также методом объемного электролиза также определен целый ряд электрохимических параметров (коэффициент диффузии, количество переносимых электронов, константа скорости гетерогенной реакции, наклон Котрелла, предельный ток на ультрамикрореле, потенциал пика E_{pc}) для всех 30 производных сульфида и их комплексов с ионами металла. Кроме того, определены значения констант кислотной диссоциации pK_a новых соединений в неводных и водных средах. Выявлена зависимость эффективности подавления указанных реакций ФС II от физико-химических свойств исследованных агентов [17].

Исследованы эффекты девятнадцати металл-органических комплексов, содержащих катионы сурьмы(III) на фотосинтетический перенос электрона и карбоангидразную активность ФС II, а также глутатионредуктазную активность хлоропластов и глутатион редуктазы из дрожжей (*S. cerevisiae*) [18]. Шесть из них были разработаны и синтезированы впервые, и их структуры были идентифицированы с использованием элементарного анализа, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ИК-Фурье, LCMS, магнитной восприимчивости и путем измерения проводимости. Для всех девятнадцати исследованных комплексов, содержащих катионы сурьмы(III), их наиболее устойчивые формы были определены методом DFT/B3LYP/LanL2DZ. Среди исследованных комплексов были выявлены агенты, эффективно подавляющие одну две, три или сразу все четыре из исследованных активностей [18].

Разработан, синтезирован, охарактеризован и исследован в качестве ингибиторов фотосинтетической и карбоангидразной активности ФС II,

α -карбоангидразы из эритроцитов быка, а также активности глутатионредуктазы из хлоропластов и классической глутатионредуктазы из дрожжей (*S. cerevisiae*) новый класс металлсодержащих органических комплексов на основе ионов меди Cu(II) [19]. Среди новых агентов выявлены Cu(II)-содержащие комплексы и лиганды, эффективно ингибирующие глутатионредуктазу, α -карбоангидразу, карбоангидразную и фотохимическую активность ФС II [19].

ИНГИБИТОРЫ КАРБОАНГИДРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФС II

Ранее были выявлены четыре источника карбоангидразной активности в субхлоропластных мембранных частицах, обогащенных ФС II – гидрофильные белки кислородвыделяющего комплекса ФС II с молекулярными массами 33 (белок PsbO), 24 (белок PsbP) и 18 кДа (белок PsbQ), а также источник КАА, остающийся связанным с пигмент-белковым комплексом ФС II после удаления трех гидрофильных белков с помощью солевой обработки [92].

Было показано, что истощение ФС II по $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, а также подавление карбоангидразной активности ФС II известным ингибитором α -карбоангидраз, ацетазоламидом (AZM), сопровождается снижением скорости переноса электронов на донорной стороне ФС II. Ингибирование, вызванное AZM, полностью устраняется HCO_3^- или известными искусственными донорами электрона (ферроцианидом калия и TMPD). Был сделан вывод о том, что для максимальной фотосинтетической активности ФС II необходимо ее карбоангидразная активность. Однако не исключено, что AZM мог иметь два независимых механизма действия на ФС II: специфический и неспецифический [93].

Чтобы исследовать специфическое влияние ингибирования карбоангидразной активности ФС II на ее фотосинтетическую активность, был использован другой известный ингибитор α -карбоангидраз, неисследованный ранее по его эффектам на карбоангидразную и фотосинтетическую активность ФС II, трифторметансульфонамид (TFMSA). Молекулярная структура TFMSA и его физико-химические свойства сильно отличаются от таковых AZM [94]. Впервые было показано, что TFMSA одновременно с подавлением карбоангидразной активности ФС II вызывает также снижение: 1) величины фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла ФС II и 2) скорости фотосинтетического выделения кислорода [94]. Добавление экзогенных доноров электрона ФС II или HCO_3^- приводило к исчезновению ингибирующего действия TFMSA на перенос электрона в ФС II, указывая на то, что

сайт ингибирования TFMSA расположен на донорной стороне ФС II [94].

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФС II

Имеются публикации, свидетельствующие о значимости ингибиторов ФС II как в качестве инструментов научного познания, так и для реального практического использования. Показано существенное увеличение фотоиндуцированной генерации молекулярного водорода клетками морской зеленой водоросли *Platymonas subcordiformis*, в присутствии разобщителя фотофосфорилирования, СССР [95]. Увеличение выхода H_2 за счет добавления СССР в основном связано с комбинацией нескольких механизмов. СССР, как ADRY-агент, ингибировал активность КВК ФС II, что привело к заметному снижению фотовыделения кислорода, и хотя окислительное дыхание митохондрий лишь слегка инактивировалось СССР, тем не менее эффективно достигался анаэробноз на стадии фотогенерации H_2 , предотвращающий инактивацию кислородом обратимой гидрогеназы в клетках. Разобщающий эффект СССР ускорял перенос электронов из воды, нарушал $\Delta p\text{H}$ через тилакоидную мембрану и, таким образом, увеличивал доступность электронов и протонов для гидрогеназы. Электроны для фотогенерации водорода в основном поставлялись в результате фотолиза воды (90%) [95].

Использование ингибиторов, искусственных акцепторов и доноров электронов в качестве экспериментальных инструментов для изучения фотосинтетического аппарата, а также их значение в историческом развитии представлений о свойствах, функциях и последовательности переносчиков электрона в электрон-транспортной цепи фотосинтеза подробно рассмотрено в обзоре Требста [96].

Представлен подробный обзор достижений и открытий в исследованиях биохимических путей и физиологических процессов растений, сделанных благодаря использованию разных ингибиторов фотосинтеза [97]. Высокое сродство ингибиторов к соответствующим сайтам-мишеням делает их полезными экспериментальными инструментами. В качестве лишь одного из примеров их значимости указывается работа, связанная с открытием сайта связывания ингибиторов, подавляющих ФС II, награжденная Нобелевской премией в 1988 году.

Показано, что ингибиторы могут быть использованы в промышленных масштабах для увеличения выработки определенных каротиноидов клетками зеленой водоросли *Dunaliella bardawil*, способными накапливать большое количество каротина в стрессовых условиях (диурон увеличивал биосинтез лютеина в 2 раза) [98].

Показано, что существует возможность увеличения эффективности производства молекулярного водорода от 3-х до 5-ти раз клетками одноклеточной галотолерантной цианобактерии *Aphanothece halophytica*, которая является потенциальным темновым ферментативным продуцентом, если обрабатывать клетки СССР и DCMU, комбинируя условия освещения или время инкубации в темноте [99]. Одним из основных факторов, ограничивающих фотогенерацию водорода, выступает кислород, ингибитор активности двунаправленной гидрогеназы в клетках *A. halophytica*. Кислород интенсивно выделяется как побочной продукт фотосинтетической активности ФС II на свету в результате расщепления молекул воды, но может поглощаться в результате дыхания. С помощью СССР и DCMU подавляли фотосинтетическое выделение кислорода, и таким образом достигали низких уровней кислорода. Кроме того, СССР усиливал частоту дыхания, еще больше снижая уровень кислорода [99].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная информация по химическим ингибиторам ФС II была получена в 70–80 гг. прошлого столетия. В эти годы существовала серьезная экономическая заинтересованность в разработке и исследованиях химических средств борьбы с сорняками (гербицидов). В эти годы было опубликовано большая часть информации о механизмах действия гербицидов, их участках связывания и основных эффектах на характерные реакции фотосистем и состояния интермедиатов электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Поэтому в обзоре так много ссылок на публикации тех лет. В последующем, в связи с развитием и расширением других технологий, в том числе использующих генетически модифицированные сорта экономически значимых растений, а также с существенным повышением внимания к проблеме экологии и загрязнения сельхозугодий химическим поллютантами, исследования, направленные на выявление, разработку новых химических гербицидов стали менее актуальными и, соответственно, это отразилось на количестве научных публикаций. Однако, поскольку основные эффекты были уже достаточно широко известны больше стало публикаций об использовании этих химических агентов в качестве инструментов научных исследований, а также в качестве средств управления определенными этапами фотосинтетического процесса для производства необходимых соединений, продуктов фотосинтеза. Примером такого управления может быть применение диурона и СССР для увеличения генераций молекулярного водорода клетками одноклеточной галотолерантной цианобактерии *Aphanothece halophytica* [99]. В тоже время в современных исследованиях про-

должает появляться новая информация об эффектах, механизмах и участках действия даже известных химических ингибиторов ФС II. Выявлен новый участок преимущественного связывания диурона, диносеба, ТФБ и ADRY-агентов с новым хинон-связывающим сайтом Q_C и показано, что результатом такого связывания является сдвиг среднего потенциала E_m высокопотенциальной формы цитохрома b_{559} в сторону отрицательных величин в результате окисления гемовой группы цитохрома этими агентами [61]. В обзоре невозможно рассмотреть все публикации вследствие обоснованных ограничений в объеме текста и использованных ссылок. Поэтому авторы приносят искренние извинения читателю за то, что, возможно, некоторые, эффекты химических ингибиторов ФС II или публикации по указанной теме оказались не представлены в обзоре.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50341.

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. *Hsu B.D., Lee J.Y., Pan R.L.* The two binding sites for DCMU in Photosystem II // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1986. V. 141. P. 682.
2. *Kamachi H., Tamura N., Inoue H.* Putative Second Binding Site of DCMU on the Oxidizing Side of Photosystem II in Photosystem II Membranes Depleted of Functional Mn // *Plant and Cell Physiol.* 1992. V. 33. P. 437.
3. *Klimov V.V., Shuvalov V.A., Heber U.* Photoreduction of pheophytin as a result of electron donation from the water-splitting system to Photosystem-II reaction centers // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 809. P. 345.
4. *Klimov V.V., Allakhverdiev S.I., Ladygin V.G.* Photoreduction of pheophytin in photosystem II of the whole cells of green algae and cyanobacteria // *Photosynth. Res.* 1986. V. 10. P. 355.
5. *Климов В.В., Аллаhverдиев С.И., Жармухамедов С.К.* Окислительно-восстановительное взаимодействие фенольного гербицида диносеба с парой [П(680(+))Фф(-)] в реакционном центре фотосистемы 2 растений // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. С. 770.
6. *Аллаhverдиев С.И., Жармухамедов С.К., Климов В.В., Васильев С.С., Корватовский Б.Н., Пащенко В.З.* Влияние диносеба и других фенольных соединений на кинетику затухания флуоресценции хлорофилла фотосистемы 2 высших растений // *Биологические мембраны.* 1989. Т. 6. С. 1147.
7. *Belatik A., Joly D., Hotchandani S., Carpentier R.* Re-evaluation of the side effects of cytochrome b6f inhibi-

- tor dibromothymoquinone on photosystem II excitation and electron transfer // *Photosynth. Res.* 2013. V. 117. P. 489.
8. *Tischer W., Strotmann H.* Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1977. V. 460. P. 113.
 9. *Климов В.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И., Колобанова Л.П., Баскаков Ю.А.* Новые фенольные ингибиторы переноса электрона в фотосистеме 2 растений // *Биологические мембраны.* 1992. Т. 9. С. 565.
 10. *Климов В.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И., Колобанова Л.П., Баскаков Ю.А.* Новая группа ингибиторов переноса электрона в фотосистеме 2 растений. I. Химическая структура и эффективность ингибирования // *Биологические мембраны.* 1993. Т. 10. С. 565.
 11. *Киселев Б.А., Супонева Е.Н., Жармухамедов С.К., Климов В.В., Колобанова Л.П., Баскаков Ю.А.* Новая группа ингибиторов переноса электрона в фотосистеме 2 растений. II. Окислительно-восстановительные свойства производных перфторизопротопидинитробензола и их связь с эффективностью ингибирования // *Биологические мембраны.* 1993. Т. 10. С. 571.
 12. *Klimov V.V., Zharmukhamedov S.K., De-Las-Rivas J., Barber J.* Effect of Photosystem II inhibitor K-15 on photochemical reactions of the isolated D1/D2 cytochrome b559 complex // *Photosynth. Res.* 1995. V. 44. P. 67.
 13. *Allakhverdiev S.I., Klimov V.V., Carpentier R.* Evidence for the involvement of cyclic electron transport in the protection of photosystem II against photoinhibition: influence of a new phenolic compound // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 4149.
 14. *Pobeguts O.V., Smolova T.N., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V.* Predominant Protection of D2-Protein against Photodestruction in Isolated D1/D2/Cytochrome b559 by K15, a Phenolic-Type Inhibitor of Electron Transfer in Photosystem 2 // *Biochemistry (Moscow).* 2004. V. 69. P. 612.
 15. *Zharmukhamedov S.K., Kristin M.S., Li S., Allakhverdiev S.I., Klimov V.V.* Binding of novel inhibitors of electron transfer in photosystem 2, derivatives of perfluoroisopropylidinitrobenzene, with polypeptide D2 of the reaction center // *Biochemistry (Moscow).* 2003. V. 68. P. 162.
 16. *Жармухамедов С.К., Климов В.В., Аллахвердиев С.И.* Отсутствие конкуренции за место связывания между диуроном и новыми ингибиторами переноса электрона в фотосистеме 2 – производными перфторизопротопидинитробензола // *Биохимия.* 1995. Т. 60. С. 962.
 17. *Karacan M.S., Zharmukhamedov S.K., Mamas S., Kupriyanova E.V., Shitov A.V., Klimov V.V., Ozbek N., Ozmen U., Gunduzalp A., Schmitt F.-J., Karacan N., Friedrich T., Los D.A., Carpentier R., Allakhverdiev S.I.* Screening of novel chemical compounds as possible inhibitors of carbonic anhydrase and photosynthetic activity of photosystem II // *J. Photochem. Photobiol., B.* 2014. V. 137. P. 156.
 18. *Karacan M.S., Rodionova M.V., Tunç T., Venedik K.B., Mamas S., Shitov A.V., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V., Karacan N., Allakhverdiev S.I.* Characterization of nineteen antimony(III) complexes as potent inhibitors of photosystem II, carbonic anhydrase, and glutathione reductase // *Photosynth. Res.* 2016. V. 130. P. 167.
 19. *Rodionova M.V., Zharmukhamedov S.K., Karacan M.S., Venedik K.B., Shitov A.V., Tunc T., Mamas S., Kreslavski V.D., Karacan N., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I.* Evaluation of new Cu(II) complexes as a novel class of inhibitors against plant carbonic anhydrase, glutathione reductase and photosynthetic activity in photosystem II // *Photosynth. Res.* 2017. V. 133. P. 139.
 20. *Izawa S., Good N.E.* Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation // *Methods in Enzymol.* 1972. V. 24. P. 355.
 21. *Velthuys B.R., Amesz J.* Charge accumulation at the reducing side of system II of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1974. V. 333. P. 85.
 22. *Van Assche C.J., Carles P.M.* Photosystem II inhibitors chemicals: Molecular interaction between inhibitors and a common target // *Biological responses induced by herbicides* / Eds. Moreland D.E., St. John J.B., Hess. F.D. Washington, USA: American Chemical Society, 1982. V. 181. P. 1.
 23. *Wright C.A.* Oxidation-Reduction Physical Chemistry of the Acceptor Quinone Complex in Bacterial Photosynthetic Reaction Centers: Evidence for a New Model of Herbicide Activity // *Israel Journal of Chemistry.* 1981. V. 21. P. 348.
 24. *Velthuys B.R.* Electron-dependent completion between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II // *FEBS Lett.* 1981. V. 126. P. 277.
 25. *Vermaas W.F.J., Renger G., Arntzen C.J.* Herbicide/Quinone Binding Interactions in Photosystem II // *Z. Naturforsch.* 1984. V. 39c. P. 368.
 26. *Vermaas W.F.J., Dohnt G., Renger G.* Binding and release kinetics of inhibitors of Q_A^- oxidation in thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1984. V. 765. P. 74.
 27. *Robinson H.H., Cofis A.R.* Kinetics of the oxidation-reduction reactions of the photosystem II quinone acceptor complex, and the pathway for deactivation // *FEBS Lett.* 1983. V. 153. P. 221.
 28. *Urbach W., Laasch H., Schreiber U.* Redox-State Dependent Changes of Inhibitor-Binding to the Photosystem II Acceptor Complex // *Z. Naturforsch.* 1984. V. 39c. P. 397.
 29. *Crofts A.R., Wright C.A.* The electrochemical domain of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 726. P. 149.
 30. *Laasch H., Pfister K., Urbach W.* High- and low-affinity binding of photosystem II herbicides to isolated thylakoid membranes and intact algal cells // *Z. Naturforsch.* 1982. V. 37. P. 620.
 31. *Jursinic P., Stemler A.* Changes in [14C] Atrazine Binding Associated with the Oxidation-Reduction State of the Secondary Quinone Acceptor of Photosystem II // *Plant Physiol.* 1983. V. 73. P. 703.
 32. *Vermaas W.F.J., Arntzen C.J.* Synthetic quinones influencing herbicide binding and Photosystem II electron transport; the effect of atrazine resistance on quinone-

- binding properties in thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 725. P. 483.
33. *Oettmeier W., Masson K., Soil H.-J., Draber W.* Herbicide Binding at Photosystem II: A New Azido-triazinone Photoaffinity Label // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1984. V. 767. P. 590.
 34. *Ort D.R., Ahrens W.H., Martin B., Stoller E.W.* Comparison of Photosynthetic Performance in Triazine-Resistant and Susceptible Biotypes of *Amaranthushybridus* // *Plant Physiol.* 1983. V. 72. P. 925.
 35. *Васильев И.Р., Ли Д.И., Маторин Д.Н., Венедиктов П.С.* Множественность мест действия гербицидов, ингибирующих фотосистему 2 зеленых растений // *Физиология растений.* 1988. Т. 35. С. 694.
 36. *Purcell M., Leroux G.D., Carpentier R.* Atrazine action on the donor side of photosystem II in triazine-resistant and -susceptible weed biotypes // *Pestic. Biochem. Physiol.* 1990. V. 37. P. 83.
 37. *Carpentier R., Fuerst P.E., Nakatani H.Y., Arntzen C.J.* A second site for herbicide action in photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 808. P. 293.
 38. *Renger G.* The action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea on the water-splitting enzyme system Y of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 314. P. 113.
 39. *Horton P., Whitmarsh J., Cramer W.A.* On the specific site of action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in chloroplasts: inhibition of a dark acid-induced decrease in midpoint potential of cytochrome b-559 // *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. V. 176. P. 519.
 40. *Toth S.Z., Schansker G., Strasser R.J.* In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2005. V. 1708. P. 275.
 41. *Broser M., Glockner C., Gabdulkhakov A., Guskov A., Buchta J., Kern J., Muh F., Dau H., Saenger W., Zouni A.* Structural Basis of Cyanobacterial Photosystem II Inhibition by the Herbicide Terbutryn // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 15964.
 42. *Trebst A., Draber W.* Structure activity correlations of recent herbicides in photosynthetic reactions // *Advances in Pesticide Chemistry* / Eds. Geissbuhler H., Kearner P.C., Brooks G.T. Oxford, UK: Pergamon, 1979. P. 223.
 43. *Гольдфельд М.Г., Каранетян Н.В.* Фотосинтез и гербициды // *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева.* 1986. Т. 31. С. 567.
 44. *Гольдфельд М.Г., Каранетян Н.В.* Физико-химические основы действия гербицидов // *Итоги науки и техники. Серия Биологическая химия.* 1989. Т. 30. С. 145
 45. *Pfister K., Schreiber U.* Comparison of diuron- and phenol-type inhibitors: additional inhibitory action at the photosystem-II donor site. *Z. Naturforsch.* 1984. V. 39c. P. 389.
 46. *Wollman F.A.* Determination and modification of the redox state of the secondary acceptor of photosystem II in the dark // *Biochem. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1978. V. 503. P. 263.
 47. *Farineau J., Mathis P.* Effects of herbicides on binary oscillations of ultraviolet flash-induced absorption changes in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 808. P. 103.
 48. *Rutherford A.W., Zimmerman J.L., Mathis P.* The effect of herbicides on components of the PS II reaction centre measured by EPR // *FEBS Lett.* 1984. V. 165. P. 156.
 49. *Horvath H., Trebst A.* Usefulness of thermoluminescence in herbicide research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1986. V. 4. P. 293.
 50. *Babcock G.T., Sauer K.* Electron paramagnetic resonance signal II in spinach chloroplasts. II. Alternative spectral forms and inhibitor effects on kinetics of signal II in flashing light // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 325. P. 504.
 51. *Mathis P., Rutherford A.W.* Effects of phenolic herbicides on the oxygen-evolving side of photosystem-II. Formation of carotenoid cation // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1984. V. 767. P. 217.
 52. *Renger G.* The action of 2-anilinothiophenes as accelerators of the deactivation reactions in the watersplitting enzyme system of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1972. V. 256. P. 428.
 53. *Schenck C.C., Diner B., Mathis P., Satoh K.* Flash-induced carotenoid radical cation formation in Photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1982. V. 680. P. 216.
 54. *Hertogs M., Wessels J.S.* Ferredoxin-stimulated photoreduction of 2,4-dinitrophenol with solubilized chlorophyll a // *Biochim. Biophys. Acta, Biophys. Incl. Photosynth.* 1965. V. 109. P. 610.
 55. *Барский Е.Л., Губанова О.Н., Самуилов В.Д.* Ингибирующее действие 2,6-дитретбутил-4-метилфенола на перенос электронов в фотосистеме-II изолированных мембран // *Биохимия.* 1988. Т. 53. С. 2025.
 56. *Аллахвердиев С.И., Музафаров Е.Н., Климов В.В.* Влияние кварцетина на перенос электронов в фотосистеме 1 и 2 хлоропластов гороха // *Биофизика.* 1989. Т. 34. С. 976.
 57. *Климов В.В., Аллахвердиев С.И., Жармухамедов С.К.* Окислительно-восстановительное взаимодействие фенольного гербицида диносеба с парой [П(680(+))Фф(-)] в реакционном центре фотосистемы 2 растений // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. С. 770.
 58. *Horvath H., Trebst A.* Usefulness of thermoluminescence in herbicide research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1986. V. 4. P. 293.
 59. *Krieger-Liszka A., Rutherford A.W.* Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 17339.
 60. *Roberts A.G., Gregor W., Britt R.D., Kramer D.M.* Acceptor and donor-side interactions of phenolic inhibitors in Photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2003. V. 1604. P. 23.
 61. *Kaminskaya O., Shuvalov V.A., Renger G.* Two reaction pathways for transformation of high potential cytochrome b559 of PS II into the intermediate potential

- form // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2007. V. 1767. P. 550.
62. *Yotsova E.K., Stefanov M.A., Dobrikova A.G., Apostolova E.L.* Different sensitivities of photosystem II in green algae and cyanobacteria to phenylurea and phenol-type herbicides: effect on electron donor side // *Z. Naturforsch.* 2017. V. 72c. P. 315.
 63. *Rutherford A.W., Krieger-Liszkay A.* Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II // *Trends Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 648.
 64. *Fufezana C., Rutherford A.W., Krieger-Liszkaya A.* Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II // *FEBS Lett.* 2002. V. 532. P. 407.
 65. *Takahashi R., Hasegawa K., Takano A., Noguchi T.* Structures and Binding Sites of Phenolic Herbicides in the Q_B Pocket of Photosystem II // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 5445.
 66. *Renger G., Bouges-Bocquet B., Buchel K.H.* The modification of the trapping properties within the photosynthetic watersplitting enzyme system Y // *J. Bioenergetics.* 1973. V. 4. P. 491.
 67. *Renger G., Bouges-Bocquet B., Delosme R.* Studies on the ADRY agent-induced mechanism of the discharge of the holes trapped in the photosynthetic watersplitting enzyme system Y // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 292. P. 796.
 68. *Renger G., Inoue Y.* Studies on the mechanism of ADRY agents (agent accelerating the deactivation reactions of water-splitting enzyme system Y) on thermoluminescence emission // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 725. P. 146.
 69. *Renger G.* Studies on the mechanism of destabilization of the positive charges trapped in the photosynthetic water-splitting enzyme system Y by a deactivation-accelerating agent // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1973. V. 314. P. 390.
 70. *Renger G.* Requirement of an acidic proton in substances which act as accelerators of the deactivation reactions in the water-splitting enzyme system of photosynthesis // *FEBS Lett.* 1972. V. 23. P. 321.
 71. *Katoh S., San Pietro A.* Ascorbate-supported NADP photoreduction by heated Euglena chloroplasts // *Arch. Biochem. Biophys.* 1967. V. 122. P. 144.
 72. *Homann P.H.* Actions of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone on electron transport and fluorescence of isolated chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1971. V. 245. P. 129.
 73. *Yamashita T., Butler W.L.* Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to photosystem II // *Plant Physiol.* 1969. V. 44. P. 1342.
 74. *Kimimura M., Katoh S., Ikegami I., Takamiya A.* Inhibitory site of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in the electron transfer system of the chloroplasts // *Biochim. et Biophys. Acta, Bioenerg.* 1971. V. 234. P. 92.
 75. *Homann P.H.* Actions of tetraphenylboron on the electron flow in photosystem II of isolated chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1972. V. 256. P. 336.
 76. *Gregory R.P.* The inhibition of oxygen production and the uncoupling of electron transport in photosynthesis in chloroplasts by substituted thiophens // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1974. V. 368. P. 228.
 77. *Lemasson C., Etienne A.L.* Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa* // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1975. V. 408. P. 135.
 78. *Siderer Y., Hardt H., Malkin S.* Effect of uncouplers and ADRY reagents on delayed and triggered emission from isolated chloroplasts // *FEBS Lett.* 1976. V. 69. P. 19.
 79. *Lozier R.H., Butler W.L.* Effects of Photosystem II Inhibitors on Electron Paramagnetic Resonance Signal II of Spinach Chloroplasts // *Photochem. Photobiol.* 1973. V. 17. P. 133.
 80. *Cramer W.A., Horton P., Donnell J.J.* Inhibition of chemical oxidation and reduction of cytochromes f and b-559 by carbonylcyanide p-trifluoromethoxy phenylhydrazone // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1974. V. 368. P. 361.
 81. *Velthuys B.R.* Carotenoid and cytochrome b559 reactions in photosystem II in the presence of tetraphenylboron // *FEBS Lett.* 1981. V. 126. P. 272.
 82. *Mac Laughlin S.G.A., Dilger J.P.* Transport of protons across membranes by weak acids // *Physiol. Rev.* 1980. V. 60. P. 825.
 83. *Hanssum B., Renger G., Weiss W.* Studies on the reaction mechanism of tetraphenylboron at the Photosystem II donor side in isolated spinach chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1985. V. 808. P. 243.
 84. *Barber J., Chapman D.J., Telfer A.* Characterisation of a PS II reaction centre isolated from the chloroplasts of *Pisum sativum* // *FEBS Lett.* 1987. V. 220. P. 67.
 85. *Barabas K., Garab G.* Two populations of the high-potential form of cytochrome b-559 in chloroplasts treated with 2-(3-chloro-4-trifluoromethyl)anilino-3,5-dinitrothiophene (Ant 2p) // *FEBS Lett.* 1989. V. 248. P. 62.
 86. *Козлов Ю.Н., Казакова А.А., Фейзиуев Я.М., Аллахвердиев С.И., Климов В.В.* Электрохимическое окисление и восстановление АНТ-2р в связи с его ингибирующим действием на активность фотосистемы 2 // *Биохимия.* 1995. Т. 60. С. 976.
 87. *Samuilov V.D., Renger G., Paschenko V.Z., Oleskin A.V., Gusev M.V., Gubanov O.N., Vasil'ev S.S., Barsky E.L.* Inhibition of photosynthetic oxygen evolution by protonophoric uncouplers // *Photosynth. Res.* 1995. V. 46. P. 455.
 88. *Bukhov N.G., Egorova E.A., Govindachary S., Carpentier R.* Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2004. V. 1657. P. 121.
 89. *Karacan M., Yakana C., Yakan M., Karacan N., Zhar-mukhamedov S.K., Shitov A., Los D.A., Klimov V.V., Allahverdiev S.I.* Quantitative structure-activity relationship analysis of perfluoroiso-propyldinitrobenzene derivatives known as photosystem II electron transfer inhibitors // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 2012. V. 1817. P. 1229.
 90. *Satoh K., Nakatani H.Y., Steinback K.E., Wiltson J., Arntzen C.I.* Polypeptide composition of a photosystem II core complex presence of a herbicide-binding protein // *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1983. V. 724. P. 142.
 91. *Marder J.B., Chapman D.J., Telfer A., Nixon P.J., Barber J.* Identification of psbA and psbD gene products, D1

- and D2, as reaction centre proteins of photosystem 2 // Plant Mol. Biol. 1987. V. 9. P. 325.
92. Шитов А.В., Побегуц О.В., Смолова Т.Н., Аллаhverдиев С.И., Климов В.В. Марганецзависимая карбоангидразная активность белков фотосистемы 2 // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 629.
93. Shitov A.V., Zharmukhamedov S.K., Shutova T.V., Allakhverdiev S.I., Samuelsson G., Klimov V.V. A carbonic anhydrase inhibitor induces bicarbonate-reversible suppression of electron transfer in pea photosystem 2 membrane fragments // J. Photochem. Photobiol., B. 2011. V. 104. P. 366.
94. Shitov A.V., Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K., Rodionova M.V., Karacan M., Karacan N., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. Is carbonic anhydrase activity of photosystem II required for its maximum electron transport rate? // Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2018. V. 1859. P. 292.
95. Ran C., Yu X., Jin M., Zhang W. Role of Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in enhancing photobiological hydrogen production by marine green alga *Platymonas subcordiformis* // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. P. 438.
96. Trebst A. Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system // Photosynth. Res. 2007. V. 92. P. 217.
97. Dayan F.E., Duke S.O., Grossmann K. Herbicides as Probes in Plant Biology // Weed Sci. 2010. V. 58. P. 340.
98. Doddaiah K.M., Narayan A., Aswathanarayana R.G., Ravi S. Effect of metabolic inhibitors on growth and carotenoid production in *Dunaliella bardawil* // J. Food Sci. Technol. 2013. V. 50. P. 1130.
99. Pansook S., Incharoensakdi A., Phunpruch S. Effects of the photosystem II inhibitors CCCP and DCMU on hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* // Scientific World J. 2019. V. 2019: 1030236. <https://doi.org/10.1155/2019/1030236>

ПЛАСТИДНЫЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЯДЕРНОГО КОДИРОВАНИЯ ЯВЛЯЮТСЯ КОМПОНЕНТАМИ АНТЕРОГРАДНОГО КОНТРОЛЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ ГЕНОВ

© 2021 г. И. А. Бычков^а, А. А. Андреева^а, Н. В. Кудрякова^{а, *},
Е. С. Пожидаева^а, А. С. Дорошенко^а, В. В. Кузнецов^а

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

*e-mail: nvkudryakova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.07.2020 г.

После доработки 11.08.2020 г.

Принята к публикации 11.08.2020 г.

Известно, что фитогормоны играют важную роль в регуляции биогенеза хлоропластов, однако информация о путях восприятия гормонального сигнала хлоропластами ограничена. С целью анализа возможных механизмов действия гормонов изучали ответ мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *scabra3-2* (*sca3-2*) и *rpotmp* с дефектными генами пластидных РНК-полимераз ядерного кодирования на обработку абсцизовой кислотой (АБК) и цитокининами (ЦК). Реакция мутанта *rpotmp*, как правило, не отличалась от ответа растений дикого типа: *транс*-зеатин активировал накопление транскриптов генов аппарата транскрипции и генов, кодируемых пластидным геномом, тогда как АБК в слабой степени подавляла их экспрессию или не оказывала достоверного эффекта. Однако базовые уровни матриц генов, входящих в транскрипционный ферментный комплекс РЕР-А (plastid-encoded RNA polymerase), у *rpotmp* оказались выше, чем у растений дикого типа, что, вероятно, связано с компенсаторным механизмом, позволяющим мутанту усилить РЕР-зависимую транскрипцию при отсутствии фермента РРОТр. Дисфункция фермента пластидной РНК-полимеразы РРОТр у *sca3-2* индуцировала измененный гормональный ответ генов транскрипционного комплекса пластид и генов пластидного кодирования в сравнении с реакцией растений дикого типа. Отсутствие значимого активирующего эффекта ЦК на экспрессию генов аппарата транскрипции коррелировало с сохранением базового уровня транскриптов хлоропластных генов и пластидных белков. Кроме того, *sca3-2* имел увеличенную базовую экспрессию генов метаболизма ЦК – *IPT3*, *IPT5* и *СКХ5*. При этом реакция на ингибирующее действие АБК у этого мутанта, напротив, была выражена сильнее, возможно, в связи с изменением базовых уровней матриц ряда генов, кодирующих белки сигналинга и метаболизма АБК. Таким образом, изменение экспрессии генов НЕР (nuclear-encoded RNA polymerases) под действием гормонов может трансформироваться в активацию или подавление экспрессии хлоропластных генов ядерного или пластомного кодирования, обеспечивая регуляцию функций хлоропластов за счет механизмов антероградного сигналинга.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, абсцизовая кислота, хлоропласты, цитокинин, РРОТр, РРОТрр

DOI: 10.31857/S0015330321020020

ВВЕДЕНИЕ

Фитогормоны играют важнейшую роль в регуляции биогенеза хлоропластов и их адаптации к меняющимся условиям среды на разных этапах онтогенеза. Однако пути восприятия гормонального сигнала в этих органеллах остаются до сих пор малоизученными и, по-видимому, могут дублироваться несколькими механизмами. Наряду с непосредственным связыванием *цис*-элементов в промоторных зонах пластидных генов гормон-регулируемыми *транс*-факторами действие гормона может быть опосредовано через ядерные ге-

ны, определяющие экспрессию генов пластома. Примерно из 3000–4000 белков хлоропластов около 98% кодируются ядерным геномом, и именно они определяют тип пластид и их метаболическую активность, все этапы экспрессии пластидного генома и систему импорта белков в хлоропласты. Это позволяет предположить, что фитогормоны, модулируя ядерный сигнал, влияют на биогенез хлоропластов. Возможная справедливость этого утверждения косвенно подтверждается тем, что антероградный сигналинг является ведущим в регуляции биогенеза хлоропластов и, кроме того, до настоя-

шего времени, несмотря на огромные успехи в изучении механизма действия фитогормонов, ни один рецептор ни для одного фитогормона не был обнаружен в хлоропластах.

Хорошо известно, что фитогормоны цитокинины и АБК оказывают противоположный эффект на биогенез хлоропластов, причем нами установлено, что они влияют на экспрессию пластидных генов как на транскрипционном [1, 2], так и на посттранскрипционном уровне [3, 4]. Для изучения возможного вовлечения этих фитогормонов в антероградный сигналинг мы выбрали два ядерных гена аппарата транскрипции пластид *RPOTp* и *RPOTmp*, кодирующих моносубъединичные РНК-полимеразы фагового типа (NEP – nuclear-encoded RNA polymerase). Помимо *RPOTp* и *RPOTmp* геном *Arabidopsis* содержит ген РНК-полимеразы фагового типа *RPOTm*, которая осуществляет транскрипцию митохондриальных генов. Полагают, что гены *RPOTp* и *RPOTmp* произошли за счет дубликации гена *RPOTm* и последующего приобретения полимеразой транзитного пептида, направляющего их в пластиды (*RPOTp*) или в пластиды и митохондрии (*RPOTmp*, у двудольных растений) [5]. В отличие от митохондрий гены пластид транскрибируются также мультисубъединичной РНК-полимеразой прокариотического типа, кодируемой пластомом (PEP – plastid-encoded RNA polymerase).

Специфичность действия пластидных полимераз была предметом детального анализа ряда исследователей. Показано, что PEP-полимераза отвечает, прежде всего, за транскрипцию генов фотосинтеза, а ферменты NEP активны на ранних стадиях онтогенеза и транскрибируют гены домашнего хозяйства, включая четыре коровые субъединицы PEP. Однако при подавлении PEP-зависимой транскрипции за счет генетических дефектов или неблагоприятных физиологических условий NEP способны транскрибировать даже фотосинтетические гены с NEP-зависимых промоторов [6, 7].

Ферменты NEP транскрибируют пластидные гены, связываясь с тремя различными типами промоторов, похожих на промоторы генов бактериофагов и митохондрий. Наличие различных типов промоторов предполагает существование специфичных *транс*-факторов, которые помогали бы РНК-полимеразам определять сайты инициации транскрипции. Тем не менее, до настоящего времени для NEP не был идентифицирован ни один *транс*-фактор, возможно, из-за низкой концентрации, не позволяющей выделить их современными методами.

Вопрос о гормональной регуляции активности NEP также остается открытым. Поэтому задачи нашего исследования включали анализ особенностей гормональной регуляции хлоропластных генов, а также генов метаболизма и сигналинга

цитокининов (ЦК) и АБК у растений дикого типа и мутантов с дефектными генами *RPOTp* и *RPOTmp*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на трехнедельных растениях дикого типа *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Columbia-0), гомозиготных инсерционных Т-ДНК нокаут-мутантах *scabra3-2* (*sca3-2*) и *rpotmp-2*, отобранных из стоковых линий NASC N593884 (Salk 0938840) и N6328420 (Salk 132842), соответственно. Растения выращивали на агаризованной половинной МС-среде в климатической камере при интенсивности освещения 70 мкЭ/(м² с), температуре 23°C и фотопериоде 16 ч – свет / 8 ч – темнота.

Содержание пигментов и показатели переменной флуоресценции хлорофилла с использованием флуориметра РАМ-100 (Heinz Walz GmbH, Германия) оценивали в соответствии с протоколом, описанным ранее [8].

Для исследования действия гормонов растений обрабатывали растворами АБК (50 мкМ) и *транс*-зеатина (5 мкМ) в течение 3 или 24 ч, после чего фиксировали в жидком азоте. Оптимальные концентрации фитогормонов определяли в предварительных экспериментах. Относительный уровень транскриптов целевых генов определяли методом количественного ПЦР в режиме реального времени после обратной транскрипции (ПЦР-РВ) на амплификаторе LigthCyclerR96 (Roche, Швейцария) согласно методике, описанной в предыдущей работе [9]. Последовательности использованных праймеров приведены в Supplementary (Table S1).

Оценку изменений в содержании хлоропластных белков при действии фитогормонов проводили методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител против белков RbcL (AS03 037), PsbD (AS06 146), AtpB (AS05 085) и Lhcb2 (AS01 003) фирмы Agrisera (Швеция). Тотальный растительный белок получали путем гомогенизации розеточных листьев в буфере, содержащем 50 мМ HEPES-КОН, pH 7.5, 330 мМ сорбит, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂, с последующей фильтрацией гомогената через 2 слоя фильтра Miracloth (Calbiochem, США). Количественное определение тотального белка в полученных экстрактах проводили бицинохиновым методом с использованием набора BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы, содержащие 20 мкг тотального белка, разделяли в 10% SDS-PAGE, и затем белки переносили на PVDF мембрану методом полусухого переноса на приборе semi-dry (Bio-Rad, США). Взаимодействие специфических антител с исследуемыми образцами белков, иммобилизованных на мембране, проводили в условиях, рекомендованных фирмой-производителем антител

Таблица 1. Содержание пигментов и показатели фотосинтетической активности фотосистемы II в трехнедельных растениях дикого типа (*Columbia-0*) и инсерционных нокаут-мутантах по гену *RPOTr* (*sca3-2*) и по гену *RPOTr* (*rpotmp-2*)

Показатель	Генотип		
	дикий тип (<i>Col-0</i>)	<i>sca3-2</i>	<i>rpotmp-2</i>
Содержание хлорофилла ($a + b$), мг/г сырой массы	0.705 ± 0.036 ^a	0.071 ± 0.004 ^b	0.777 ± 0.033 ^a
Содержание каротиноидов, мг/г сырой массы	0.124 ± 0.003 ^a	0.021 ± 0.001 ^b	0.158 ± 0.004 ^c
Стационарный уровень флуоресценции F_s	0.202 ± 0.034 ^a	0.054 ± 0.006 ^b	0.194 ± 0.014 ^a
Показатель F_v/F_m	0.827 ± 0.002 ^a	0.815 ± 0.005 ^b	0.828 ± 0.003 ^a
Квантовый выход фотосистемы II на свету $Y(II)$	0.675 ± 0.009 ^a	0.595 ± 0.017 ^b	0.689 ± 0.016 ^a
Параметр нефотохимического тушения NPQ	0.261 ± 0.014 ^a	0.228 ± 0.015 ^b	0.260 ± 0.017 ^a

Примечание. Данные таблицы представляют собой средние значения ± стандартные ошибки ($n \geq 3$). Разные буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Тьюки).

(Agrisera, Швеция). Иммунореакцию визуализировали при помощи набора ECL (Bio-Rad, США) и хемилюминесцентный сигнал регистрировали на цифровом сканнере C-Digit (Li-Cor, США).

Эксперименты проводили не менее чем в 3-кратной биологической повторности. Достоверность различий проверяли с помощью метода ANOVA с последующим тестом Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инактивация генов RPOTr и RPOTr способствовала изменению физиологических характеристик и экспрессии генов сигналинга и метаболизма ЦК и АБК

Убедительным доказательством того, что NEP принимают непосредственное участие в гормональных ответах, является анализ соответствующих нокаут-мутантов. В экспериментах мы использовали трансгенные растения *sca3-2* (*sca3-2*), мутантные по гену *RPOTr*. Мутантный ген содержит Т-ДНК вставку в положении 1894 (от кодона инициации трансляции) и кодирует полипептид, в котором отсутствуют 604 аминокислоты и 9 из 11 доменов, включая С-мотив. Этот мотив является частью каталитического сайта T7 РНК полимераз, и его отсутствие вызывает дисфункцию фермента RPOTr [10]. Растения *sca3-2* обнаружили существенные изменения физиологических показателей, включая пигментацию и показатели флуоресценции (табл. 1). В частности, растения характеризовались примерно в десять раз сниженным содержанием хлорофиллов и в пять с лишним раз меньшим количеством каротиноидов по сравнению с диким типом. Уменьшение количества хлорофилла полностью коррелировало с показателями базовой флуоресценции (F_s), что, вероятно, говорит о меньшем количестве реакционных центров. Однако расчетные показатели потенциального максимального квантового

выхода (F_v/F_m), квантового выхода на свету ($Y(II)$) и нефотохимического тушения (NPQ), характеризующие эффективность фотосистемы II, были лишь незначительно ниже, чем у дикого типа. Это, по-видимому, свидетельствует о сохранении и относительно нормальном функционировании всех элементов фотосистемы.

В отличие от *sca3-2*, у *rpotmp-2* мутанта, дефектного по гену *RPOTr*, транскрипты *RPOTr* полностью отсутствовали. Этот мутант также характеризовался замедленным развитием, особенно заметным у ювенильных проростков, однако по содержанию хлорофилла и показателям активности фотосинтетического аппарата взрослых листьев не отличался от растений дикого типа или даже несколько превосходил их (табл. 1). Мы также не обнаружили каких-либо различий в содержании белков основных комплексов фотосинтетических мембран у *rpotmp-2* мутанта (рис. 1).

Для подтверждения эффективности гормональной обработки анализировали накопление транскриптов генов *ARR5* (Response Regulator 5) и *RD29A* (Responsive-to-Dehydration 29A), используемых в качестве маркеров действия цитокинина и АБК, соответственно. Оба гена активировались гормонами у всех исследованных образцов, причем мутант *sca3-2* оказался особо восприимчивым к действию АБК (табл. 2, Supplementary Table S2). Недавно о гиперчувствительности этого мутанта к АБК при прорастании семян и формировании проростков сообщали Lidón-Soto с соавт. [11]. Чтобы оценить причины повышенной чувствительности этой мутантной линии к АБК, мы исследовали влияние экзогенного гормона на экспрессию некоторых генов метаболизма и передачи сигнала АБК. У *sca3-2* оказалась снижена базовая экспрессия генов пути биосинтеза АБК *ABA1* и *ABA2*, однако по реакции этих генов на экзогенную АБК мутант не отличался от растений дикого типа (табл. 2). Среди генов цепи передачи

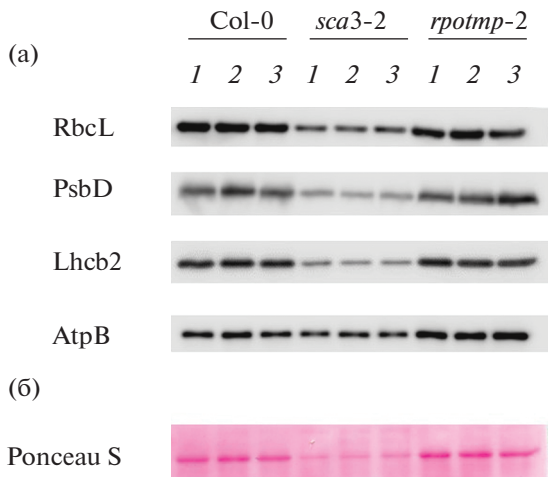


Рис. 1. Уровни хлоропластных белков у трехнедельных растений дикого типа (*Columbia-0*) и мутантов по генам *RPOTr* (*sca3-2*) и *RPOTrp* (*rpotmp-2*) (а). Растения обрабатывали АБК (50 мкМ) или *транс*-зеатином (5 мкМ) в течение 24 ч. Белки тотального экстракта анализировали методом вестерн-блоттинга, используя специфические антитела к RbcL, AtpB, PsbD и Lhcb2. Одинаковая загрузка треков (20 мкг) проверялась окрашиванием Ponceau S (б). 1 – без обработки, 2 – обработка *транс*-зеатином, 3 – обработка АБК.

сигнала АБК – *ABI1*, *ABI2* и *HAB1*, активируемых АБК [12, 13], у *sca3-2* отмечен повышенный базовый уровень экспрессии *HAB1*, однако уровни индукции этих генов гормоном практически не различались, как и уровни кратного подавления транскриптов генов рецепторов АБК – *PYR1* и *PYL5* (табл. 2). Таким образом, инактивация гена *RPOTr* способствовала изменению базовых уровней некоторых генов метаболизма и сигналинга АБК и, как следствие, могла усиливать реакцию генов ответа на АБК, но не приводила к существенному изменению экспрессии генов сигналинга в ответ на обработку экзогенной АБК.

Транс-зеатин не оказывал значимого влияния на экспрессию генов рецепторов ЦК *AHK2* и *AHK3* и регуляторов ответа типа В – *ARR1*, *ARR10* и *ARR12*, но резко индуцировал экспрессию гена рецептора *AHK4* и ЦК-регулируемого *транс*-фактора *GNL* у всех исследованных образцов (табл. 2, Supplementary Table S2). При этом мутант *sca3-2* отличался пониженной по сравнению с диким типом ЦК-активируемой экспрессией генов *AHK4* и *GNL*, как и маркерного гена *ARR5* (табл. 2). Сниженная индукция трех последних генов, возможно, также была следствием измененного гормонального статуса этого мутанта. Действительно, *sca3-2* обнаружил увеличенный втрое уровень базовой экспрессии генов синтеза ЦК *IPT3* и *IPT5* и гена катаболизма гормона *SKX5*. При этом уровень базовой экспрессии второго из исследованных генов цитокиноксидазы *SKX3* не отли-

чался от показателей растений дикого типа. Таким образом, измененная чувствительность мутанта *sca3-2* могла быть следствием повышенного содержания эндогенных ЦК. Заметим, что у мутанта *rpotmp-2* также наблюдалось увеличенное накопление матриц *IPT3*, *IPT5* и *SKX5*, хотя и не столь существенное как у *sca3-2* (Supplementary Table S2).

Дифференцированное воздействие ЦК и АБК на экспрессию пластидных генов и генов аппарата транскрипции мутантов rpotmp и rpotp

При обработке *транс*-зеатином и АБК ответы растений дикого типа и мутанта *rpotmp-2* практически не различались. Цитокинин активировал накопление транскриптов генов аппарата транскрипции хлоропластов *RPOTr*, *RPOTrm*, *SIG2*, *SIG6* и *СКА4* в 2–4 раза по сравнению с исходными значениями, а также генов РЕР-ассоциированных белков (*PAP1–12*), тогда как АБК лишь в слабой степени подавляла их экспрессию или не оказывала достоверного воздействия (Supplementary Table S3). При этом АБК стимулировала накопление мРНК гена *SIG5* у обоих образцов. Подобная реакция не случайна. В условиях стресса и повышенного уровня АБК этот *транс*-фактор в комплексе с РЕР обеспечивает транскрипцию ряда хлоропластных генов с промоторов типа *BLRP* на фоне подавления экспрессии основной части генов пластома [14].

Несколько иная картина была получена при анализе ЦК-зависимой экспрессии генов аппарата транскрипции у мутанта *scabra3-2*. ЦК практически не регулировал накопление транскриптов фрагмента гена *RPOTr* и генов *PAP2* и *СКА4*, и в незначительной степени активировал накопление транскриптов других генов аппарата транскрипции (табл. 3). Эти результаты свидетельствуют о снижении активирующего эффекта ЦК. Вместе с тем реакция на действие АБК у мутанта *sca3-2*, напротив, была выражена сильнее: после трех часов воздействия гормона экспрессия большинства исследованных генов оказалась подавлена в 2–3 раза по сравнению с исходными уровнями. Таким образом, генетическая среда оказывала непосредственное влияние на характер и величину позитивного или негативного эффекта гормонов на экспрессию генов аппарата транскрипции пластид.

Это, в свою очередь, предполагает возможное изменение экспрессии, по крайней мере, двух классов генов, кодируемых пластидным геномом: класса II (NEP и РЕР-зависимые гены) и класса III (NEP-транскрибируемые гены). Действительно, гены *rpoB* (класс III), *atpB* и *clpP* (класс II) не активировались *транс*-зеатином у *sca3-2*, в отличие от линии *rpotmp* или растений дикого типа, где *транс*-зеатин стимулировал повышенное со-

Таблица 2. Изменение экспрессии генов сигналинга и метаболизма цитокининов и АБК у трехнедельных растений дикого типа (*Columbia-0*) и инсерционного нокаут-мутанта по гену *RPOTr* (*sca3-2*). Опытные растения обрабатывали АБК (50 мкМ) и *транс*-зеатином (5 мкМ) в течение 3 ч

Гены	Генотип и вид обработки					
	дикий тип без обработки	дикий тип <i>транс</i> -зеатин	дикий тип АБК	<i>sca3-2</i> без обработки	<i>sca3-2 транс</i> -зеатин	<i>sca3-2</i> АБК
<i>RD29</i>	1.000 ± 0.055 ^a	0.363 ± 0.014 ^b	3.605 ± 0.174 ^c	2.540 ± 0.363 ^d	0.632 ± 0.025 ^b	14.610 ± 0.125 ^e
<i>ABA1</i>	1.000 ± 0.036 ^a	0.793 ± 0.017 ^b	2.332 ± 0.078 ^c	0.601 ± 0.043 ^b	0.476 ± 0.056 ^b	1.866 ± 0.105 ^d
<i>ABA2</i>	1.000 ± 0.079 ^a	1.197 ± 0.087 ^a	0.599 ± 0.033 ^b	0.541 ± 0.032 ^b	0.755 ± 0.054 ^c	0.414 ± 0.024 ^b
<i>CYP707a1</i>	1.000 ± 0.064 ^a	0.750 ± 0.047 ^b	0.862 ± 0.031 ^b	0.873 ± 0.030 ^b	0.730 ± 0.059 ^b	0.745 ± 0.059 ^b
<i>ABI1</i>	1.000 ± 0.069 ^a	0.572 ± 0.036 ^b	4.433 ± 0.338 ^c	1.294 ± 0.090 ^a	0.589 ± 0.048 ^b	3.149 ± 0.437 ^d
<i>ABI2</i>	1.000 ± 0.074 ^a	0.777 ± 0.102 ^b	6.357 ± 0.363 ^c	1.283 ± 0.088 ^a	0.815 ± 0.111 ^{ab}	6.774 ± 0.687 ^c
<i>HAB1</i>	1.000 ± 0.106 ^a	0.642 ± 0.077 ^b	8.074 ± 1.188 ^c	2.266 ± 0.208 ^d	1.227 ± 0.124 ^a	9.221 ± 0.760 ^c
<i>PYR1</i>	1.000 ± 0.070 ^a	1.945 ± 0.206 ^b	0.769 ± 0.060 ^c	1.447 ± 0.103 ^b	1.400 ± 0.123 ^b	0.402 ± 0.033 ^d
<i>PYL5</i>	1.000 ± 0.089 ^a	1.877 ± 0.213 ^b	0.141 ± 0.012 ^c	1.210 ± 0.148 ^a	1.486 ± 0.149 ^b	0.200 ± 0.015 ^c
<i>ARR5</i>	1.000 ± 0.090 ^a	55.010 ± 5.226 ^b	0.620 ± 0.042 ^c	2.505 ± 0.205 ^d	14.070 ± 1.870 ^e	1.625 ± 0.126 ^f
<i>ARR1</i>	1.000 ± 0.069 ^{abc}	0.853 ± 0.049 ^b	1.270 ± 0.078 ^c	0.745 ± 0.041 ^b	0.451 ± 0.049 ^d	0.476 ± 0.024 ^d
<i>ARR10</i>	1.000 ± 0.066 ^a	1.419 ± 0.132 ^b	1.418 ± 0.085 ^b	1.161 ± 0.085 ^{ab}	1.094 ± 0.086 ^a	0.777 ± 0.054 ^a
<i>ARR12</i>	1.000 ± 0.069 ^{ac}	1.569 ± 0.077 ^b	1.275 ± 0.048 ^a	0.832 ± 0.047 ^c	0.853 ± 0.067 ^c	0.486 ± 0.028 ^d
<i>AHK2</i>	1.000 ± 0.118 ^a	2.063 ± 0.174 ^b	1.569 ± 0.170 ^c	1.385 ± 0.122 ^{ac}	0.986 ± 0.083 ^a	0.534 ± 0.045 ^d
<i>AHK3</i>	1.000 ± 0.133 ^a	0.956 ± 0.092 ^a	1.855 ± 0.218 ^b	1.636 ± 0.159 ^b	1.371 ± 0.136 ^{ab}	1.347 ± 0.128 ^{ab}
<i>AHK4</i>	1.000 ± 0.113 ^{ae}	10.540 ± 1.081 ^b	0.678 ± 0.075 ^c	1.439 ± 0.213 ^a	5.850 ± 0.513 ^d	0.898 ± 0.104 ^e
<i>GNL</i>	1.000 ± 0.079 ^a	11.790 ± 1.232 ^b	0.900 ± 0.091 ^a	1.553 ± 0.112 ^c	6.336 ± 0.448 ^d	0.449 ± 0.035 ^e
<i>IPT3</i>	1.000 ± 0.065 ^a	1.753 ± 0.133 ^b	1.668 ± 0.099 ^b	3.972 ± 0.266 ^c	2.532 ± 0.158 ^d	1.141 ± 0.054 ^a
<i>IPT5</i>	1.000 ± 0.139 ^a	1.189 ± 0.117 ^a	1.763 ± 0.176 ^b	3.117 ± 0.253 ^c	1.753 ± 0.199 ^b	2.612 ± 0.220 ^c
<i>CKX3</i>	1.000 ± 0.055 ^a	5.075 ± 0.439 ^b	0.430 ± 0.038 ^c	1.097 ± 0.082 ^a	10.690 ± 0.588 ^d	0.510 ± 0.031 ^c
<i>CKX5</i>	1.000 ± 0.062 ^a	4.449 ± 0.381 ^b	1.052 ± 0.067 ^a	4.526 ± 0.342 ^b	5.401 ± 0.404 ^b	2.040 ± 0.098 ^c

Примечание. Значения нормированы относительно контроля (дикий тип без обработки гормонами). Данные таблицы представляют собой средние значения ± стандартные ошибки ($n \geq 3$). Разные буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Тьюки).

держание транскриптов этих генов (табл. 4, Supplementary Table S4). Таким образом, отсутствие активирующего эффекта ЦК на экспрессию генов аппарата транскрипции коррелировало у этого мутанта с сохранением базового уровня транскриптов NEP-зависимых генов пластома. Количество матриц PEP-зависимого гена *psbD* (класс I) также достоверно не регулировалось ЦК, в отличие от мутанта *rpotmp-2* или растений дикого типа, где экспрессия этого гена активировалась под действием гормона. АБК не оказывала значимого воздействия на экспрессию генов пластома у растений дикого типа и мутанта *rpotmp-2* при использованной экспериментальной системе, но подавляла накопление транскриптов пластидных генов у *sca3-2*. Из полученных данных следует, что повышенная чувствительность к АБК, продемон-

стрированная у *sca3-2* маркерным АБК-индуцируемым геном (*RD29a*), распространяется, в том числе, и на экспрессию генов пластома.

Влияние ЦК и АБК на посттранскрипционный уровень регуляции экспрессии хлоропластных генов у мутантов NEP

Посттранскрипционный уровень регуляции имеет принципиальное значение для экспрессии пластидных генов. Как мы ранее показали, накопление матриц генов пластома не всегда коррелирует с уровнем кодируемых ими хлоропластных белков [3]. В этой связи для выявления механизмов реализации генетической информации в хлоропластах большой интерес представляет оценка

Таблица 3. Изменение экспрессии генов аппарата транскрипции у трехнедельных растений дикого типа (*Columbia-0*) и инсерционного нокаут-мутанта по гену *RPOTr* (*sca3-2*). Опытные растения обрабатывали АБК (50 мкМ) и *транс*-зеатином (5 мкМ) в течение 3 ч

Гены	Генотип и вид обработки					
	дикий тип без обработки	дикий тип <i>транс</i> -зеатин	дикий тип АБК	<i>sca3-2</i> без обработки	<i>sca3-2 транс</i> -зеатин	<i>sca3-2</i> АБК
<i>RPOTr</i>	1.000 ± 0.050 ^a	3.972 ± 0.197 ^b	0.686 ± 0.078 ^c	1.464 ± 0.111 ^d	1.580 ± 0.073 ^d	0.714 ± 0.098 ^c
<i>RPOTrm</i>	1.000 ± 0.066 ^a	2.639 ± 0.186 ^b	0.695 ± 0.052 ^c	1.102 ± 0.062 ^a	1.834 ± 0.279 ^b	0.480 ± 0.035 ^d
<i>RPOTrmp</i>	1.000 ± 0.071 ^a	3.630 ± 0.204 ^b	0.486 ± 0.035 ^c	0.611 ± 0.110 ^c	1.410 ± 0.086 ^d	0.254 ± 0.019 ^e
<i>СКА4</i>	1.000 ± 0.114 ^a	2.723 ± 0.260 ^b	1.193 ± 0.125 ^a	1.357 ± 0.124 ^{ac}	1.474 ± 0.144 ^c	0.661 ± 0.080 ^d
<i>SIG2</i>	1.000 ± 0.077 ^a	2.704 ± 0.205 ^b	0.976 ± 0.087 ^a	1.113 ± 0.085 ^a	1.490 ± 0.127 ^c	0.523 ± 0.031 ^d
<i>SIG5</i>	1.000 ± 0.079 ^a	2.523 ± 0.164 ^b	2.761 ± 0.245 ^b	2.151 ± 0.124 ^c	1.516 ± 0.117 ^d	2.387 ± 0.149 ^{bc}
<i>SIG6</i>	1.000 ± 0.088 ^a	2.938 ± 0.193 ^b	0.818 ± 0.075 ^a	0.898 ± 0.059 ^a	1.451 ± 0.121 ^c	0.342 ± 0.030 ^d
<i>PAP1</i>	1.000 ± 0.075 ^a	2.354 ± 0.152 ^b	1.017 ± 0.086 ^a	1.214 ± 0.039 ^a	1.586 ± 0.097 ^c	0.478 ± 0.036 ^d
<i>PAP2</i>	1.000 ± 0.047 ^a	2.308 ± 0.231 ^b	1.113 ± 0.085 ^a	1.333 ± 0.111 ^a	1.454 ± 0.091 ^c	0.509 ± 0.043 ^d
<i>PAP3</i>	1.000 ± 0.066 ^a	2.063 ± 0.180 ^b	0.708 ± 0.059 ^c	1.025 ± 0.089 ^a	1.790 ± 0.092 ^b	0.258 ± 0.032 ^d
<i>PAP4</i>	1.000 ± 0.053 ^a	2.136 ± 0.159 ^b	0.758 ± 0.044 ^c	1.202 ± 0.086 ^a	1.647 ± 0.064 ^d	0.371 ± 0.041 ^e
<i>PAP5</i>	1.000 ± 0.070 ^a	3.010 ± 0.241 ^b	0.681 ± 0.063 ^c	0.968 ± 0.073 ^a	2.346 ± 0.223 ^b	0.293 ± 0.030 ^d
<i>PAP6</i>	1.000 ± 0.099 ^a	3.387 ± 0.286 ^b	0.742 ± 0.063 ^c	0.883 ± 0.055 ^{ac}	2.158 ± 0.187 ^d	0.419 ± 0.028 ^e
<i>PAP7</i>	1.000 ± 0.074 ^a	1.905 ± 0.164 ^b	0.853 ± 0.083 ^a	0.963 ± 0.101 ^a	1.602 ± 0.090 ^b	0.313 ± 0.033 ^c
<i>PAP8</i>	1.000 ± 0.059 ^a	2.848 ± 0.286 ^b	0.768 ± 0.057 ^c	0.821 ± 0.065 ^{ac}	1.548 ± 0.077 ^d	0.371 ± 0.019 ^e
<i>PAP9</i>	1.000 ± 0.085 ^a	2.063 ± 0.149 ^b	1.202 ± 0.081 ^a	1.338 ± 0.098 ^a	2.465 ± 0.383 ^b	1.253 ± 0.088 ^a
<i>PAP10</i>	1.000 ± 0.106 ^a	2.099 ± 0.150 ^b	0.678 ± 0.062 ^c	0.683 ± 0.035 ^c	1.371 ± 0.092 ^a	0.236 ± 0.019 ^d
<i>PAP11</i>	1.000 ± 0.064 ^a	2.815 ± 0.146 ^b	0.646 ± 0.054 ^c	0.954 ± 0.049 ^a	1.442 ± 0.116 ^d	0.316 ± 0.019 ^e
<i>PAP12</i>	1.000 ± 0.073 ^{ac}	2.526 ± 0.177 ^b	0.809 ± 0.059 ^c	1.008 ± 0.050 ^a	1.226 ± 0.094 ^a	0.469 ± 0.028 ^d

Примечание. Значения нормированы относительно контроля (дикий тип без обработки гормонами). Данные представляют собой средние значения ± стандартные ошибки ($n \geq 3$). Буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Тьюки).

Таблица 4. Изменение экспрессии хлоропластных генов и гена ядерного кодирования *LHCb2* у трехнедельных растений дикого типа (*Columbia-0*) и инсерционного нокаут-мутанта по гену *RPOTr* (*sca3-2*). Опытные растения обрабатывали АБК (50 мкМ) и *транс*-зеатином (5 мкМ) в течение 3 ч

Гены	Генотип и вид обработки					
	дикий тип без обработки	дикий тип <i>транс</i> -зеатин	дикий тип АБК	<i>sca3-2</i> без обработки	<i>sca3-2 транс</i> -зеатин	<i>sca3-2</i> АБК
<i>rpoB</i>	1.000 ± 0.101 ^a	1.859 ± 0.182 ^b	1.141 ± 0.100 ^a	0.862 ± 0.067 ^a	0.853 ± 0.061 ^a	0.440 ± 0.038 ^c
<i>rbcL</i>	1.000 ± 0.048 ^a	1.501 ± 0.072 ^b	0.877 ± 0.057 ^{ac}	0.886 ± 0.028 ^{ac}	1.575 ± 0.069 ^b	0.690 ± 0.125 ^c
<i>psbD</i>	1.000 ± 0.083 ^a	1.511 ± 0.131 ^b	1.110 ± 0.119 ^a	0.523 ± 0.076 ^c	0.595 ± 0.045 ^c	0.468 ± 0.047 ^c
<i>atpB</i>	1.000 ± 0.043 ^a	1.414 ± 0.108 ^b	1.137 ± 0.078 ^a	0.663 ± 0.023 ^c	0.631 ± 0.031 ^c	0.390 ± 0.014 ^d
<i>clpP</i>	1.000 ± 0.060 ^a	1.892 ± 0.119 ^b	1.338 ± 0.092 ^c	0.812 ± 0.053 ^d	0.772 ± 0.032 ^d	0.440 ± 0.031 ^e
<i>LHCb2</i>	1.000 ± 0.057 ^a	1.303 ± 0.088 ^{ab}	1.604 ± 0.115 ^b	0.324 ± 0.023 ^c	0.208 ± 0.013 ^{cd}	0.139 ± 0.010 ^d

Примечание. Значения нормированы относительно контроля (дикий тип без обработки гормонами). Данные представляют собой средние значения ± стандартные ошибки ($n \geq 3$). Буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Тьюки).

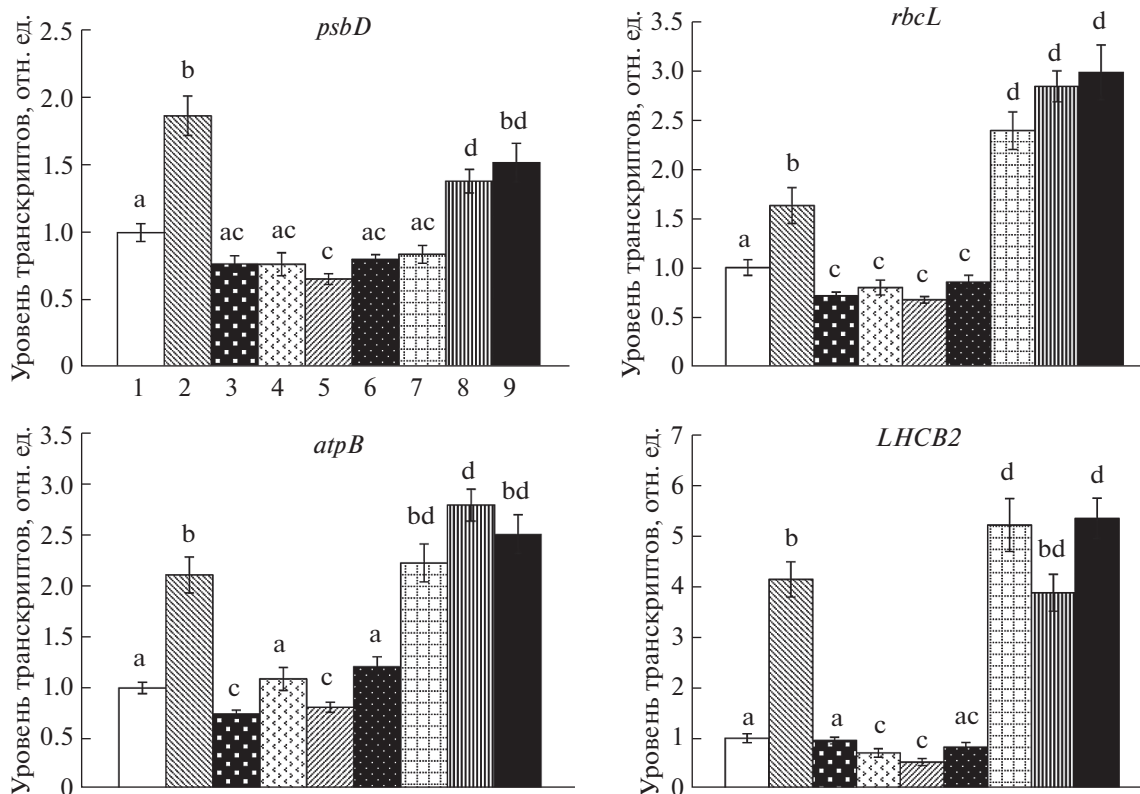


Рис. 2. Изменение экспрессии генов пластидного кодирования и гена ядерного кодирования (*LHCB2*) у трехнедельных растений дикого типа (*Columbia-0*) и мутантов по генам *RPOTp* (*sca3-2*) и *RPOTmp* (*rpotmp-2*). Опытные растения обрабатывали АБК (50 мкМ) и *транс*-зеатином (5 мкМ) в течение 24 ч. Обозначение вариантов опыта. 1 – дикий тип без обработки; 2 – дикий тип, обработанный *транс*-зеатином; 3 – дикий тип, обработанный АБК; 4 – *sca3-2* без обработки; 5 – *sca3-2*, обработанный *транс*-зеатином; 6 – *sca3-2*, обработанный АБК; 7 – *rpotmp-2* без обработки; 8 – *rpotmp-2*, обработанный *транс*-зеатином; 9 – *rpotmp-2*, обработанный АБК. Значения нормированы относительно контроля (дикий тип без обработки гормонами). Данные представляют собой средние значения ± стандартные ошибки ($n \geq 3$). Буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Тьюки).

особенностей влияния гормонов на содержание пластидных белков.

Согласно результатам вестерн-анализа, у линий *Arabidopsis* с мутантными генами *RPOTp* и *RPOTmp* уровни хлоропластных белков при гормональной обработке лишь частично коррелировали с накоплением матриц кодирующих их генов. У мутанта *rpotmp-2* накопление белков практически не индуцировалось *транс*-зеатином, а у линии *sca3-2* содержание белков не снижалось в ответ на воздействие АБК или ЦК (рис. 1, рис. 2). Вместе с тем у растений дикого типа модуляции в содержании белков соответствовали гормон-зависимому ответу, наблюдаемому на уровне РНК, то есть в присутствии ЦК фиксировалось некоторое повышение в накоплении хлоропластных белков *PsbD*, *AtpB* и *Lhcb 2*, а при обработке АБК сохранялись контрольные уровни. Очевидно, содержание транскриптов вряд ли можно рассматривать как единственный фактор, определяющий скорость синтеза и распада хлоропластных белков у мутантов *NEP* в ответ на действие экзоген-

ных гормонов. Следует, однако, отметить, что в количественном отношении содержание хлоропластных белков у линии *sca3-2* существенно уступало их содержанию у растений дикого типа или мутанта *rpotmp*, что коррелировало с накоплением матриц и показателями флуоресценции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследования, изменение экспрессии генов *NEP* под действием гормонов трансформируется в активацию или подавление экспрессии фотосинтетических генов ядерного или пластомного кодирования, обеспечивая, таким образом, регуляцию функций хлоропластов за счет механизмов антероградного сигналинга. Вместе с тем дисфункция пластид, связанная с повреждением *NEP*, может инициировать обратный поток информации от хлоропластов к ядру и вызывать компенсаторное изменение экспрессии генов аппарата транскрипции и переформатирование работы компонентов гормональной системы.

Согласно полученным нами данным инактивация генов пластидных РНК-полимераз ядерного кодирования изменяла профили гормон-зависимой экспрессии генов транскрипционного комплекса пластид и генов пластидного кодирования. Наибольшие отклонения по степени и специфичности регуляции были выявлены для линии *sca3-2*. Реакция мутанта *rpotmp-2* на гормоны, как правило, не отличалась от ответа растений дикого типа. При этом состав и встречаемость предполагаемых *cis*-элементов, связывающих АБК и ЦК-регулируемые *trans*-факторы в промоторах обоих генов и отвечающих за индуцибельность гормонами, варьировали незначительно. Эти результаты соответствуют представлению о главенствующей роли *RPOTr* при разделении функций между *RPOTr* и *RPOTmp* в пластидах.

Известно, что на стадии замачивания семян *RPOTmp* способна транскрибировать оперон *rRNA* с *PC*-промотора, а также с ряда других пластидных промоторов [15–17], однако по мере прорастания основная функция этого фермента смещается в митохондрии. По мнению Тарасенко с соавт. [18], *RPOTmp* у *Arabidopsis* играет более важную роль не в хлоропластах, а в митохондриях, где этот фермент необходим для экспрессии ряда генов, кодирующих субъединицы комплексов I и IV дыхательной цепи (*nad6*, *cox1*, *cob* и *nad3*). Интересно, что согласно данным транскрипционного анализа, приведенным на сайте <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, уровень матриц митохондриальных генов, транскрибируемых *RPOTmp*, достоверно не изменялся в ответ на действие ЦК или АБК. Аналогичный результат был нами получен для транскрибируемого *RPOTmp* гена *cox1*. Согласно литературным данным, митохондриальным полимеразам для эффективной транскрипции *in vivo* необходимы дополнительные *trans*-факторы, способные стабилизировать промоторные комплексы или способствовать высвобождению фермента по окончании синтеза РНК [19]. Можно предположить, что эти *trans*-факторы не регулируются гормонами, в отличие от *trans*-факторов хлоропластов. Подобный механизм активации цитокининами *trans*-факторов хлоропластов был недавно продемонстрирован для сигма-факторов РНК-полимеразы бактериального типа SIG2 и SIG6 [20], с промоторными элементами которых, содержащих GATA-сайты, связывался цитокинин-зависимый *trans*-фактор GNL.

Хотя в целом фенотипические последствия инактивации гена *RPOTmp* были выражены значительно слабее, чем у *sca3-2*, базовые уровни матриц генов сигма-факторов и генов PAP, входящих в ферментный комплекс PEP-A, у *rpotmp* оказались вдвое выше, равно как и экспрессия генов PEP субъединиц. Эта реакция, вероятно, связана с компенсаторным механизмом, позволяющим мутанту усилить PEP-зависимую транскрипцию при отсут-

ствии фермента *RPOTmp*. Добавим также, что, несмотря на замедленное развитие, мутант *rpotmp*, отличался повышенными базовыми уровнями транскриптов хлоропластных генов и параметров флуоресценции. В то же время мутант *sca3-2* имел увеличенный вдвое по сравнению с диким типом базовый уровень экспрессии митохондриального гена *cox1*, транскрибируемого *RPOTmp*. Это доказывает, что функции NEP и PEP не только специфичны, но и взаимозависимы.

Для части исследованных генов у мутанта *sca3-2* мы обнаружили снижение активации при обработке ЦК по сравнению с растениями дикого типа или даже ее отсутствие. К их числу, наряду с пластидными генами, относились некоторые ядерные гены, кодирующие белки, ассоциированные с PEP. Для фотосинтетических генов эта тенденция была выражена как на уровне содержания транскриптов, так и на уровне соответствующих белков (рис. 1, рис. 2). Таким образом, при инактивации гена *RPOTr* цитокинины и АБК могут действовать однонаправлено, оказывая репрессивное воздействие на экспрессию хлоропластных генов. Причины этого явления нуждаются в дополнительных исследованиях. Не исключено, что для ядерных генов подобный биологический ответ был обусловлен механизмами ретроградного сигналинга, который способствовал изменению экспрессии ядерных генов, кодирующих белки PEP комплекса в ответ на дисфункцию хлоропластов у *sca3-2*. При этом репрессивный сигнал, посылаемый дефектными хлоропластами в ответ на действие ЦК или, наоборот, отсутствие позитивного сигнала воспринимались избирательно лишь частью генов аппарата транскрипции. Интересно, что в недавнем исследовании Lidón-Soto с соавт. [11] было показано, что ретроградная передача сигналов из поврежденных органелл в условиях солевого стресса активирует экспрессию NEP. Однако механизм такой индукции не был связан с действием АБК, поскольку в условиях длительного воздействия этого гормона гены NEP у растений Col-0 достоверно подавлялись.

Дисфункция хлоропластов, по-видимому, могла повлечь изменение гормонального статуса мутанта и, как следствие, меньшую чувствительность к действию ЦК, которая, возможно, была связана с повышенным содержанием гормона. Косвенным свидетельством в пользу этого являются данные по экспрессии гена *ARR5* и генов метаболизма ЦК *IPT3*, *IPT5* и *CKX5*, накопление транскриптов которых существенно превышало уровни дикого типа.

Пониженная реакция на действие ЦК могла быть также обусловлена изменением баланса между ЦК и АБК. Согласно данным Hricova с соавт. [10], полученным методом микроципирова-

ния, у мутанта *scabra3-2* была уменьшена экспрессия генов, кодирующих белки изопреноидного пути биосинтеза, включая ген ключевого фермента биосинтеза АБК зеаксантиндегидрогеназы *ABA1*. Для гена *ABA1*, продукт которого локализуется преимущественно в строме и тилакоидных мембранах хлоропластов [21], этот результат был нами подтвержден методом ПЦР-РВ (табл. 2). Кроме того, у *scabra3-2* оказалась снижена базовая экспрессия гена метаболизма АБК *ABA2* и повышен уровень транскриптов гена сигналинга *HAB1*. Таким образом, плейотропный эффект мутации затрагивал не только экспрессию хлоропластного генома, но и оказывал влияние на регуляцию гормональной системы растения. Среди возможных последствий – нарушение синтеза каротиноидов, которые необходимы как для фотосинтезирующих тканей, где они играют фотозащитную роль, так и для нормального прохождения скотоморфогенеза и последующего развития хлоропластов при переходе к фотоморфогенезу [22].

Неоспоримым свидетельством в пользу прямого участия генов *NER* в гормональной регуляции хлоропластных генов могло бы стать изменение их экспрессии при непосредственном связывании гормон-регулируемых *транс*-факторов с промоторной областью генов *NER*. Как показал анализ *in silico* промоторных областей генов *NER*-полимераз, в пределах последовательности в 500 п.н. в направлении 5' от стартового кодона *ATG* содержатся предполагаемые *цис*-элементы для целого ряда АБК и ЦК-регулируемых *транс*-факторов, включая *RAV1*, *DREB/CBF*, *RAP2.6*, *MYB52*, *ATHB12*, *ARR11*, *ARR14* и *GLK1*. Однако ни один из этих *транс*-факторов не обнаружил изменений в уровне экспрессии у *sca3-2*, как следует из данных микрочипирования этого мутанта [10]. Тем не менее, инактивация гена *RPOTr* способствовала изменению сигнала для целого ряда *транс*-факторов, при этом некоторые из них (*MYB47*, *NF-YB2*) в сильной степени индуцировались АБК. Таким образом, гормон-зависимые ответы, регулируемые этими *транс*-факторами, могут быть непрямыми, хотя выявление конкретных участников этого процесса и всех ее компонентов остается задачей для будущих исследований.

Изучение биологической роли ЦК и АБК в функционировании аппарата транскрипции хлоропластов было бы неполным без учета их воздействия на уровень хлоропластных белков. Обработка экзогенной АБК не изменяла содержание этих белков у всех исследованных образцов, что для растений дикого типа и мутанта *rpotmp* соответствовало данным транскрипционного анализа. Однако у мутантной линии *scabra3-2* сохранение уровней хлоропластных белков при подавлении накопления транскриптов кодирующих генов в результате обработки ЦК или АБК могло быть связано с осо-

бенностями их посттранскрипционной регуляции на фоне измененного генетического фона. Не исключено, что подобный эффект был обусловлен нарушениями деградации хлоропластных белков у мутанта *sca3-2*. На это указывает уменьшение в 1.5–2 раза экспрессии генов протеаз *FtsH8*, *FtsH9* и *DEG1*, локализованных в хлоропластах и участвующих в расщеплении пластидных белков [10]. Кроме того, по данным транскриптомного анализа, у мутанта *sca3-2* была в 2–3 раза снижена экспрессия четырех генов E3-убиквитинлигаз (*At5g01880*, *At5g01520*, *At1g57820*, *At1g66050*) [10], связанных с протеасомной деградацией белков. Интересно, что убиквитинлигаза, кодируемая одним из этих генов *AtAIRP2* (*Arabidopsis ABA-insensitive RING protein 2*), причастна к регуляции сигнала АБК, в частности к убиквитинированию ключевых компонентов сигнальной цепи протеинкиназ *SNF1* (*SnRK*) [23], что, наряду с изменением экспрессии генов метаболизма, могло способствовать изменению чувствительности мутанта к действию этого гормона.

Подводя итоги, можно сказать, что гены аппарата транскрипции пластид дифференцированно отвечают на воздействие экзогенных ЦК и АБК. Активация экспрессии или ее ингибирование определяются не только специфичностью действия конкретного гормона, но и нормальным функционированием хлоропластов, контролируемым генетической средой. Инактивация генов пластидных РНК-полимераз ядерного кодирования изменяет профили гормон-зависимой экспрессии активных генов компонентов аппарата транскрипции и хлоропластных генов. При этом наблюдается регуляция как на уровне содержания транскриптов, так и на уровне соответствующих белков.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-14-00065).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Selivankina S.Y., Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Kudryakova N.V., Zubkova N.K., K. Liere K., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V., Börner T. Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves // *Plant Physiol.*, 2008. V. 148. P. 1082.
2. Yamburenko M.V., Zubo Y.O., Vanková R., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N., Börner T. Abscisic acid represses the transcription of chloroplast genes // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 4491.
3. Kusnetsov V.V., Oelmüller R., Sarwat M.I., Porfirova S.A., Cherepneva G.N., Herrmann R.G., Kulaeva O.N. Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons with-

- out notable effect on steady-state mRNA levels // *Planta*. 1994. V. 194. P. 318.
4. *Sherameti I., Shahollari B.M., Westermann M., Cherepneva G., Kusnetsov V., Oelmüller R.* Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplasts of *Lupinus luteus*: the complex accumulates in the inner-envelope membrane with the CF(1) moiety located towards the stromal space // *The Plant Journal*. 2004. V. 38. P. 578.
 5. *Liere K., Weihe A., Börner T.* The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: composition, function, and regulation // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 1345.
 6. *Legen J., Kemp S., Krause K., Profanter B., Herrmann R.G., Maier R.* Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type end PEP-deficient transcription machineries // *Plant J.* 2002. V. 31. P. 171.
 7. *Lerbs-Mache S.* Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? // *Plant Mol. Biol.* 2011. V. 76. P. 235.
 8. *Bychkov I., Kudryakova N., Andreeva A., Pojidaeva E., Kusnetsov V.* Melatonin modifies the expression of the genes for nuclear- and plastid encoded chloroplast proteins in detached *Arabidopsis* leaves exposed to photo-oxidative stress // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019. V. 144. P. 404.
 9. *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 AHK2 and AHK3 in the expression of plastid genes and genes for the plastid transcriptional machinery during senescence // *Plant Molecular Biology*. 2017. V. 93. P. 533.
 10. *Hricová A., Quesada V., Micol J.L.* The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 942.
 11. *Lidón-Soto A., Núñez-Delegido E., Pastor-Martínez I., Robles P., Quesada V.* *Arabidopsis* plastid-RNA polymerase RPOTp is involved in abiotic stress tolerance // *Plants*. 2020. V. 9. P. 834.
 12. *Santiago J., Rodrigues A., Saez A., Rubio S., Antoni R., Dupeux F., Park S.-Y., Márquez J.A., Cutler S.R., Rodriguez P.L.* Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. // *Plant J.* 2009. V. 60. P. 575.
 13. *Wang M., Lee J., Choi B., Park Y., Sim H.J., Kim H., Hwang I.* Physiological and molecular processes associated with long duration of ABA treatment // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 176.
 14. *Yamburenko M., Zubo Y.O., Börner T.* Abscisic acid affects transcription of chloroplast genes via protein phosphatase 2C-dependent activation of nuclear genes: repression by guanosine-3'-5'-bisdiphosphate and activation by sigma factor 5 // *Plant J.* 2015. V. 82. P. 1030.
 15. *Bligny M., Courtois F., Thaminy S., Chang Ch.-Ch., Lagrange Th., Baruah-Wolff J., Stern D., Lerbs-Mache S.* Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases // *The EMBO J.* 2000. V. 19. P. 1851.
 16. *Courtois F., Merendino L., Demarsy E., Mache R., Lerbs-Mache S.* Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the rrn operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 712.
 17. *Swiatecka-Hagenbruch M., Liere K., Börner T.* High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Genet. Genomics*. 2007. V. 277. P. 725.
 18. *Tarasenko V.I., Katyshev A.I., Yakovleva T.V., Garnik E.Y., Chernikova V.V., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M.V.* RPOTmp, an *Arabidopsis* RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 5657.
 19. *Kühn K., Richter U., Meyer E.H., Delannoy E., de Longevialle A.F., Börner T., Millar A.H., Small I., Whelan J.* Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 2762.
 20. *Bastakis E., Hedtke B., Klermund C., Grimm B., Schwechheimer C.* LLM-domain B-GATA transcription factors play multifaceted roles in controlling greening in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2018. V. 30. P. 582.
 21. *Schwarz N.U., Iven T., Brückle L., Melzer M., Feussner I., Jahns P.* Tissue-specific accumulation and regulation of zeaxanthin epoxidase in *Arabidopsis* reflect the multiple functions of the enzyme in plastids // *Plant Cell Physiol.* 2015. V. 56. P. 346.
 22. *Barrero J.M., Piqueras P., González-Guzmán M., Serano R., Rodríguez P.L., Ponce M.R., Micol J.L.* A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis* highlights the involvement of ABA in vegetative development // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 2071.
 23. *Cho S.K., Ryu M.Y., Seo D.H., Kang B.G., Kim W.T.* The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP2 plays combinatory roles with AtAIRP1 in abscisic acid-mediated drought stress responses // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 2240.

ВЛИЯНИЕ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ВОДНЫЙ ОБМЕН ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

© 2021 г. М. В. Безрукова^а, *, Г. Р. Кудоярова^б, А. Р. Лубянова^а,
Д. Р. Масленникова^а, Ф. М. Шакирова^а

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

^бУфимский институт биологии — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: mbezrukova@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2020 г.

После доработки 04.06.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

Исследовали влияние предпосевной обработки 0.4 мкМ концентрации 24-эпибрассинолида (ЭБ) на показатели водного обмена и рост листьев в условиях осмотического стресса, моделируемого 5% маннитом, у двух контрастных сортов мягкой пшеницы Омская 35 (Ом-35 — засухоустойчивый) и Салават Юлаев (СЮ — менее засухоустойчивый) на пятые и седьмые сутки прорастания. Выявлено, что предобработка ЭБ снижала дефицит воды на фоне маннита, что в большей степени проявлялось у сорта Ом-35, чем у менее устойчивого сорта СЮ. Компенсация к седьмым суткам влияния осмотического стресса у сорта Ом-35 происходила за счет меньшей степени увеличения площади листьев, что приводило к меньшей потере воды в результате транспирации, снижению осмотического потенциала за счет более высокого накопления осмопротектанта пролина, а также уменьшению негативного действия на экзосмос электролитов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, водный обмен, выход электролитов, маннит, осмотический стресс, пролин, 24-эпибрассинолид

DOI: 10.31857/S0015330321010048

ВВЕДЕНИЕ

Современные глобальные климатические изменения влияют на урожайность, изменяя погодные условия и усиливая экологическую напряженность. Однако неблагоприятное воздействие на рост и метаболизм растений можно смягчить путем экзогенного применения различных веществ, стимулирующих рост, включая брассиностероиды (БС). БС являются важными регуляторами роста и развития растений, что проявляется как в оптимальных, так и стрессовых условиях. Для повышения стрессоустойчивости БС, действуя в очень низких концентрациях при обработке, проявляют множественные эффекты, активно участвуя в таких процессах, как фотосинтез, метаболизм антиоксидантов и азотный обмен, накопление осмолитов и взаимоотношения растений с водой в стрессовых условиях, индукция защитных белков (дегидри-

нов, аквапоринов, лектинов, белков теплового шока) [1–6]. Продемонстрировано, что растения с нарушенным синтезом БС проявляют аномалии в фенотипах развития и основных путях передачи сигналов, регулирующих эти процессы [7].

Переключение генетических программ с оптимальных на стрессовые и включение защиты на уровне целого организма осуществляется в растениях сбалансированно. В условиях обезвоживания, когда стрессовые реакции и рост конкурируют за ресурсы, очень важно, чтобы в ходе активации стрессовых реакций сохранялась способность дальнейшего роста и развития растений. Так, обнаружено, что брассинолид-специфический фактор транскрипции BES1 и являющийся членом семейства транскрипционных факторов NAC RD26 (индуцируемый в условиях абиотического стресса для повышения устойчивости к засухе) способны взаимодействовать и одновременно связываться с одним и тем же промоторным элементом, где они нейтрализуют активность друг друга на генах-мишенях BES1 [8]. Таким обра-

Сокращения: БС — брассиностероиды; Ом-35 — сорт пшеницы Омская 35, ОСВ — относительное содержание воды; СЮ — сорт пшеницы Салават Юлаев, ЭБ — 24-эпибрассинолид.

зом, сигнальные пути брассинолида и засухи сходятся при взаимодействии брассинолид-специфического фактора транскрипции BES1 и RD26 на общем промоторном элементе, что приводит к инактивации BES1, обеспечивая правильный баланс роста и стресса [9].

В настоящее время наиболее изучаемой и дискутируемой областью исследования БС являются молекулярные механизмы, связанные со стабилизацией состояния аскорбата и глутатиона, изменением активности антиоксидантных ферментов и накоплением осмопротекторов в растениях, снижением перекисного окисления липидов в клеточных мембранах, подвергнутых влиянию различных стрессовых факторов, а также эффективностью взаимодействия БС с другими фитогормонами в осуществлении протекторного действия [6, 10]. Дальнейшее исследование способности БС в норме и при стрессе регулировать такие процессы, как фотосинтез и дыхание, азотный метаболизм, водный баланс, а также осмотическую регуляцию и систему антиоксидантной защиты позволит прояснить их роль в проявлении рострегулирующего и антистрессового эффектов.

Ранее нами показано, что предобработка растений пшеницы 24-эпибрассинолидом (ЭБ) уменьшает степень ингибирования роста их корней при прорастании на фоне осмотического стресса, вызванного добавлением в питательный раствор маннита [2]. Защитное действие ЭБ на проростки пшеницы связывали с накоплением низкомолекулярных дегидринов, снижением уровня стресс-индуцированного накопления в корнях агглютинаина зародыша пшеницы и изменением гормонального баланса растений. Обнаружено, что применение ЭБ предотвращает вызываемое засухой ингибирование митотического индекса, причем агглютинин зародыша пшеницы, выделяемый в корневую среду и способный оказывать протекторный эффект на деление клеток апикальной меристемы корней, вероятно, значительно содействует такому эффекту [5]. Однако в этих экспериментах недостаточно внимания уделено водному обмену растений при действии осмотического стресса на предобработанные ЭБ проростки, чему и посвящена данная работа. Изучено влияние

предпосевной обработки семян ЭБ и их последующего проращивания на среде с маннитом на транспирацию, оводненность и относительное содержание воды, осмотический потенциал и содержание пролина в листьях двух сортов пшеницы, различающихся по устойчивости к дефициту воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Эксперименты проводились на мягкой яровой пшенице (*Triticum aestivum* L.) сортов Омская 35 (засухоустойчивый сорт) и Салават Юлаев (менее засухоустойчивый сорт). Поверхность зерна стерилизовали 96% спиртом в течение 1 мин, а затем несколько раз промывали дистиллированной водой.

Предпосевную обработку 24-эпибрассинолидом проводили путем замачивания семян в 0.4 мкМ растворе в течение трех часов и последующего высушивания до воздушно-сухого состояния. Необработанные фитогормоном семена замачивали в дистиллированной воде. Предварительно обработанные или необработанные ЭБ семена проращивали в лотках на фильтровальной бумаге, смоченной водопроводной водой, содержащей 5% маннита. Каждый день раствор меняли на свежий, при температуре 22–24°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 160 мкмоль/(м² с) ФАР. Контрольные проростки инкубировали на водопроводной воде.

Площадь листьев. Оценку площади (см²) сканированных изображений листьев проводили с использованием программы ImageJ v.1.48 (W. Rasband, “National Institute of Mental Health”, США).

Оводненность. Материал взвешивали сразу после отбора проб, сушки в открытых контейнерах, которые обеспечивают свободную циркуляцию воздуха, при температуре 70°C. Повторное взвешивание проводили через 24 часа после достижения постоянного веса при двух последовательных взвешиваниях. Содержание воды в листьях рассчитывали по формуле: оводненность = [(сырая масса - сухая масса)/сырая масса] × 100%.

Относительное содержание воды (ОСВ) в листьях рассчитывали по формуле:

$$\text{ОСВ} = \left[\frac{\text{сырая масса} - \text{сухая масса}}{\text{масса при полном тургоре} - \text{сухая масса}} \right] \times 100\%.$$

Сырую массу определяли сразу после отделения листьев от растения. Для определения тургорной массы листья помещали при комнатной температуре на 24 ч в темноту в закрытые сосуды, погружая основанием в дистиллированную воду [11]. После определения массы при полном тургоре листья высушивали и рассчитывали ОСВ.

Транспирацию определяли весовым методом (анализируя потерю массы стаканчика с проростками в питательном растворе, поделенную на время между измерениями и количество проростков) [12]. Для предотвращения испарения жидкости с поверхности сосудов проростки закрывали алюминиевой фольгой.

Таблица 1. Влияние предпосевной обработки 0.4 мкМ ЭБ на площадь листьев 7-дневных проростков пшеницы, выращенных на 5% манните

Сорт	Площадь листьев, см ²			
	контроль	(ЭБ)	маннит	(ЭБ) + маннит
Омская 35	3.66 ± 0.16 ^e	4.94 ± 0.18 ^f	1.59 ± 0.10 ^c	2.20 ± 0.11 ^d
Салават Юлаев	4.56 ± 0.20 ^f	5.08 ± 0.24 ^f	0.74 ± 0.06 ^a	1.20 ± 0.09 ^b

Примечание. Достоверно отличающиеся значения ($n = 30$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

Образцы для измерения **осмотического потенциала** были получены путем замораживания и оттаивания тканей листьев и последующего центрифугирования. Осмотический потенциал полученного клеточного сока измеряли с помощью цифрового микроосмометра (“Camlab Ltd.”, Cambridge, Великобритания).

Экстракцию и определение **содержания свободного пролина** в проростках проводили с помощью кислого нингидринового реактива [13], измеряя оптическую плотность растворов на спектрофотометре (SmartSpec Plus, “Bio-Rad”, США) при 520 нм.

Проницаемость мембран оценивалась по выходу электролитов [14]. После промывки навеску проростков 1 г нарезали и инкубировали в 20 мл дистиллированной воды при 27°C в течение 1 часа. После фильтрации изменение электропроводности растворов измеряли с помощью кондуктометра ОК-102/1 (“Radelkis”, Венгрия).

Статистический анализ. Показатели водного обмена, содержание пролина и выход электролитов определяли на 5 и 7 день прорастания. Вычисляли среднеарифметические величины 3–5 независимых экспериментов и их стандартные ошибки SE ($n = 12$ в случае анализа свободного пролина и выхода электролитов, $n = 30$ – площади листьев, $n = 20$ в остальных случаях). Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа в Microsoft Office Excel 2010. Статистическую значимость различий между средними значениями анализировали с помощью t -теста. Достоверно различающиеся между собой величины каждого показателя (при $P < 0.05$) обозначены разными буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У растений пшеницы сорта Омская 35 (Ом-35) площадь листьев на фоне осмотического стресса была более чем в 2 раза меньше относительно контрольных условий прорастания (табл.). Площадь листьев растений сорта Салават Юлаев (СЮ) в норме была на 20% больше, чем у Ом-35, но при этом под влиянием стресса она уменьшалась в большей степени (в 5 раз по сравнению с контро-

лем, т.е. растениями пшеницы СЮ, произрастающими в нормальных условиях).

Осмотический стресс снижал содержание воды в растениях на 3–5% в зависимости от возраста (рис. 1). На седьмой день прорастания наблюдалась тенденция незначительного увеличения оводненности на фоне стресса. На пятые сутки в присутствии маннита содержание воды предобработанных ЭБ растений обоих сортов было на 3% выше, чем у необработанных, но на седьмые сутки прорастания различия нивелировались из-за повышения оводненности у необработанных ЭБ растений. Определение ОСВ позволило оценить дефицит водонасыщенности в растениях (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что на фоне осмотического стресса дефицит воды у исследованных сортов составлял 20–25% на пятые сутки прорастания и 15–18% на седьмые сутки. Предобработка семян ЭБ снижала дефицит воды на фоне маннита, что проявлялось у пшеницы Ом-35 раньше и в большей степени, чем у СЮ (до 11.6% и 15.7% к седьмым суткам соответственно).

Уровень транспирации был в полтора раза выше у растений Ом-35, чем у СЮ (рис. 3). В отсутствие осмотического стресса предобработка ЭБ приводила к повышению уровня транспирации на 6% у пшеницы сорта Ом-35, при этом значимых отличий от контрольных значений у сорта СЮ не наблюдали. Осмотический стресс, вызванный присутствием в среде маннита, приводил к резкому снижению уровня транспирационных потерь воды у обоих сортов; он был на пятые сутки в два раза, а на седьмые – в полтора раза ниже у необработанных ЭБ растений. Предпосевная обработка ЭБ существенно увеличивала транспирацию у стрессированных растений, что более выражено у растений Омской 35, у которых на седьмой день данный показатель был на уровне растений, росших в оптимальных условиях.

Нарушение водного режима сопровождалось накоплением осмотически активных веществ в растениях, о чем свидетельствовало уменьшение осмотического потенциала в полтора-два раза (для сорта Ом-35 в большей степени), на пятые сутки (рис. 4). Предобработка ЭБ не влияла на осмотический потенциал в оптимальных условиях.

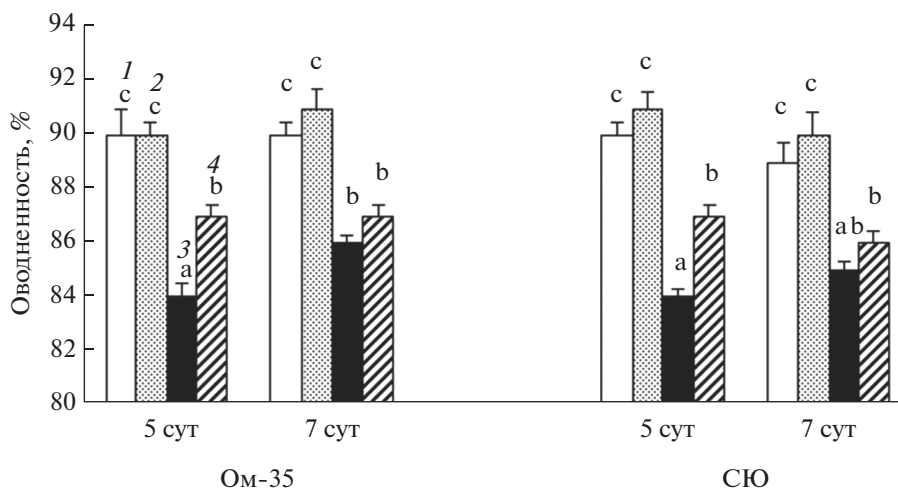


Рис. 1. Влияние предпосевной обработки 0.4 мкМ ЭБ на изменение оводненности листьев пшеницы сорта Ом-35 и СЮ на пятые и седьмые сутки прорастания в условиях осмотического стресса. 1 – контроль, 2 – предпосевная обработка ЭБ, 3 – проращивание на 5% манните, 4 – предпосевная обработка ЭБ и последующее проращивание на 5% манните. Достоверно отличающиеся значения ($n = 20$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

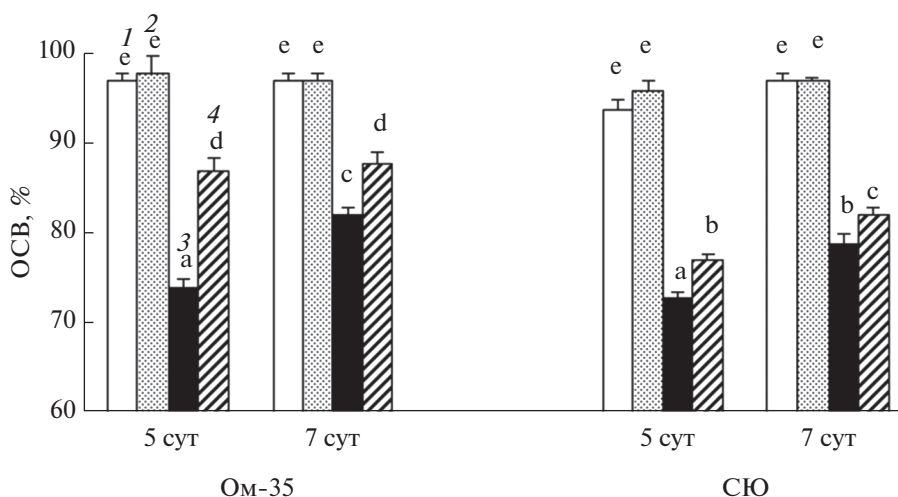


Рис. 2. Эффект предпосевной обработки 0.4 мкМ ЭБ на ОСВ в листьях пшеницы сорта Ом-35 и СЮ при воздействии 5% маннита. 1 – контроль, 2 – предпосевная обработка ЭБ, 3 – проращивание на 5% манните, 4 – предпосевная обработка ЭБ и последующее проращивание на 5% манните. Достоверно отличающиеся значения ($n = 20$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

Показатель осмотического потенциала растений сорта Ом-35, семена которых прошли предобработку ЭБ, был выше на фоне стресса, чем у стрессированных растений как на пятые, так и на седьмые сутки прорастания. У сорта СЮ осмотический потенциал предобработанных ЭБ листьев не отличался от подвергнутых стрессу растений.

Содержание пролина в растениях (рис. 5) не менялось под влиянием ЭБ в оптимальных условиях, но возрастало при стрессе более чем в 2 раза. В предобработанных ЭБ растениях на фоне маннита уровень пролина был вдвое ниже, чем необработанных; вместе с тем, следует отметить, что

его концентрация у обоих сортов все же была на 50% выше контрольного значения.

Выход электролитов на пятые сутки увеличился под влиянием осмотического стресса (рис. 6) почти на 50% у СЮ и на 30% у Ом-35. На седьмые сутки прорастания этот показатель снижался относительно контроля, однако у сорта СЮ по-прежнему сохранялся на более высоком уровне. На пятые сутки растения исследованных сортов, семена которых подвергались предобработке ЭБ, сохраняли экзоосмос электролитов на уровне контроля в условиях стресса. На седьмые сутки этот показатель сохранял у обоих сортов промежуточный

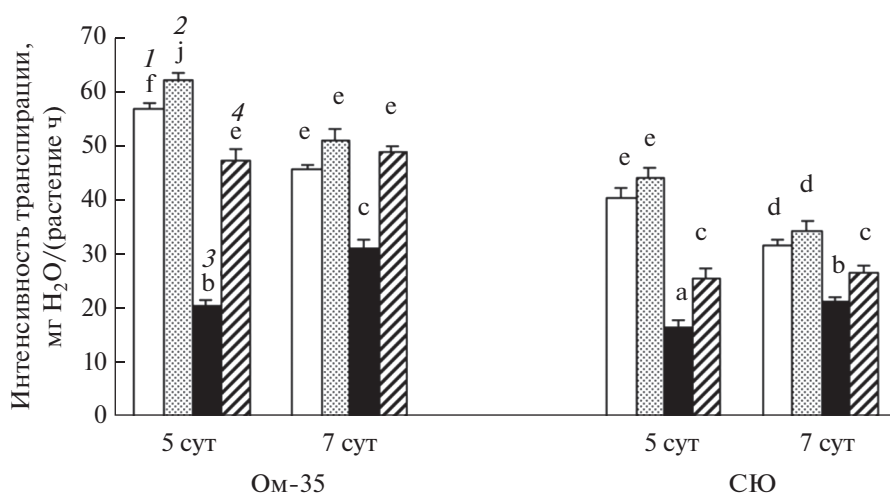


Рис. 3. Интенсивность транспирации растений сорта Ом-35 и Сю на пятые и седьмые сутки, выращенных из предобработанных и необработанных 0.4 мкМ ЭБ семян в условиях осмотического стресса. 1 – контроль, 2 – предпосевная обработка ЭБ, 3 – проращивание на 5% манните, 4 – предпосевная обработка ЭБ и последующее проращивание на 5% манните. Достоверно отличающиеся значения ($n = 20$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

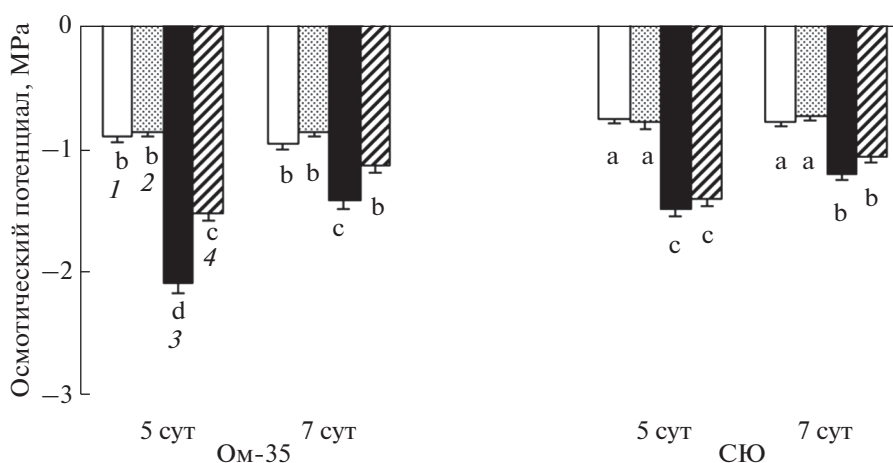


Рис. 4. Влияние предпосевной обработки семян 0.4 мкМ ЭБ на осмотический потенциал листьев пшеницы сорта Ом-35 и Сю при воздействии 5% маннита. 1 – контроль, 2 – предпосевная обработка ЭБ, 3 – проращивание на 5% манните, 4 – предпосевная обработка ЭБ и последующее проращивание на 5% манните. Достоверно отличающиеся значения ($n = 20$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

уровень между росшими на манните и необработанными фитогормонами стрессированными проростками.

ОБСУЖДЕНИЕ

Осмотический стресс негативно влиял на растения, снижая их оводненность (рис. 1) и уменьшая ОСВ (рис. 2). Дефицит водонасыщенности проявлялся в ингибировании роста проростков, приводившего к уменьшению площади листьев (табл.). Сопутствующий оксидативный стресс также нарушал целостность мембран – индикатором этого процесса служило увеличение выхода элек-

тролитов (рис. 5). Данные эффекты заметнее проявлялись у растений сорта Сю, что свидетельствует о более низком уровне их устойчивости к действию осмотика. Растения, выросшие из семян, обработанных ЭБ, проявляли высокую степень устойчивости к обезвоживанию, о чем можно было судить по большей площади их листьев на фоне маннита и меньшему уровню выхода электролитов. Важно было выяснить, какие особенности водного обмена у этих растений способствовали повышению их устойчивости.

Накопление осмотически активных веществ является одним из механизмов, обеспечивающих защиту растений от осмотического стресса [15], в

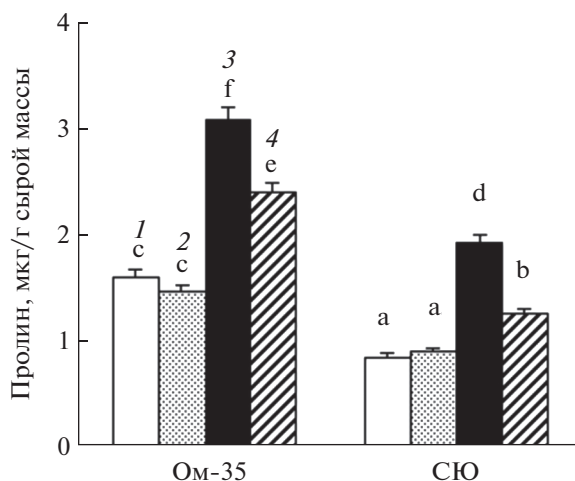


Рис. 5. Эффект предпосевной обработки 0.4 мкМ ЭБ на содержание свободного пролина в 7-дневных проростках Ом-35 и СЮ в условиях осмотического стресса, моделируемого 5% маннитом. 1 – контроль, 2 – предпосевная обработка ЭБ, 3 – проращивание на 5% манните, 4 – предпосевная обработка ЭБ и последующее проращивание на 5% манните. Достоверно отличающиеся значения ($n = 12$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

частности, вызванного добавлением маннита в питательный раствор. На фоне стресса наблюдалось резкое снижение осмотического потенциала (рис. 4), максимально проявляющееся в листьях пшеницы сорта Ом-35, что свидетельствует о накоплении осмотиков. Определенный вклад в этот процесс вносил пролин, концентрация которого также повышалась в присутствии маннита (рис. 5). Ранее выявлено АБК-независимое накопление

этого осмопротектанта под влиянием ЭБ в нормальных условиях произрастания и связь накопления пролина с повреждением растений пшеницы при солевом стрессе [16], а также показано более высокое содержание пролина в солеустойчивых сортах ячменя по сравнению с солеустойчивыми сортами при засолении [17]. Сорт Ом-35 эффективнее справлялся со стрессом, чем СЮ. Наблюдалась компенсация воздействия стресса на осмотический статус побегов: разность осмотических потенциалов между подвергнутыми стрессу и контрольными растениями у проростков Ом-35, предобработанных ЭБ, была ближе к контролю, особенно на седьмые сутки прорастания, в отличие от менее устойчивого сорта СЮ. Известно, что пролин участвует в стабилизации антиоксидантных ферментов [18]. Повышенное содержание пролина у предобработанных ЭБ проростков по сравнению с контролем придает устойчивость растениям пшеницы при осмотическом стрессе наряду с накоплением антиоксидантов, а пониженное содержание пролина у необработанных ЭБ проростков на фоне стресса свидетельствует скорее об уменьшении повреждающего действия маннита. Выявленное нами ранее небольшое обратимое усиление генерации супероксид радикала под влиянием ЭБ и одновременно с этим повышение активности супероксиддисмутазы, катализирующей реакцию его дисмутации в H_2O_2 [16], вносит свой вклад в преадаптацию растений и, вероятно, способствует сохранению целостности мембранных структур клеток при стрессе за счет предотвращения процессов перекисного окисления липидов. О стабилизации проницаемости мембран клеток под влиянием ЭБ при стрессе свидетельствуют данные по предот-

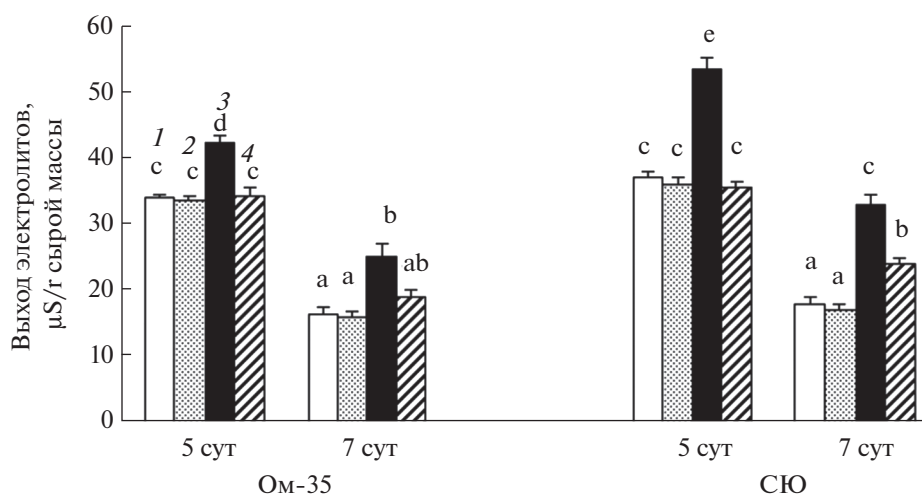


Рис. 6. Выход электролитов в предобработанных и необработанных 0.4 мкМ ЭБ проростках пшеницы сорта Ом-35 и СЮ, выращенных на 5% манните. 1 – контроль, 2 – предпосевная обработка ЭБ, 3 – проращивание на 5% манните, 4 – предпосевная обработка ЭБ и последующее проращивание на 5% манните. Достоверно отличающиеся значения ($n = 12$) на уровне $P < 0.05$ обозначены разными буквами.

вращению негативного действия осмотического стресса на экзоосмос электролитов в предобработанных ЭБ проростках (рис. 6), что способствовало улучшению параметров роста [2]. Пониженный уровень осмотиков у обработанных ЭБ растений мог быть также следствием более высокой оводненности этих растений на фоне стресса (рис. 1). Кроме того, поддержание более высокой скорости роста под влиянием ЭБ неизбежно сопровождалось расходом сахаров на рост, что могло привести к их нехватке для поддержания осмолальности клеток.

Еще один важный механизм адаптации растений к дефициту воды, вызванному присутствием маннита в питательной среде, заключается в снижении транспирации, которая достигается как за счет уменьшения площади листьев, через которые происходит испарение воды, так и за счет закрывания устьиц. Уменьшение транспирационных потерь компенсирует пониженное поступление воды из питательного раствора, в котором присутствуют осмотики [19]. Кроме того, уменьшение площади листьев снижает их способность поглощать свет и тем самым отрицательно сказывается на фотосинтезе. Не удивительно, что в наших экспериментах уменьшение площади листьев (табл.) в результате осмотического стресса сопровождалось снижением накопления сухой массы растений и, очевидно, было его причиной, что указывает на ингибирование фотосинтеза. (Ранее нами описано влияние маннита на сухую массу растений в тех же условиях [2]). Напротив, увеличение площади листьев у обработанных ЭБ растений сопровождалось не только увеличением транспирации (рис. 3) по сравнению с контрольными, но и накоплением сухой массы. Сухая масса листьев у обоих исследованных сортов, выращенных из предобработанных ЭБ семян, к седьмым суткам стресса уменьшалась по сравнению с растениями, которые росли в отсутствие осмотического стресса, в меньшей степени, чем у стрессированных необработанных ЭБ растений – на 9% для Ом-35 и 20% для СЮ, по сравнению с 24% и 39% у необработанных ЭБ стрессированных растений, соответственно.

Увеличение транспирации у растений СЮ под влиянием ЭБ в стрессовых условиях можно связать с большей площадью листьев растений. Однако эта связь не прослеживается в случае Ом-35. У растений этого сорта площадь листьев была меньше, чем в контроле, а по уровню транспирации растения не были близки к контролю. Эти результаты указывают на роль еще одного фактора в повышении транспирации под влиянием ЭБ. Этим фактором является повышение устьичной проводимости. Открытие устьиц могло не только способствовать повышению транспирации, но и поддержанию более высокой скорости фотосинтеза у растений сорта Ом-35 на фоне осмотиче-

ского стресса. Ведь последний процесс напрямую зависит от поступления через устьица углекислого газа.

Что же могло быть причиной повышения устьичной проводимости у растений сорта Ом-35 под влиянием ЭБ? Показано, что кратковременное воздействие БС приводит к закрытию устьиц [20]. Однако при длительной обработке растений препаратом БС устьичная проводимость возрастает [21]. Важно то, что у растений Ом-35 (в отличие от СЮ) ЭБ предотвращал снижение уровня цитокининов [2], а эти гормоны, как известно, поддерживают устьица в открытом состоянии [22]. Цитокинины также играют важную роль в поддержании роста листьев [23].

Таким образом, ускорение роста листьев и повышение устьичной проводимости могли играть важную роль в увеличении устойчивости растений пшеницы к осмотическому стрессу у растений, обработанных ЭБ. Значительный вклад в эффект ЭБ при стрессе вносит накопление пролина и влияние этого фитогормона на редокс-статус растений пшеницы.

Как правило, обсуждение механизма регуляции водного обмена при стрессе ограничивается реакцией устьиц. Вместе с тем, само по себе поддержание устьиц в открытом состоянии может привести к снижению оводненности растений в условиях дефицита воды. Однако этого мы не наблюдали в экспериментах, где обработка ЭБ не только не снижала оводненности листьев в условиях стресса, но даже способствовала ее повышению, несмотря на повышенный уровень транспирации. Эти результаты свидетельствуют о том, что ЭБ положительно влияет на способность растений поглощать воду, компенсируя возросшие транспирационные потери. Это могло происходить за счет активации роста и развития корней [2]. Альтернативное объяснение может заключаться во влиянии ЭБ на гидравлическую проводимость корней. Известно, что БС могут влиять на активность аквапоринов [24]. Полученные нами результаты указывают на весьма важную роль, которую БС могут играть в регуляции гидравлической проводимости растений, обеспечивая тем самым поддержание их роста и оводненности в условиях дефицита воды. Они также свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния ЭБ на способность корней поглощать и проводить воду.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что накопление осмолитов и стабилизация мембран, обусловленная, вероятно, снижением уровня процессов перекисного окисления липидов, обеспечивают защитный эффект ЭБ на показатели водного обмена и стимуляцию роста листьев в

условиях осмотического стресса. О более успешном преодолении воздействия осмотического стресса в ЭБ преобработанных растениях устойчивого сорта Ом-35 свидетельствует компенсация воздействия маннита на осмотический статус и ОСВ, незначительное снижение транспирации на фоне стресса и, как результат, меньшая степень снижения сухой массы, чем у неустойчивого сорта СЮ.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А16-116020350029-1) с привлечением приборного парка Центра коллективного пользования “Биомика” (Отделение биохимических методов 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. Ефимова М.В., Савчук А.Л., Хасан Дж.А.К., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов В.В. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса брассиностероидами // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 778. <https://doi.org/10.7868/S0015330314060050>
2. Shakirova F., Allagulova Ch., Maslennikova D., Fedorova K., Yuldashev R., Lubyanova A., Bezrukova M., Avalbaev A. Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress // PPB. 2016. V. 108. P. 539. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.013>
3. Ahanger M.A., Ashraf M., Bajguz A., Ahmad P. Brassinosteroids regulate growth in plants under stressful environments and crosstalk with other potential phytohormones // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 1007. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9855-2>
4. Kaur N., Pati P.K. Harnessing the potential of brassinosteroids in abiotic stress tolerance in plants // Brassinosteroids: plant growth and development / Eds. Hayat S. et al. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. P. 407. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6058-9_15
5. 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.
6. Nolan T.M., Vukašinović N., Liu D., Russinova E., Yin Y. Brassinosteroids: multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses // Plant Cell. 2020. V. 32. P. 295. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
7. Clouse S.D. Brassinosteroid/abscisic acid antagonism in balancing growth and stress // Dev. Cell. 2016. V. 38. P. 118. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.005>
8. Chung Y., Kwon S.I., Choe S. Antagonistic regulation of Arabidopsis growth by brassinosteroids and abiotic stresses // Mol. Cells. 2014. V. 37. P. 795. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0127>
9. Nolan T., Chen J., Yin Y. Cross-talk of brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses // Biochem. J. 2017. V. 474. P. 2641. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160633>
10. Janeczko A. Brassinosteroids in cereals – presence, physiological activity and practical aspects // Brassinosteroids: plant growth and development / Eds Hayat S. et al. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. P. 59. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6058-9_3
11. Pardossi A., Vernieri P., Tognoni F. Involvement of abscisic acid in regulating water status in *Phaseolus vulgaris* L. during chilling // Plant Physiol. 1992. V. 100. P. 1243. <https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1243>
12. Шарунова Г.В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Тимергаллин М.Д., Wilkinson S. Влияние ингибитора рецепции этилена на рост, водный обмен и содержание абсцисовой кислоты у растений пшеницы при дефиците воды // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 619.
13. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205.
14. Bezrukova M., Kildibekova A., Shakirova F. WGA reduced the level of oxidative stress in wheat seedlings under salinity // Plant Growth Regul. 2008. V. 54. P. 195. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9248-1>
15. Zhang J., Nguyen H.T., Blum A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 291. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.332.291>
16. Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Maslennikova D.R., Yuldashev R.A., Allagulova Ch.R., Lastochkina O.V. Hormonal intermediates in the protective action of exogenous phytohormones in wheat plants under salinity // Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants / Eds Khan N.A. et al. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. P. 185. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25829-9_9
17. Kosová K., Vítámvás P., Hlaváčková I., Urban M.O., Vlasáková E., Prášil I.T. Responses of two barley cultivars differing in their salt tolerance to moderate and high salinities and subsequent recovery // Biol. Plantarum. 2015. V. 59. P. 106. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0465-y>
18. Bose J., Rodrigo-Moreno A., Shabala S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1241. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert430>
19. Jia W., Zhang J. Stomatal movements and long-distance signaling in plants // Plant Signal Behav. 2008. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.6294>
20. Haubrick L.L., Torsethaugen G., Assmann S.M. Effect of brassinolide, alone and in concert with abscisic acid, on control of stomatal aperture and potassium currents of *Vicia faba* guard cell protoplasts // Physiol. Plant.

2006. V. 128. P. 134.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00708.x>
21. Hayat S., Alyemeni M.N., Hasan S.A. Foliar spray of brassinosteroid enhances yield and quality of *Solanum lycopersicum* under cadmium stress // Saudi Journal of Biological Sciences. 2012. V. 19. P. 325.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.03.005>
22. Davies W.J., Kudoyarova G., Hartung W. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought // J. Plant Growth Regul. 2005. V. 24. P. 285.
23. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2532.
<https://doi.org/10.1105/tpc.014928>
24. Morillon R., Catterou M., Sangwan R.S., Sangwan B.S., Lassalles J.P. Brassinolide may control aquaporin activities in *Arabidopsis thaliana* // Planta. 2001. V. 212. P. 199.
<https://doi.org/10.1007/s004250000379>

СТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ЛЕКТИНОВ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *Azospirillum* НА ВСХОЖЕСТЬ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ СМОДЕЛИРОВАННЫХ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ

© 2021 г. С. А. Аленькина^а, *, В. Е. Никитина^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

*e-mail: alenkina_s@ibppm.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 04.06.2020 г.

Принята к публикации 05.06.2020 г.

Впервые получены данные о влиянии лектинов двух штаммов азоспирилл — *Azospirillum brasilense* Sp7 (эпифит) и *Azospirillum brasilense* Sp245 (эндофит) на всхожесть и ростовые характеристики растения-хозяина при абиотических стрессах, установлен диапазон оптимальных концентраций и оценен возможный защитный и ростстимулирующий эффект, оказываемый данными гликопротеинами. В результате проведенных исследований было показано, что лектины *A. brasilense* Sp7 и Sp245 с различной эффективностью нивелировали отрицательное воздействие смоделированных абиотических стрессов — тяжелых металлов (CuSO_4 , CoSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), гипо-, гипертермического стресса, засоления и засухи, вызывающих снижение всхожести семян. Для обоих штаммов наиболее выраженный эффект в отношении всхожести наблюдался в случае воздействия тяжелыми металлами. Обнаружено положительное влияние лектинов на морфометрические параметры корней проростков пшеницы. Результаты продемонстрировали стимулирующее воздействие лектинов на длину и количество корней. Лектин эндофитного штамма проявлял более высокую эффективность, выражающуюся в более высоком уровне эффекта и в меньших концентрациях по сравнению с лектином эпифитного штамма.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, ассоциативные бактерии, лектины, оптимальные концентрации, пшеница, ростстимулирующая активность, абиотические стрессы

DOI: 10.31857/S0015330321010024

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур, эффективное и ограниченное использование удобрений и средств защиты растений, а также повышение устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным агроклиматическим условиям и антропогенным воздействиям являются актуальными вопросами современного сельского хозяйства. Одно из важных направлений — поиск продуцентов биопрепаратов нового поколения с ярко выраженными комплексными свойствами (ростстимулирующими, стресспротекторными). Подобные исследования будут способствовать разрешению проблем не только получения экологически безопасных агропродуктов, но и повышению экологической устойчивости агроэкосистем.

Перспективным в этом плане является углубленное изучение свойств бактерий *Azospirillum*. В ризосфере злаковых эти бактерии формируют

высокоэффективные ассоциации, оказывающие стимулирующий эффект на рост и развитие растений, включая пшеницу. Однако детали этого взаимодействия пока остаются не до конца известными. В природе они могут колонизировать как поверхность, так и внутренние ткани корней растений, и образование подобных симбиозов приводит к повышению продуктивности злаковых [1–3].

Известно, что положительное воздействие бактерий рода *Azospirillum* на рост, развитие и урожайность растений носит многофакторный характер. В этой связи значимыми признаками считаются не только высокая азотфиксирующая активность, способность к продукции фитогормонов, фунгицидная и бактерицидная активность, но также синтез высокомолекулярных биологически активных веществ [3, 4]. К таким веществам относятся лектины — (глико)протеины, связывающие строго определенные углеводные группы на поверхности клетки-мишени. С поверхности двух

отличающихся по способу колонизации растений штаммов ассоциативных азотфиксирующих бактерий – *A. brasilense* Sp7 (эпифит) и *A. brasilense* Sp245 (эндофит) – были изолированы лектины, являющиеся гликопротеинами с различными молекулярными массами и углеводной специфичностью [5, 6].

Накопившийся обширный массив экспериментальных данных по лектинам азоспирилл позволяет говорить о полифункциональности этих белков. Лектины способны не только обратимо и специфически связываться с клетками-мишенями, но и быть биологически активными веществами, способными вызывать клеточные ответы в низких концентрациях. Этот факт нашел подтверждение в наших предыдущих исследованиях [7–13]. Были получены данные, подтверждающие способность лектинов изменять содержание стрессовых метаболитов в растительной клетке [14, 15]. Последнее свидетельствует о способности лектинов выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы.

Цель работы – сравнительное исследование влияния лектинов эпифитного штамма *A. brasilense* Sp7 и эндофитного штамма *A. brasilense* Sp245 на всхожесть и изменение ростовых процессов путем регистрации морфометрических характеристик корней проростков растения-хозяина при смоделированных абиотических стрессах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы и условия культивирования. Объектом исследования служили два штамма азотфиксирующих ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* – *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145) и *A. brasilense* Sp245 (IBPPM 219) – из коллекции микроорганизмов И Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (<http://collection.ibppm.ru>).

Получение препаратов лектинов. Выделение лектинов с поверхности клеток бактерий проводили методом Эшдата [16]. Очистку изучаемых белков осуществляли гель-фильтрацией на колонке (30 × 2.2 см) с сефадексом G-75 (диаметр частиц 40–120 мкм). Выход белковых фракций фиксировали на приборе Uvicord S11 (LKB) при $\lambda = 278$ нм. В качестве элюентов использовали 0.1 М CH_3COOH (рН 4.8), а также 0.05 М фосфатный буфер (рН 7.0), содержащий 0.15 М NaCl. Скорость потока – 1.5 мл/мин. Лектиновую активность определяли реакцией агглютинации, используя 2% суспензию трипсинизированных кроличьих эритроцитов. Лектин *A. brasilense* Sp7 имел молекулярную массу 36 кДа и проявлял специфичность к L-фукозе (1.87 мМ) и D-галактозе (20 мМ). Лектин *A. brasilense* Sp245 проявлял сродство к собствен-

ному полисахариду – кислому D-рамнану и имел молекулярную массу 67 кДа.

Определение концентрации белка. Количество белка определяли по методу Бредфорд [17].

Стерилизация семян, получение корней проростков. Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29 (ГНУ НИИ Сельского хозяйства Юго-Востока РСХА, Саратов, Россия) были поверхностно стерилизованы в 70% (v/v) этаноле 1 мин, отмыты многократно стерильной водой.

Для лабораторного моделирования условий загрязнения тяжелыми металлами, гипо-, гипертермии, засоления и засухи семена пшеницы проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге с добавлением лектинов (концентрация 5–40 мкг/мл; использованные концентрации были подобраны в предварительных экспериментах) и солей тяжелых металлов – CoSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CuSO_4 (концентрация 1 мМ), 1% NaCl и 5% сахарозы (наиболее используемый метод оценки устойчивости растений к дефициту влаги). Для анализа действия гипо- и гипертермии на показатели развития зерна пшеницы выращивали в среде с добавлением лектинов при температуре 5 и 42°C, соответственно. В качестве контроля выступали корни проростков, выращенные на дистиллированной воде при 25°C. Объем выборки составлял 20 семян в 3-кратной повторности для каждого варианта.

В экспериментах использовали 4-суточные проростки. Определяли всхожесть зерновок. Для измерения ростовых показателей корней проростков использовали морфометрические показатели: число и длину корней, их сырую массу.

Статистическая обработка результатов. Все измерения выполняли в трех биологических и трех аналитических повторностях. Анализ проводился с использованием пакета программ AGROS для статистического и биометрическо-генетического анализа при селекции и селекции растений (версия 2.09; Отдел статистического анализа Российской академии сельскохозяйственных наук). На рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения. Значимость отличий между средними значениями определяли, используя *t*-критерий Стьюдента при уровне $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В литературе представлено достаточно сведений о негативном воздействии различных стрессов на физиологические процессы растительного организма, особенно на этапе прорастания [18, 19]. В лабораторных условиях в первую очередь оценивают всхожесть семян и рост корней проростков.

Для исследований были взяты концентрации лектинов от 5 до 40 мкг/мл. Выбор диапазона

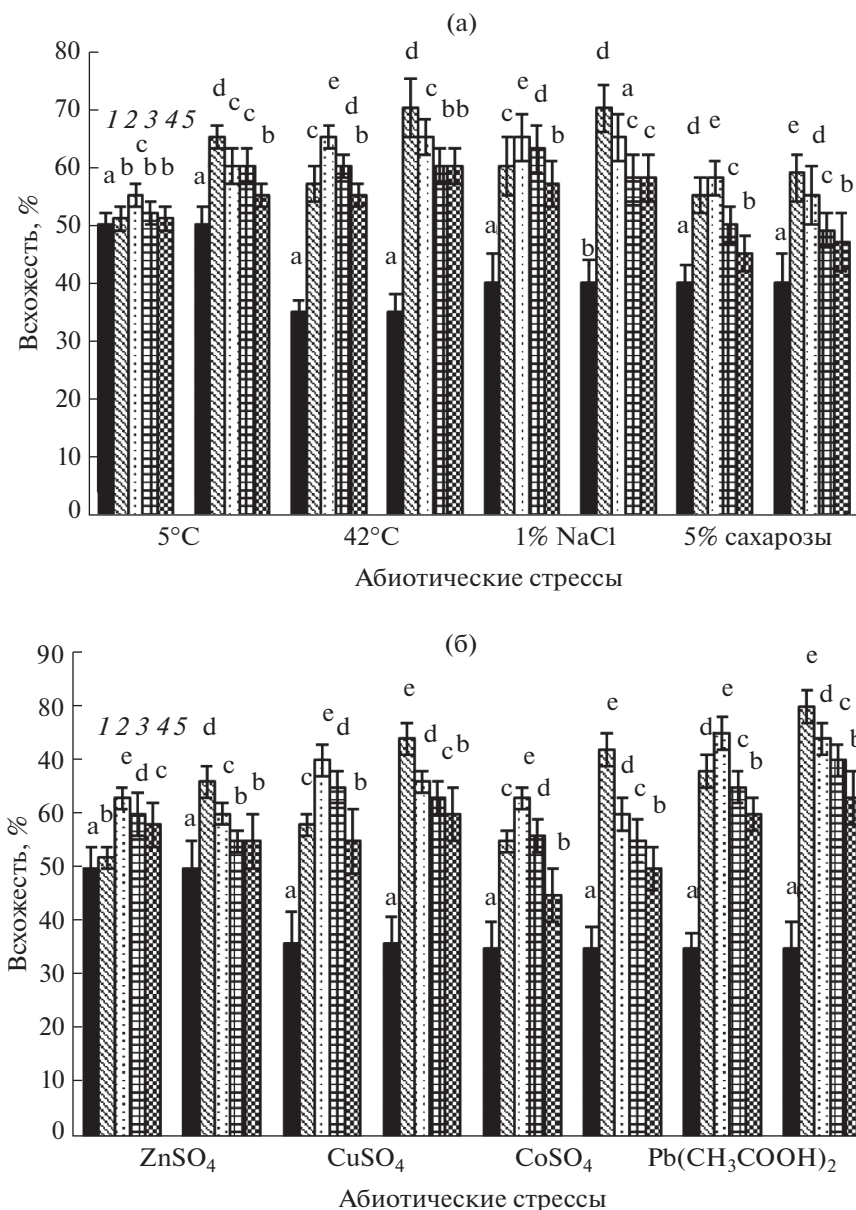


Рис. 1. Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 на всхожесть семян при воздействии абиотических стрессов. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины ($P < 0.05$). 1 – контроль, 2–5 – лектин, концентрации которого составляли 5, 10, 20, 40 мкг/мл, соответственно.

концентраций в данном случае играет важную роль и был основан на ранее проведенных исследованиях и полученных результатах [7–15]. На рис. 1 представлены результаты изучения лабораторной всхожести семян пшеницы на четвертые сутки после начала эксперимента. Смоделированные абиотические стрессы – соли тяжелых металлов (CuSO_4 , CoSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), термостресс (гипо-, гипертермия), засоление и засуха приводили к снижению всхожести семян. При прорастании семян в присутствии лектинов *A. brasilense* Sp7 и Sp245 происходило нивелирование отрицательного воздействия стрессов. В

ходе эксперимента было установлено повышение показателя во всех вариантах опыта по сравнению с контролем. Лектин эндофитного штамма проявлял повышенную способность увеличивать всхожесть семян. Для всех видов стрессовых воздействий в случае лектина *A. brasilense* Sp7 максимальный показатель был отмечен при концентрации – 10 мкг/мл, для лектина *A. brasilense* Sp245 при концентрации лектина – 5 мкг/мл (рис. 1а, б). Самый максимальный эффект для обоих штаммов в отношении всхожести наблюдался в случае воздействия $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Для лектина эпифитного штамма он составлял 75% и для эндофитно-

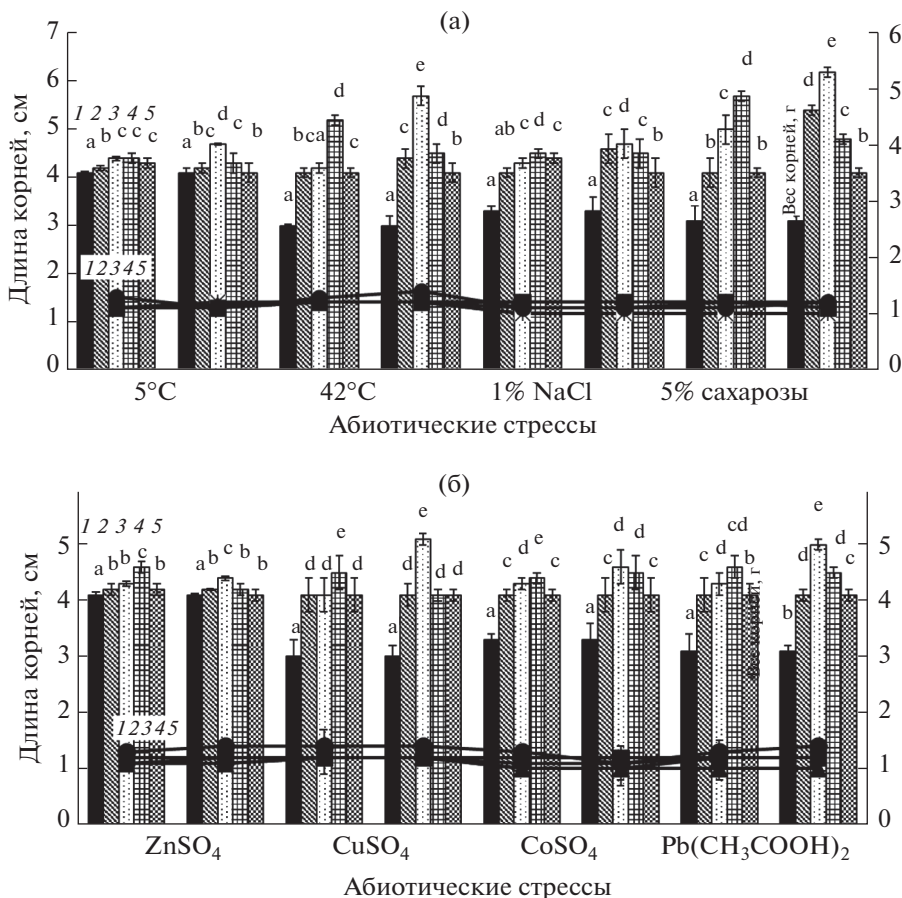


Рис. 2. Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 на длину и массу корней при воздействии абиотических стрессов. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины ($P < 0.05$). 1 – контроль, 2–5 – лектин, концентрации которого составляли 5, 10, 20, 40 мкг/мл, соответственно.

го штамма 80% от контроля (рис. 16). Несколько ниже были значения в вариантах с солями меди и кобальта, а также при гипертермии и засолении. Достоверных отличий между этими вариантами обнаружено не было (рис. 16).

Семена, проращиваемые в условиях изучаемых стрессов, формировали зародышевые корни меньшей длины по сравнению с контролем. Длина корней проростков в контроле в среднем составляла 4.4 ± 0.2 см. При проращивании семян пшеницы в присутствии лектинов происходил рост показателя для всех вариантов опыта (рис. 2а, б). Для обоих изучаемых лектинов наблюдалась идентичная картина – наибольшее повышение происходило в случае смоделированной засухи. Также как и в предыдущем случае, лектин эндофитного штамма был эффективнее. Максимальное значение показателя было зафиксировано при концентрации лектина 10 мкг/мл (6.2 ± 0.2 см), в тоже время для лектина *A. brasilense* Sp7 максимальный эффект был отмечен при концентрации 20 мкг/мл (5.7 ± 0.1 см) (рис. 2а). Несколько меньшим, но также достаточно высоким был рост показателя в

случае гипертермического воздействия. Максимальные значения были зафиксированы при тех же концентрациях лектинов и составляли 5.2 ± 0.1 см для лектина *A. brasilense* Sp7 и 5.7 ± 0.3 см для Sp245 (рис. 2а).

Сырая масса зародышевых корней при проращивании зерновок в условиях стрессов варьировала в пределах от 1.1 ± 0.3 до 1.3 ± 0.2 г. В контроле этот показатель был 1.6 ± 0.2 г. Как показали результаты опытов, при воздействии лектинов обоих штаммов по этому признаку изменений практически не наблюдалось. Все исследуемые варианты оказались довольно однородными по изучаемому показателю и не проявляли достоверных отличий между собой и с контролем (рис. 2а, б).

Проращивание зерновок в присутствии лектинов приводило к увеличению количества зародышевых корней (рис. 3а, б). При этом максимальное воздействие на признак установлено в вариантах засухи и гипертермии. Для лектина эпифитного штамма эффект был отмечен при концентрации – 10 мкг/мл, в случае другого лектина – при 5 мкг/мл. При проращивании образцов на 5% растворе са-

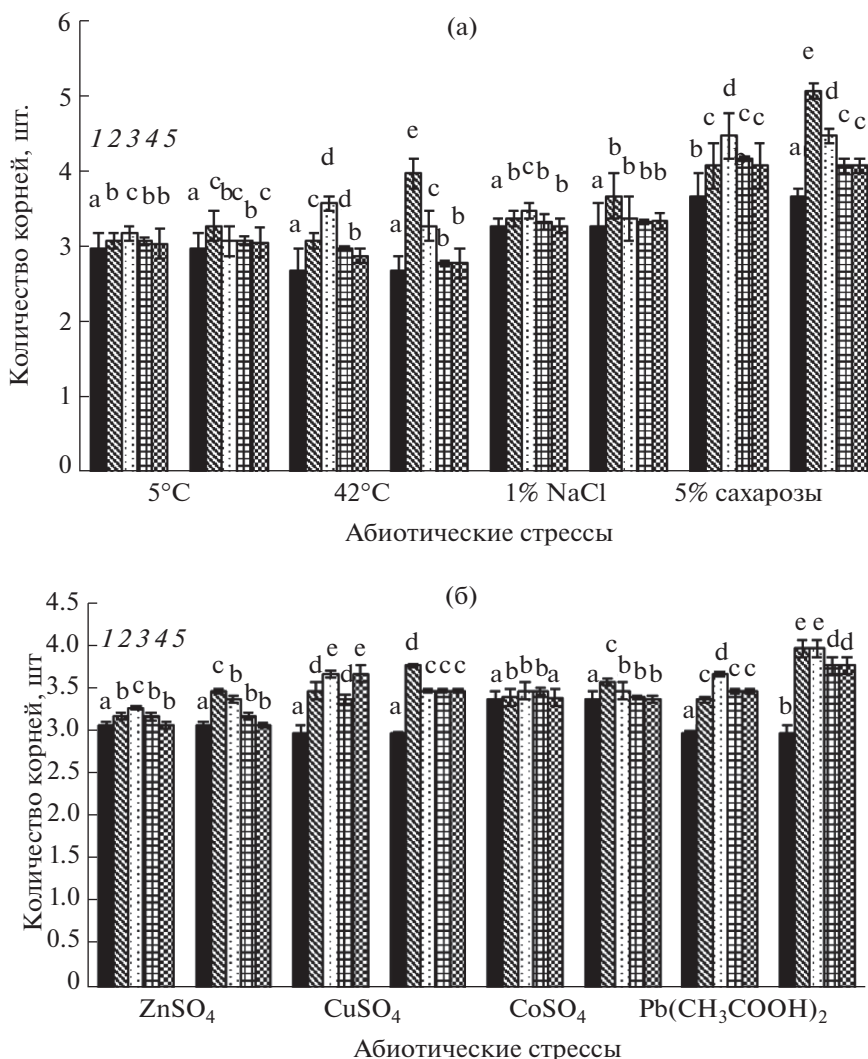


Рис. 3. Влияние лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 на количество зародышевых корней при воздействии абиотических стрессов. Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины ($P < 0.05$). 1 – контроль, 2–5 – лектин, концентрации которого составляли 5, 10, 20, 40 мкг/мл, соответственно.

харозы в присутствии изучаемых лектинов количество корней увеличилось с 3.7 ± 0.2 до 4.5 ± 0.2 шт. в случае лектина *A. brasilense* Sp7 и до 5.1 ± 0.3 шт. в случае лектина Sp245 (рис. 3а). При гипертермии присутствие изучаемых лектинов увеличило количество корней с 2.7 ± 0.2 до 3.6 ± 0.2 шт. в случае лектина *A. brasilense* Sp7 и до 4.0 ± 0.1 шт. в случае лектина Sp245 (рис. 3а).

ОБСУЖДЕНИЕ

Неблагоприятные климатические условия, создающие абиотические стрессы, являются основными ограничивающими факторами снижения продуктивности сельскохозяйственных культур. Доминирующие абиотические стрессы – это засуха, низкая/высокая температура, засоление, воздействие тяжелых металлов. Стрессы являются причи-

ной замедления темпов роста и снижения общей урожайности разнообразных культур, оказывая влияние на целый спектр физиолого-биохимических и метаболических процессов.

Многочисленные результаты исследований последних десятилетий показали, что ответ растения независимо от природы воздействия происходит по некоторой общей схеме, что позволяет говорить о существовании неспецифической стрессовой реакции на различные воздействия [20–22]. Ввиду этого одним из прикладных направлений современной физиологии растений является создание препаратов на основе биологически активных молекул с антистрессовым эффектом. Учитывая мировую тенденцию к экологизации сельского хозяйства, предпочтение отдается веществам, продуцируемым высшими растениями, грибами и микроорганизмами.

Известно, что инокуляция растений пшеницы ассоциативными бактериями *Azospirillum brasilense* при стрессах, вызванных различными абиотическими воздействиями, улучшает морфогенез растений и приводит к увеличению корневой и надземной биомассы растений (на 40–60% в зависимости от штамма) [23, 24]. Азоспириллы отличаются по способу колонизации корней растений. Например, эндофитный штамм *A. brasilense* Sp245 был найден в ксилеме корня, в то же время эпифитный штамм *A. brasilense* Sp7 был обнаружен на поверхности корня [25]. Эндофитные бактерии представляют особый интерес, поскольку считается, что способность существовать внутри растительных тканей позволяет им в меньшей степени зависеть от внешних воздействий и формировать более длительную защиту макроорганизма от стрессовых факторов окружающей среды.

Азоспириллы способны синтезировать лектины – гликопротеины, связывающие строго определенные углеводные группы на поверхности растительной клетки. С поверхности клеток бактерий *A. brasilense* Sp7 и Sp245 были выделены эти белки. Они имели различные молекулярные массы и углеводную специфичность.

Рост растений, особенно начальные этапы онтогенеза, является одним из важных показателей адаптации растений к условиям обитания. В результате проведенных исследований было показано, что лектины с различной эффективностью нивелировали отрицательное воздействие тяжелых металлов, гипо-, гипертермического стресса, засоления и смоделированной засухи на корни проростков пшеницы. При этом участие лектинов в адаптации растений к стрессу, вызванному тяжелыми металлами, и засухе оказалось более существенным.

Стимулирующий эффект обнаруживался уже на самых ранних стадиях развития растений, начиная с прорастания семян, так как лектины существенно влияли на их всхожесть. Анализ морфометрических показателей позволил сделать вывод о том, что лектины способны стимулировать ростовые показатели корней растений, которые, как известно, претерпевают значительные изменения в условиях стресса. Лектины оказывали положительное влияние в основном на количество и размеры корней, при этом не затрагивая их массу.

Полученные данные о влиянии лектинов азоспирилл на ростовые процессы растений, возможно, объясняются активацией этими белками биохимических процессов в прорастающем семени. Лектины азоспирилл способны воздействовать на активность различных ферментов корней проростков растений – пектинолитических, протеолитических [10–12], антиоксидантных [15], изменять содержание ряда стрессовых метаболитов – перекиси водорода [14], цАМФ [13], оксида азота, диа-

цилглицерина, салициловой кислоты [14], низкомолекулярных антиоксидантов [26]. Было показано, что лектины обладали различной степенью функциональной активности, что согласуется с описанными в настоящей работе данными. Всегда эффект для лектина *A. brasilense* Sp245 проявлялся в большей степени и при более низких концентрациях, чем для лектина Sp7. Это может быть связано с различиями в углеводной специфичности и структуре белков, в результате чего изменяется взаимодействие с поверхностью растительной клетки, что является определяющим фактором для проявления функций лектинов. [5, 6].

Вероятным объяснением продемонстрированных концентрационных различий, при которых лектины проявляли эффекты, может быть влияние изучаемых неблагоприятных факторов на процесс связывания лектинов с рецепторами на корнях. Изучение концентрационных зависимостей достаточно актуально для понимания процессов, происходящих при адаптации растений к условиям окружающей среды, а также при практическом использовании регуляторов роста, к которым можно отнести лектины.

Результаты настоящей работы продемонстрировали участие лектинов азоспирилл в повышении способности растений переносить воздействие абиотических факторов, развивая эколого-биологические реакции, направленные на усиление жизнестойкости растения в данных условиях. Полученные результаты являются дополнением к полученным ранее данным о том, что лектины азоспирилл могут участвовать в адаптации и вызывать индукцию защитных механизмов растений. Таким образом, стресс-толерантный эффект лектинов в растениях носит мультинаправленный (полифункциональный) характер. Это является одной из причин считать эти белки способными повышать выживаемость растений в условиях действия стрессоров различной физической природы и тем самым выполнять роль одного из компонентов общих клеточных защитных систем. Все это позволяет рассматривать лектины как перспективное для практического применения соединения для защиты растений от стресса и повышения их продуктивности.

Информация о вкладе авторов: Аленькина С.А. – разработка эксперимента, обработка экспериментальных данных, обсуждение результатов и подготовка статьи; Никитина В.А. – разработка эксперимента, обсуждение результатов и подготовка статьи.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schlöter M., Wiehe W., Assmus B., Steindl H., Becke H., Hoflich G., Hartmann A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 2038. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168493/pdf/632038.pdf>
2. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // Can. J. Microbiol. 2004. V. 50. C. 521. <https://doi.org/10.1139/w04-035>
3. Thirunavukkarasu N., Mishra M.N., Spaepen S., Vanderleyden J., Gross C.A., Tripathi A.K. An extra-cytoplasmic function sigma factor and anti-sigma factor control carotenoid biosynthesis in *Azospirillum brasilense* // Microbiology. 2008. V. 154. P. 2096. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016428-0>
4. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журн. общ. биол. 2007. Т. 68. С. 98.
5. Никитина В.Е., Аленькина С.А., Пономарева Е.Г., Савенкова Н.Н. Изучение роли клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы // Микробиология. 1996. Т. 65. С. 165.
6. Шелудько А.В., Пономарева Е.Г., Варшаломидзе О.Э., Ветчинкина Е.И., Кацы Е.И., Никитина В.Е. Гемагглютинирующая активность и подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* в присутствии разных источников азота // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 749.
7. Никитина В.Е., Богомолова Н.В., Пономарева Е.Г., Соколов О.И. Влияние лектинов азоспирилл на способность семян к прорастанию // Изв. РАН. Сер. биол. 2004. Т. 31. С. 431.
8. Alen'kina S.A., Payusova O.A., Nikitina V.E. Effect of *Azospirillum* lectins on the activities of wheat-root hydrolytic enzymes // Plant Soil. 2006. V. 283. P. 147. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4890-8>
9. Никитина В.Е., Пономарева Е.Г., Аленькина С.А. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимоотношениях с растениями // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005. С. 70.
10. Чернышева М.П., Аленькина С.А., Никитина В.Е., Игнатов В.В. Внеклеточные протеолитические ферменты штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и регулирование их активности гомологичным лектином // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. С. 444.
11. Аленькина С.А., Никитина В.Е. Влияние лектинов азоспирилл на активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в корнях проростков пшеницы // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 553. <https://doi.org/10.7868/S002636561505002X>
12. Alen'kina S.A., Nikitina V.E. Change in the ratio of the activities of different types of proteases and their inhibitors in plant roots exposed to *Azospirillum* lectins // J. Plant Growth Regul. 2017. V. 381. P. 337. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9658-2>
13. Аленькина С.А., Матора Л.Ю., Никитина В.Е. Оценка влияния лектинов азоспирилл на уровень цАМФ в растительной клетке // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 856.
14. Alen'kina S.A., Bogatyrev V.A., Matora L.Yu., Sokolova M.K., Chernysheva M.P., Trutneva K.A., Nikitina V.E. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions // Plant Soil. 2014. V. 381. P. 337. <https://doi.org/10.1134/S0026261715050021>
15. Alen'kina S.A., Romanov N.I., Nikitina V.E. Regulation by *Azospirillum* lectins of the activity of antioxidant enzymes in wheat seedling roots under short-term stresses // Braz. J. Bot. 2018. V. 41. P. 579. <https://doi.org/10.1007/s40415-018-0489-1>
16. Echdat Y., Ofek I., Yachow-Yan Y., Sharon N., Mirelman D. Isolation of mannose-specific lectin from *E.coli* and its role in the adherence of the bacterial to epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 85. P. 1551. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(78\)91179-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(78)91179-8)
17. 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. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
18. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
19. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.
20. Sorty A.M., Meena K.K., Choudhary K., Bitla U.M., Minhas P.S., Krishnani K.K. Effect of plant growth promoting bacteria associated with halophytic weed (*Psoralea corylifolia* L.) on germination and seed. Appl. Biochem. Biotechnol. 2016. P. 872. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2139-z>
21. Sahoo R.K., Ansari M.W., Pradhan M., Dangar T.K., Mohanty S., Tuteja N. A novel *Azotobacter vinelandii* (SRIAz 3) functions in salinity stress tolerance in rice. Plant Signal Behav. 2014. V. 9. P. e29377. <https://doi.org/10.4161/psb.29377>
22. Belimov A.A., Dietz K.-J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations // Microbiol. Res. 2000. V. 155. P. 113. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80046-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80046-4)
23. 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>
24. Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J.R., Hartmann A. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy // Appl. Environ. Microb. 1995. V. 61. P. 1013. <https://aem.asm.org/content/61/3/1013.short>
25. Аленькина С.А., Никитина В.Е. Влияние лектинов азоспирилл на активность аскорбатпероксидазы и содержание аскорбиновой кислоты в корнях проростков пшеницы при абиотических стрессах // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. С. 174. <https://doi.org/10.31857/S0555109920020026>

УДК 581.1

АФК-ЗАВИСИМОЕ ИНДУЦИРОВАНИЕ ГЕМИНОМ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2021 г. Ю. Е. Колупаев^{а, *}, М. А. Шкляревский^а, Ю. В. Карпец^а,
Н. В. Швиденко^а, А. А. Луговая^а

^аХарьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, Украина

*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Поступила в редакцию 29.05.2020 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 18.06.2020 г.

Исследовано влияние 24-часовой обработки гемином (донором монооксида углерода – СО, образующегося с участием гемоксигеназы) на теплоустойчивость проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и процессы образования и обезвреживания АФК. Установлено, что обработка проростков гемином в диапазоне концентраций 0.5–10 мкМ вызвала повышение их устойчивости к повреждающему прогреву (45°C, 10 мин). Наибольший эффект проявлялся под влиянием 5 мкМ гемина. При обработке гемином отмечалось транзитное увеличение в корнях активности внеклеточной пероксидазы и содержания пероксида водорода. Эффект повышения содержания H₂O₂ не проявлялся в присутствии его скавенджера диметилтиомочевина (ДМТМ), а также при обработке корней проростков поглотителем СО гемоглобином и ингибитором внеклеточной пероксидазы азидом натрия, но не ингибитором НАДФ·Н-оксидазы имидазолом. Поскольку при разложении гемина образуются редокс-активные ионы Fe²⁺, для проверки специфичности его действия как донора СО сравнивали эффекты гемина с влиянием 5 мкМ FeSO₄. Сульфат железа в исследуемой концентрации не оказывал влияния на генерацию пероксида водорода корнями и активность внеклеточной пероксидазы. Через 24 ч после начала обработки гемином в корнях увеличивалась активность супероксиддисмутазы, каталазы и внутриклеточной пероксидазы. Вызываемые гемином эффекты повышения активности антиоксидантных ферментов не проявлялись в присутствии ДМТМ, а обработка корней проростков FeSO₄ не влияла на их активность. Под действием донора СО после повреждающего прогрева также снижался выход из корней проростков соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра. Положительное влияние гемина на теплоустойчивость проростков устранялось скавенджером СО гемоглобином и поглотителем пероксида водорода ДМТМ. Обработка проростков FeSO₄ не влияла на их выживание после прогрева. Предполагается участие пероксида водорода как сигнального посредника в реализации влияния донора СО на антиоксидантную систему проростков пшеницы и их теплоустойчивость.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, монооксид углерода, гемин, теплоустойчивость, пероксид водорода, антиоксидантная система

DOI: 10.31857/S0015330321010097

ВВЕДЕНИЕ

Формирование адаптивных реакций растений на действие стрессоров происходит с участием сети сигнальных посредников, среди которых важное место принадлежит газотрансмиттерам [1–3]. Помимо интенсивно исследуемых в настоящее время монооксида азота (NO) и сероводорода (H₂S), в процессах адаптации растений задействован мо-

нооксид углерода (СО) [1], функции которого исследованы слабо.

В растительных клетках, как и животных, монооксид углерода образуется преимущественно с помощью гемоксигеназы (К.Ф. 1.14.99.3), которая в присутствии молекул кислорода и НАДФ·Н катализирует деградацию гема до биливердина IX α с высвобождением СО и ионов Fe²⁺ [4]. Среди четырех обнаруженных у растений генов гемоксигеназы наиболее интенсивно экспрессируется *HO1*. Именно экспрессия гена гемоксигеназы-1 обычно усиливается в стрессовых условиях, в частности,

Сокращения: ДМТМ – диметилтиомочевина, КАТ – каталаза, ПО – пероксидаза, СОД – супероксиддисмутазы.

при обезвоживании [5], засолении [6] и гипертермии [7]. Действие этих стрессоров вызывает и увеличение эндогенного содержания СО в растительных объектах.

В ряде работ изучено влияние экзогенного монооксида углерода на устойчивость растений и функционирование протекторных систем при действии стрессоров различной природы. Для таких исследований обычно используют доноры СО, которые являются искусственными субстратами гемоксигеназы, в частности, гематин [8] и гемин [9]. Так, показано, что обработка гематином способствовала прорастанию семян пшеницы при действии 25% ПЭГ-6000 [5]. При этом происходило увеличение активности амилазы и антиоксидантных ферментов. Гематин вызывал повышение солеустойчивости *Cassia obtusifolia*, что выражалось в нормализации функционирования фотосинтетического аппарата в стрессовых условиях, уменьшении окислительных повреждений, усилении накопления пролина и сахаров, а также увеличении активности ключевых антиоксидантных ферментов [10]. У растений риса, подвергнутых токсическому действию цинка, при обработке геминотом отмечалось смягчение ингибирования роста и угнетение экспрессии генов транспортеров цинка *OsZIPs*, что приводило к уменьшению его накопления в органах растений [9].

В настоящее время среди экологических стрессоров действие высоких температур считается одним из наиболее вредоносных [11]. Согласно современным климатическим моделям, потери урожая сельскохозяйственных растений, связанные с тепловым стрессом, в ближайшие десятилетия увеличатся до 40% [12]. В качестве перспективных приемов, индуцирующих теплоустойчивость растений, рассматривается и обработка донорами газотрансмиттеров [11, 13]. Однако роль СО в адаптации растений к экстремальным температурам изучена очень слабо, хотя такие сведения важны не только для решения прикладных задач, но и для понимания фундаментальных механизмов теплоустойчивости.

Показано увеличение эндогенного содержания СО в клетках табака при гипертермии [7], а также повышение их выживания при добавлении в среду гематина [8]. Данные же о влиянии доноров СО на теплоустойчивость интактных растений отсутствуют.

Совершенно не ясным остается и вопрос о том, какие посредники участвуют в реализации протекторных эффектов экзогенного СО при гипертермии. Известно, что АФК как сигнальные посредники задействованы в формировании устойчивости при тепловом закаливании растений, с их участием происходит активация систем, предотвращающих развитие окислительного стресса [14, 15]. Имеются и немногочисленные данные, указывающие на роль АФК в реализации отдельных фи-

зиологических эффектов монооксида углерода. Так, показано, что вызываемое экзогенным СО либо его донорами закрытие устьиц у бобов зависит от АФК, образующихся с участием НАДФ·Н-оксидазы [16]. С другой стороны, ростстимулирующее влияние экзогенного СО на корни пшеницы угнетается антиоксидантами и салицилгидроксамовой кислотой — ингибитором пероксидазы, что указывает на возможную роль этого фермента в образовании АФК растительными клетками при действии монооксида углерода [17].

В целом же, феноменология эффектов СО при гипертермии и участие в их реализации АФК как сигнальных посредников остаются практически неизученными. В связи с этим, цель работы состояла в изучении роли АФК и ферментативной антиоксидантной системы в проявлении предполагаемого влияния донора СО гемина на теплоустойчивость проростков пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 4-суточные этиолированные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала, выращенные при температуре 18–20°C на водопроводной воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, включающей в себя фильтр механической очистки, угольный фильтр и полупроницаемую обратноосмотическую мембрану с размером ячеек 1 нм. В среду инкубации корней добавляли гемин в концентрациях диапазона 0.05–50 мкМ и выдерживали проростки в течение 24 ч. Оптимальная экспозиция была выбрана в предварительных опытах.

При изучении влияния скавенджера СО гемоглобина (10 мкМ) [18], ингибиторов пероксидазы азидата натрия (NaN_3 , 1 мМ) [19], НАДФ·Н-оксидазы имидазола (10 мкМ) [20], скавенджера пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ — 150 мкМ) [21] инкубация корней в растворах составляла 26 ч. При оценке совместного действия гемина и указанных антагонистов последние добавляли в среду инкубации корней за 2 ч до введения в нее гемина. Концентрации исследуемых соединений выбирали на основании предварительных опытов. В ряде экспериментов также сравнивали влияние 5 мкМ гемина с действием FeSO_4 в эквимольной концентрации, время инкубации проростков на растворах составляло 24 ч.

Для определения теплоустойчивости проростков их подвергали повреждающему прогреву в водяном ультратермостате при температуре $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. После этого проростки всех вариантов переносили на очищенную водопроводную воду. Через 3 сут оценивали относительное количество выживших проростков [15].

Все биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чув-

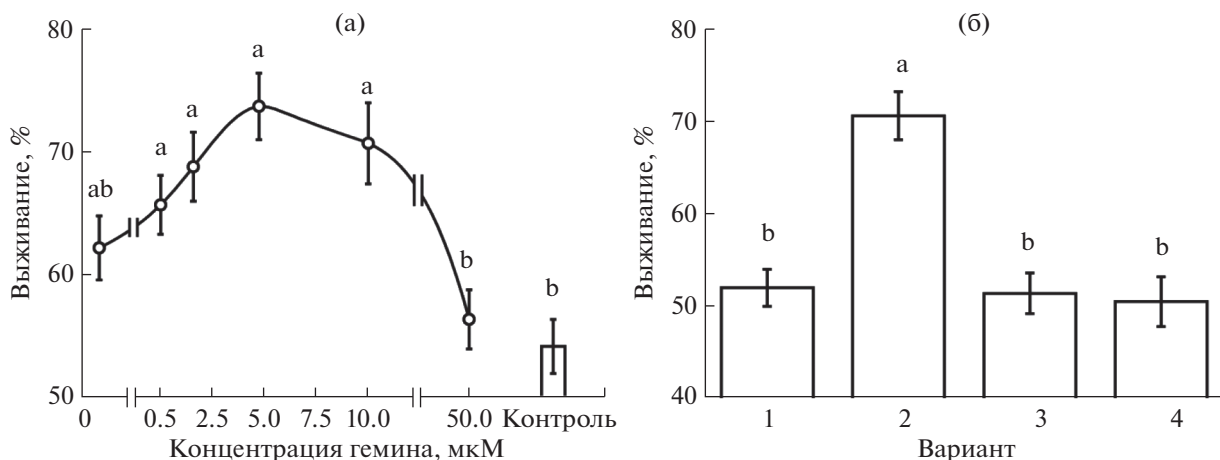


Рис. 1. Влияние гемина на выживание (%) проростков пшеницы после 10-минутного повреждающего прогрева при 45°C: а – концентрационная зависимость протекторного эффекта гемина; б – нивелирование эффекта гемина скавенджером СО гемоглобином: 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – гемоглобин (10 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + гемоглобин (10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами отмечены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

ствительны к воздействиям экзогенных соединений [22]. Активность внеклеточной пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7) определяли в корнях проростков путем получения экстраклеточного раствора [19]. Для этого корни исследуемых интактных проростков помещали в стаканчики с дистиллированной водой, рН которой при необходимости доводили до 6.2 с помощью NaOH. Через 20 мин проростки извлекали, корни отсекали, аккуратно обсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали, а в инкубационной среде определяли активность фермента по реакции окисления гваякола пероксидом водорода [19].

Для определения содержания пероксида водорода корни на холоде гомогенизировали в 5% трихлоруксусной кислоте. Пробы центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при температуре 2–4°C на центрифуге MPW 350R ("MPW Med Instruments", Польша) и в супернатанте определяли концентрацию H_2O_2 с помощью ферротрицианидного метода [23].

При определении активности антиоксидантных ферментов навески корней гомогенизировали на холоде в 0.15 М К, Na-фосфатном буфере (рН 7.6), содержащем ЭДТА (0.1 мМ) и дитиотрейтол (1 мМ) [22]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Активность цитозольной супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли при рН 7.6, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАД·Н и феназинметосульфата. Активность каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) анализировали при рН 7.0 по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Актив-

ность растворимой внутриклеточной ПО определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата – пероксид водорода. Активность СОД выражали в усл. ед./г сырой массы мин), КАТ – в ммоль H_2O_2 /г сырой массы мин), ПО – в мкмоль гваякола/г сырой массы мин).

Состояние мембран клеток корней оценивали через 24 ч после повреждающего прогрева по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра (преимущественно свободных нуклеотидов) [24]. Корни интактных проростков погружали в стаканчики с дистиллированной водой на 1 ч, после чего отсекали от проростков и взвешивали. Оптическую плотность инкубационного раствора определяли при A_{252} и A_{264} на спектрофотометре СФ 46 ("ЛОМО", Россия). Выход веществ рассчитывали в условных единицах как отношение усредненной величины, измеренной при указанных длинах волны, к массе корней и выражали в процентах к величинам, вычисленным для корней проростков, не подвергнутых повреждающему прогреву.

Опыты проводили в 4–5-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизвели 3 раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий определяли с помощью дисперсионного анализа. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждаются эффекты, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка геминем повышала выживание проростков пшеницы после повреждающего прогрева (рис. 1а). Тенденция к повышению теплоустойчивости проростков отмечалась при воздействии ми-

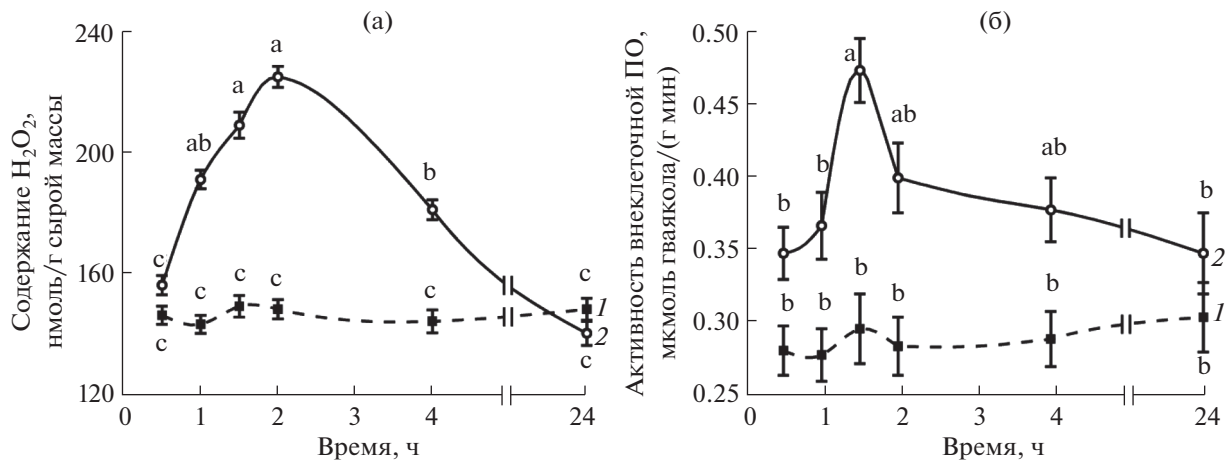


Рис. 2. Динамика содержания пероксида водорода (а) и активности внеклеточной ПО (б) в корнях проростков пшеницы. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

нимальной исследуемой концентрации – 0.05 мкМ. Достоверный эффект наблюдался при использовании донора СО в концентрациях диапазона 0.5–10 мкМ. Более высокая концентрация гемина (50 мкМ) защитного действия не оказывала. В дальнейших экспериментах гемин использовался в концентрации 5 мкМ, которая была наиболее эффективной.

Обработка проростков гемоглобином не влияла на их теплоустойчивость (рис. 1б). При этом гемоглобин, обладающий способностью связывать СО, в комбинации с гемом полностью устранял стресс-протекторное действие последнего. Этот результат в определенной степени указывает на специфичность действия гемина как донора монооксида углерода.

Уже через 1 ч после начала инкубации проростков в присутствии гемина в их корнях отмечалось заметное повышение содержания пероксида водорода (рис. 2а). Его количество достигало максимума к 2 ч наблюдений, затем постепенно снижалось и через 24 ч возвращалось к значениям контроля.

Тенденция к увеличению активности внеклеточной ПО в корнях наблюдалась уже через 30 мин после начала инкубации (рис. 2б), однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$. Наиболее существенное повышение активности фермента отмечалось через 1.5 ч от начала воздействия гемина, затем активность фермента немного снижалась, а через 24 ч инкубации почти не отличалась от контроля.

Обработка проростков гемоглобином существенно не влияла на содержание пероксида водорода в корнях, хотя и вызывала незначительное повышение активности внеклеточной ПО (рис. 3). При этом гемоглобин полностью устранял вызы-

ваемый обработкой гемом эффект повышения содержания H₂O₂ и в значительной степени нивелировал увеличение активности внеклеточной ПО, происходящее в присутствии донора СО.

Как уже отмечалось, при разложении гемина гемоксигеназой наряду с СО образуются ионы Fe²⁺, отличающиеся редокс-активностью. В связи с этим, для дополнительного подтверждения связи эффектов гемина именно с образованием СО сравнивали его влияние на содержание пероксида водорода и активность внеклеточной ПО с действием FeSO₄. Сульфат железа в концентрации, эквивалентной концентрации гемина, не оказывал влияния ни на содержание H₂O₂ в корнях, ни на активность внеклеточной ПО (рис. 3).

Как и следовало ожидать, обработка проростков ингибитором ПО азидом натрия снижала активность внеклеточной формы фермента. При этом под действием NaN₃ полностью устранялось повышение активности ПО, вызываемое донором СО (рис. 3б). Также азид натрия снижал содержание пероксида водорода в корнях и полностью устранял его повышение в присутствии гемина (рис. 3а). В то же время ингибитор НАДФ·Н-оксидазы имидазол практически не влиял на вызываемый донором СО эффект повышения содержания H₂O₂ в корнях.

В присутствии скавенджера пероксида водорода ДМТМ его содержание в корнях снижалось, также при обработке ДМТМ не регистрировалось повышение содержания пероксида водорода в варианте с гемом (рис. 3а).

В целом, полученные результаты указывают, что гемин, действуя как донор СО, оказывал достаточно специфическое влияние на генерацию пероксида водорода корнями проростков пшени-

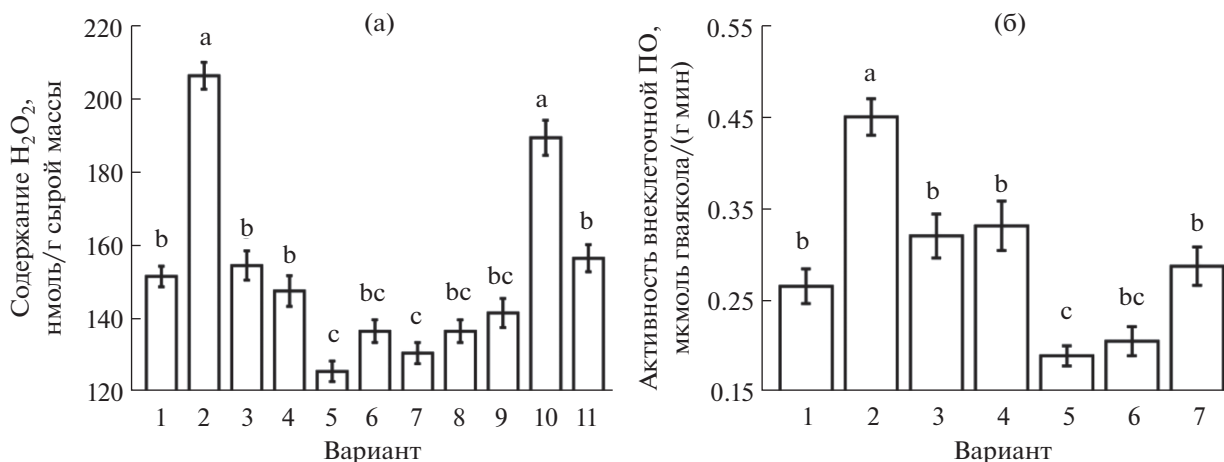


Рис. 3. Влияние гемина, гемоглобина, ДМТМ, азид натрия, имидазола и $FeSO_4$ на содержание пероксида водорода (а) и активность внеклеточной ПО (б) в корнях пшеницы. (а): 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – гемоглобин (10 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + гемоглобин (10 мкМ); 5 – ДМТМ (150 мкМ); 6 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (150 мкМ); 7 – азид натрия (1 мМ); 8 – гемин (5 мкМ) + азид натрия (1 мМ); 9 – имидазол (10 мкМ); 10 – гемин (5 мкМ) + имидазол (10 мкМ); 11 – $FeSO_4$ (5 мкМ); (б): 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – гемоглобин (10 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + гемоглобин (10 мкМ); 5 – азид натрия (1 мМ); 6 – гемин (5 мкМ) + азид натрия (1 мМ); 7 – $FeSO_4$ (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$. Примечание. Содержание пероксида водорода в корнях определяли через 2 ч после начала обработки геминном и/или через 4 ч от начала обработки другими соединениями, активность внеклеточной пероксидазы анализировали через 1.5 ч после начала действия гемина и/или через 3.5 ч после начала обработки другими соединениями.

цы. Этот эффект, по всей вероятности, обусловлен повышением активности внеклеточной ПО, которая может генерировать АФК, в том числе пероксид водорода (рис. 2, 3).

В связи с обнаруженным влиянием донора СО на генерацию АФК оценивали его действие и на активность ключевых антиоксидантных ферментов. При обработке геминном в корнях постепенно, к 24 ч наблюдений, повышалась активность СОД (рис. 4а). Аналогичным образом изменялась активность КАТ (рис. 4б) и растворимой ПО (рис. 4в).

Для доказательства причинно-следственной связи между вызываемым обработкой геминном повышением содержания пероксида водорода в корнях и увеличением активности антиоксидантных ферментов оценивали влияние донора СО на их активность в присутствии скавенджера H_2O_2 ДМТМ. Обработка этим соединением сама по себе не влияла на активность СОД, но устраняла ее повышение, вызываемое действием гемина (рис. 5а).

Через 24 ч после повреждающего прогрева в контроле активность СОД не изменялась, а в варианте с геминном несколько снижалась. В вариантах с ДМТМ и его комбинацией с геминном активность СОД после повреждающего прогрева существенно не изменялась. Обработка проростков сульфатом железа не влияла на активность СОД как до, так и после повреждающего прогрева (рис. 5а).

В присутствии ДМТМ активность КАТ в корнях не изменялась, при этом скавенджер пероксида водорода устранял ее повышение, вызываемое обработкой геминном (рис. 5б). Сульфат железа не оказывал влияния на активность фермента в корнях проростков. После повреждающего прогрева активность КАТ во всех вариантах опыта снижалась до приблизительно одинаковых величин, но в варианте с геминном абсолютные ее значения были несколько выше, чем в контроле (рис. 5б).

Активность ПО в присутствии ДМТМ не изменялась, однако скавенджер H_2O_2 в значительной степени нивелировал ее повышение, вызываемое обработкой проростков геминном (рис. 5в). Под действием $FeSO_4$ активность фермента не изменялась.

После повреждающего прогрева активность ПО в корнях проростков контрольного варианта несколько повышалась, а в варианте с обработкой геминном не изменялась (рис. 5в). При этом абсолютные величины в варианте с донором СО достоверно превышали значения контроля. Во всех остальных вариантах опыта отличия активности ПО от соответствующих значений контроля были несущественными.

В течение первых суток после повреждающего прогрева проростки оставались живыми, их повреждения не визуализировались. Однако выход соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра, из клеток корней через сутки

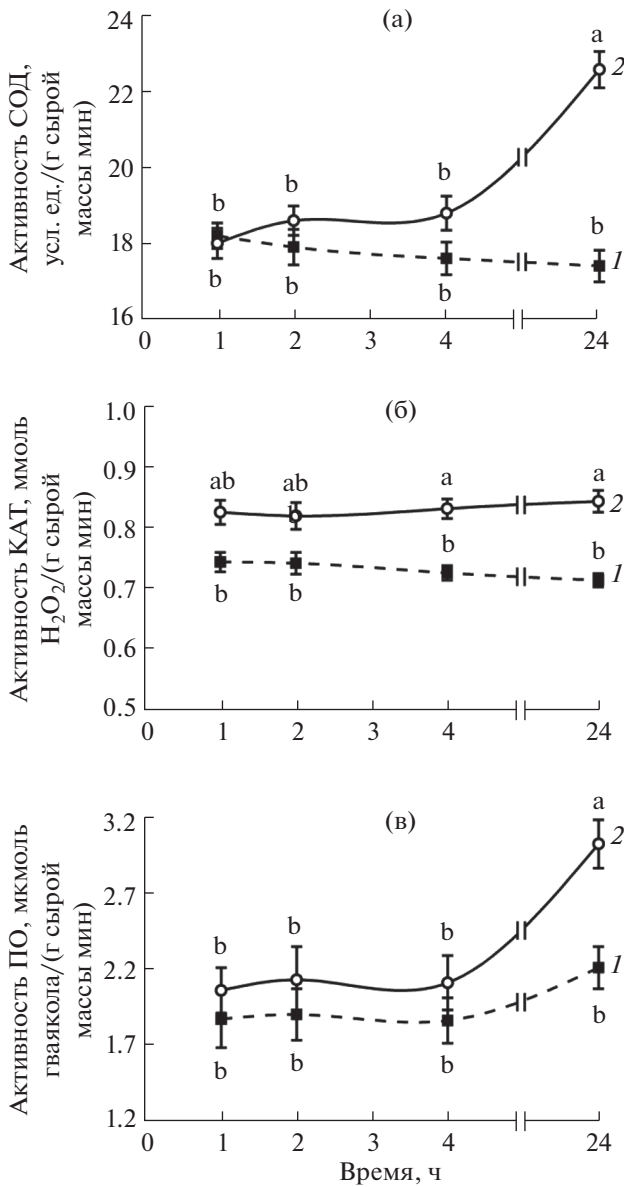


Рис. 4. Динамика активности СОД (а), КАТ (б) и растворимой ПО (в) в корнях проростков пшеницы при обработке геминном. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

после прогрева в контрольном варианте увеличился почти в два раза по сравнению с соответствующим показателем у проростков, которые не подвергались прогреву (рис. 6а). Обработка геминном значительно снижала выход веществ из корней проростков после повреждающего прогрева. Под влиянием ДМТМ, обладающего антиоксидантными свойствами, выход соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области, немного уменьшался, однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$. В то же время воздействие

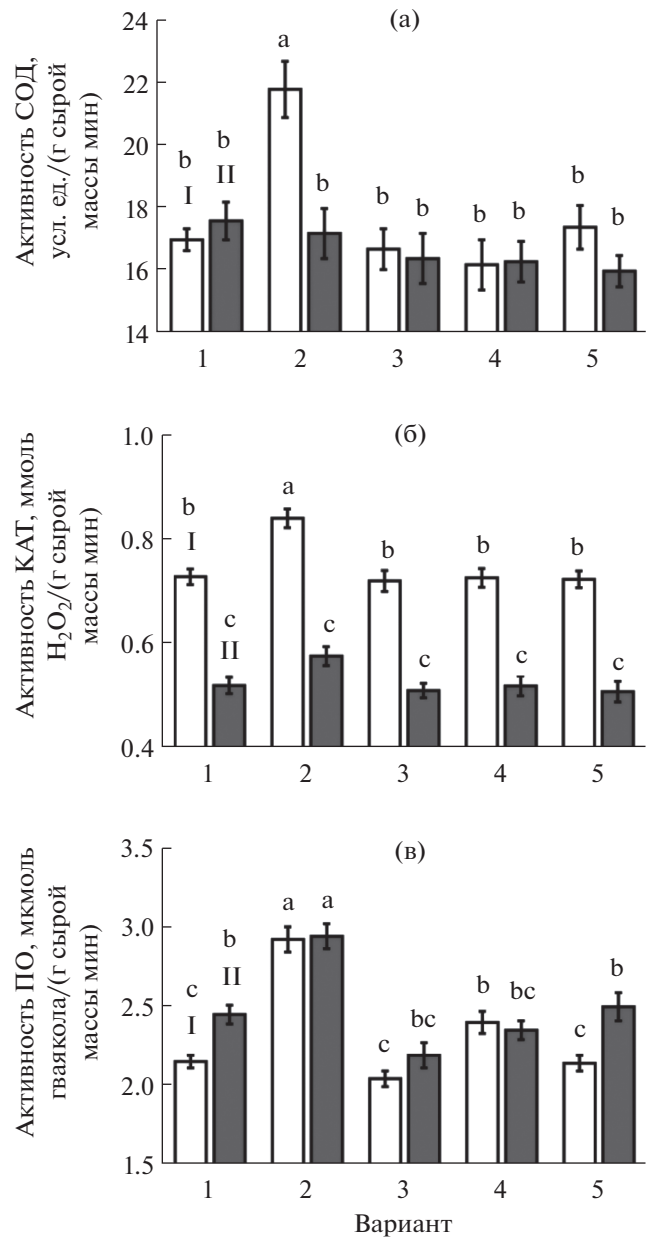


Рис. 5. Влияние гемина, ДМТМ и FeSO_4 на активность СОД (а), КАТ (б) и растворимой ПО (в) в корнях проростков пшеницы. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ДМТМ (150 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (150 мкМ); 5 – FeSO_4 (5 мкМ). I – перед повреждающим прогревом; II – через 24 ч после 10 мин прогрева при 45°C . Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$. Примечание. Перед прогревом корни проростков инкубировали в течение 24 ч на растворах гемина или FeSO_4 , инкубация на растворе ДМТМ – 26 ч, при комбинированной обработке ДМТМ и геминном ДМТМ вносили в среду инкубации за 2 ч до введения в нее гемина.

ДМТМ практически полностью устраняло положительное влияние гемина на стабильность мембран клеток корней. Обработка сульфатом железа не оказывала влияния на вызываемый повреждаю-

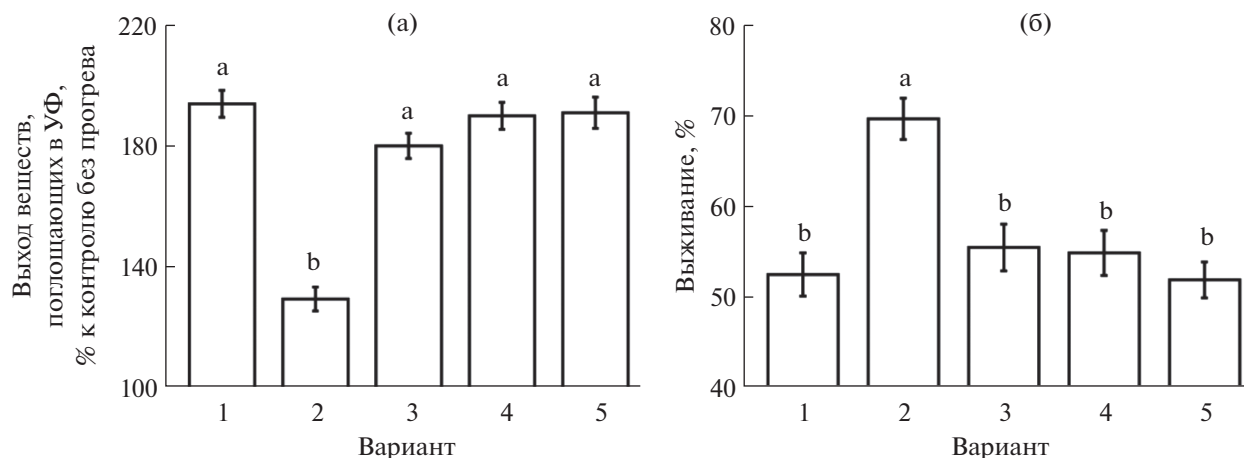


Рис. 6. Выход веществ, поглощающих в ультрафиолетовой (УФ) области спектра, из корней проростков пшеницы (а) и выживание проростков (б) после повреждающего прогрева. 1 – контроль; 2 – гемин (5 мкМ); 3 – ДМТМ (150 мкМ); 4 – гемин (5 мкМ) + ДМТМ (150 мкМ); 5 – FeSO_4 (5 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$. Примечание. Выход веществ, поглощающих в УФ, определяли через 24 ч, выживание проростков – через 3 сут после повреждающего прогрева.

щим прогревом выход из клеток корней соединений, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра (рис. 6а).

Интегральный показатель выживания проростков через 3 сут после стрессового воздействия вполне соответствовал показателю выхода веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра, который определяли раньше – через 1 сут после прогрева (рис. 6б). Так, под влиянием гемина выживание проростков значительно увеличилось, при обработке ДМТМ почти не изменилось, а при комбинированном действии их сквенджера пероксида водорода и гемина защитное действие последнего не проявлялось. Обработка проростков FeSO_4 не оказывала влияния на их выживание после повреждающего прогрева.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о положительном влиянии обработки проростков пшеницы донором СО геминном на их теплоустойчивость. Этот эффект проявлялся как в сохранении целостности мембран, определяемой по выходу веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра [24], так и в повышении интегрального показателя – выживания проростков через 3 сут после повреждающего прогрева (рис. 1, 6). Есть основания утверждать, что стресс-протекторные эффекты гемина в условиях наших экспериментов связаны с его действием именно как донора СО. Так, его защитное влияние на проростки при гипертермии полностью устранялось сквенджером монооксида углерода гемоглобином (рис. 1б). Кроме того, другой редокс-активный продукт реакции разложения гемина – Fe^{2+} ,

как показали специальные опыты с использованием FeSO_4 в концентрации 5 мкМ (эквивалентной концентрации гемина), не оказывал влияния на состояние мембран клеток корней после прогрева проростков и на их выживание после трехсуточного отращивания (рис. 6). Также обработка 5 мкМ FeSO_4 не влияла и на другие исследуемые показатели: содержание пероксида водорода (рис. 3) и активность антиоксидантных ферментов в корнях (рис. 5). Следует отметить, что соли Fe^{2+} используются в экспериментах в качестве агентов окислительного стресса. Однако, как показано нами ранее, FeSO_4 при обработке проростков пшеницы вызывал заметное проявление эффекта окислительного стресса в концентрации 5 мМ [25], то есть на три порядка превышающей используемую в настоящей работе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что физиологические эффекты донора СО гемина, по-видимому, реализуются с участием пероксида водорода как сигнального посредника. Так, под влиянием гемина происходило транзитное повышение содержания H_2O_2 в корнях проростков (рис. 2а). Похожую динамику имела и активность внеклеточной ПО (рис. 2б), которую рассматривают в качестве одного из важных продуцентов пероксида водорода [26]. При этом максимальное увеличение активности фермента немного опережало временной максимум содержания H_2O_2 (рис. 2), что указывает на причинно-следственную связь между активацией под влиянием обработки донором СО внеклеточной ПО и повышением содержания пероксида водорода в корнях.

Результаты ингибиторного анализа также свидетельствуют в пользу предположения об участии

внутриклеточной ПО в образовании АФК в корнях под влиянием доноров СО. Так, ингибитор ПО азид натрия как вызывал угнетение активности внутриклеточной формы этого фермента (рис. 3б), так и устранял повышение содержания пероксида водорода в корнях проростков, обработанных донором СО (рис. 3а). Необходимо отметить, что NaN_3 , помимо ингибирования ПО, может подавлять цитохромное дыхание через цитохромксидазный комплекс. Хотя обычно для достижения такого эффекта на растительные клетки действуют этим метаболическим ядом в концентрациях, существенно превышающих использованную в наших опытах [27]. Тем не менее, побочных эффектов азидата натрия, в том числе связанных с подавлением цитохромного дыхания, полностью исключить нельзя, хотя есть основания полагать, что их проявление в кратковременных экспериментах относительно незначительное. При этом данные по временной динамике активности внутриклеточной ПО и содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы при их обработке донором СО (рис. 2) и устранению азидом натрия как активации ПО, так и накопления H_2O_2 (рис. 3), позволяют предполагать важную роль именно этого фермента в образовании АФК, индуцируемом обработкой геминном.

По крайней мере, один из механизмов образования пероксида водорода с участием внутриклеточной ПО может заключаться в окислении $\text{НАД(Ф)} \cdot \text{H}$ молекулярным кислородом в присутствии фенольных кофакторов, происходящий по суммарному уравнению: $2\text{НАД(Ф)} \cdot \text{H} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{НАД(Ф)} + \text{H}_2\text{O}_2$ [26]. Полученные данные о возможной роли внутриклеточной ПО в генерации АФК клетками корней при действии донора СО согласуются с другим эффектом, изученным в работе Хуан и соавт. [17]. В ней показано устранение вызываемого гематином усиления роста корней проростков пшеницы при их обработке не только скавенджером пероксида водорода иодидом калия, но и ингибитором ПО салицилгидроксамовой кислотой. При этом, однако, вопрос о механизмах индуцирования монооксидом углерода образования АФК, зависящего от внутриклеточной ПО, остается открытым.

По-видимому, усиление образования H_2O_2 в корнях проростков при обработке донором СО является процессом, важным для активации антиоксидантной системы. Так, вызываемое донором СО повышение активности СОД, КАТ и ПО в корнях практически не проявлялось при их обработке скавенджером пероксида водорода ДМТМ (рис. 5). Эффекты повышения под влиянием экзогенного монооксида углерода активности антиоксидантных ферментов у растений разных таксономических групп, особенно в стрессовых условиях, к настоящему времени обнаружены во многих исследова-

ниях. Так, под влиянием водного раствора СО в корнях проростков пшеницы, подвергнутых действию NaCl , происходило усиление экспрессии гена Mn-SOD и повышение общей активности СОД [28]. У растений *Cassia obtusifolia*, подвергнутых действию стрессовых концентраций хлорида натрия, при обработке гематином отмечено увеличение активности СОД, КАТ, неспецифической ПО, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы [10]. Следует, однако, отметить, что в контексте устойчивости растений к гипертермии влияние доноров монооксида углерода на состояние ферментативной антиоксидантной системы до сих пор специально не исследовалось.

Таким образом, в нашей работе впервые показана роль пероксида водорода, вероятно, генерируемого с участием внутриклеточной ПО, в активации ферментативной антиоксидантной системы и развитии теплоустойчивости проростков пшеницы под действием донора СО.

Вполне очевидно, что обнаруженная в наших экспериментах АФК-опосредованная активация антиоксидантной системы при действии донора СО не единственный механизм, способствующий повышению теплоустойчивости проростков пшеницы. К настоящему времени также получены данные об усилении донорами СО накопления в растениях ряда мультифункциональных низкомолекулярных протекторных соединений. Так, у растений пшеницы при солевом стрессе обнаружено усиление донором СО экспрессии гена Δ^1 -пирролин-5-карбоксилатсинтазы и снижение экспрессии гена пролиндегидрогеназы, приводящее к накоплению пролина [29]. При осмотическом стрессе, обусловленном действием ПЭГ-6000, у проростков пшеницы, обработанных гематином, усиливалось накопление сахаров [5]. С участием монооксида углерода может активироваться и синтез алкалоидов. Недавно показано, что действие гипертермии на растения табака вызывало зависимый от гемоксигеназы-1 биосинтез СО в корнях, что индуцировало усиление образования жасмоновой кислоты. В результате этого активировался жасмонатный сигнальный каскад, что, в свою очередь, приводило к термоиндуцированному усилению синтеза никотина [7].

Обсуждая полученные в нашей работе результаты, нельзя исключить, что физиологические эффекты экзогенного СО отчасти могут быть связаны с изменением функционирования митохондрий как одного источников АФК [14]. Однако, насколько нам известно, специальных исследований регуляторного действия СО на образование АФК в митохондриях до сих пор не проводилось, хотя, по аналогии с клетками животных, предполагается возможность усиления генерации АФК за счет ингибирования монооксидом углерода комплекса IV (цитохромксидазы) [30]. Для

выяснения влияния СО на дыхательный метаболизм и возможного вклада этого метаболизма в формирование устойчивости растений необходимы специальные исследования.

Как сигнальная молекула СО, по-видимому, находится в сложном функциональном взаимодействии не только с АФК, но и многими другими посредниками и фитогормонами [2]. Получены доказательства участия ионов кальция [2], оксида азота [5] и сероводорода [8] в реализации стресс-протекторных эффектов доноров монооксида углерода. Известно, что основные газотрансмиттеры – NO, H₂S и СО – функционально связаны друг с другом, а также с АФК [2]. Однако исследования по выяснению этих связей при формировании индуцированной СО устойчивости растений к гипертермии и другим абиотическим стрессорам пока находятся на начальной, в основном феноменологической, стадии.

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. He H., He L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses // *Nitric Oxide*. 2014. V. 42. P. 40.
2. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschasniy S.P., Dmitriev A.P. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. P. 392.
3. Yao Y., Yang Y., Li C., Huang D., Zhang J., Wang C., Li W., Wang N., Deng Y., Liao W. Research progress on the functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8: e605. <https://doi.org/10.3390/plants8120605>
4. Shekhawat G.S., Verma K. Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 2255.
5. Liu Y., Xu S., Ling T., Xu L., Shen W. Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 1371.
6. Verma K., Dixit S., Shekhawat G.S., Alam A. Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress // *Turk. J. Biol.* 2015. V. 39. P. 540.
7. Cheng T., Hu L., Wang P., Yang X., Peng Y., Lu Y., Chen J., Shi J. Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in Tobacco // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19: e188. <https://doi.org/10.3390/ijms19010188>
8. Li Z.-G., Gu S.-P. Hydrogen sulfide as a signal molecule in heme-induced heat tolerance of tobacco cell suspension // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 595.
9. Chen Q., Gong C., Ju X., Zhu Z., Shen W., Shen Z., Cui J. Hemin through the heme oxygenase 1/ferrous iron, carbon monoxide system involved in zinc tolerance in *Oryza sativa* L. // *J. Plant Growth Regul.* 2018. V. 37. P. 947.
10. Zhang C., Li Y., Yuan F., Hu S., He P. Effects of hematin and carbon monoxide on the salinity stress responses of *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings // *Plant Soil.* 2012. V. 359. P. 85.
11. Ali S., Rizwan M., Arif M.S., Ahmad R., Hasanuzzaman M., Ali B., Hussain A. Approaches in enhancing thermotolerance in plants: an updated review // *J. Plant Growth Regul.* 2020. V. 39. P. 456.
12. Lobell D.B., Tebaldi C. Getting caught with our plants down: the risks of a global crop yield slowdown from climate trends in the next two decades // *Environ. Res. Lett.* 2014. V. 9: e074003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/7/074003>
13. Bhuyan M.H.M.B., Hasanuzzaman M., Parvin K., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Nahar K., Fujita M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: two intimate collaborators regulating plant defense against abiotic stress // *Plant Growth Regul.* 2020. V. 90. P. 409.
14. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. С. 163.
15. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. Роль пероксида водорода в формировании сигнала, индуцирующего развитие теплоустойчивости проростков пшеницы // *Физиология растений*. 2013. Т. 60. С. 221.
16. She X.-P., Song X.-G. Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells // *J. Integr. Plant Biol.* 2008. V. 50. P. 1539.
17. Xuan W., Huang L., Li M., Huang B., Xu S., Liu H., Gao Y., Shen W. Induction of growth elongation in wheat root segments by heme molecules: a regulatory role of carbon monoxide in plants? // *Plant Growth Regul.* 2007. V. 52. P. 41.
18. Sa Z.S., Huang L.Q., Wu G.L., Ding J.P., Chen X.Y., Yu T., Ci S., Shen W.B. Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves // *J. Integr. Plant Biol.* 2007. V. 49. P. 638.
19. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells // *Protoplasma*. 2001. V. 217. P. 125.
20. Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves // *Physiol. Plant.* 2006. V. 127. P. 293.
21. Sung M., Hsu Y., Hsu Y. Hypersalinity and hydrogen peroxide upregulation of gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* against oxidative stress // *Mar. Biotechnol.* 2009. V. 11. P. 199.
22. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И. Влияние модификации NO-статуса, закалывающего прогрева и пероксида водорода на

- активность антиоксидантных ферментов в проростках пшеницы // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 317.
23. *Sagisaka S.* The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica* // Plant Physiol. 1976. V. 57. P. 308.
24. *Мелехов Е.И., Ефремова Л.К.* Влияние экзогенных фитогормонов на устойчивость растительных клеток к нагреву и 2,4-Д // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 561.
25. *Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Рябчун Н.И., Кириченко В.В.* Конститутивная и индуцированная холодом устойчивость проростков ржи и пшеницы к агентам окислительного стресса // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 346.
26. *Шарова Е.И., Медведев С.С.* Редокс-реакции в апопласте растущих клеток // Физиология растений. 2017. Т. 64. С. 3.
27. *Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Иванов И.М., Суханова Е.С., Носов А.М.* Особенности дыхания и образования стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* при выращивании в колбах и биореакторах // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 594.
28. *Ling T., Zhang B., Cui W., Wu M., Lin J., Zhou W., Huang J., Shen W.* Carbon monoxide mitigates salt-induced inhibition of root growth and suppresses programmed cell death in wheat primary roots by inhibiting superoxide anion overproduction // Plant Sci. 2009. V. 177. P. 331.
29. *Yuan X.X., Wang J., Xie Y.J., Shen W.B.* Effects of carbon monoxide on salt tolerance and proline content of roots in wheat seedling // Plant Physiol. Commun. 2009. V. 45. P. 567.
30. *Gupta K.J., Igamberdiev A.U.* Compartmentalization of reactive oxygen species and nitric oxide production in plant cells: an overview // Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Signaling and Communication in Plants. K.J. Gupta, A.U. Igamberdiev (eds.). Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 1.

УДК 581.1

РОЛЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ 2-ОГДГ И МДГ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.) ПРИ ГИПОКСИИ

© 2021 г. А. Т. Епринцев^а, *, Д. Н. Федорин^а, Г. Б. Анохина^а, М. О. Гатауллина^а

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Воронежский государственный университет”, Воронеж, Россия

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 21.02.2020 г.

После доработки 15.06.2020 г.

Принята к публикации 17.06.2020 г.

Исследовали молекулярные и эпигенетические способы регуляции активности ключевых ферментов ЦТК, 2-оксоглутаратдегидрогеназы (2-ОГДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) в листьях кукурузы в гипоксических условиях. Показано, что регуляция скорости функционирования ферментов в стрессовых условиях обусловлена не конформационными трансформациями белковых молекул, а изменением транскрипционной активности их генов. Анализ уровня транскриптов генов, кодирующих 2-ОГДГ и МДГ, выявил корреляцию с изменениями общей ферментативной активности. При инкубации растений в гипоксических условиях наблюдалось снижение экспрессии генов 2-ОГДГ и МДГ. Установлено, что колебание содержания транскриптов генов *ogdh-1* и *ogdh-3* сопряжено с изменением метильного статуса CG-динуклеотидов в их промоторах. Увеличение экспрессии этих генов сопряжено со снижением степени метилирования их промоторов. И наоборот, уменьшение относительного уровня транскриптов вызвано ростом количества метилированных CG-динуклеотидов. Делается вывод о регуляции функционирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в условиях низких концентраций кислорода посредством эпигенетического механизма, то есть путем изменения метильного статуса промоторов их генов.

Ключевые слова: *Zea mays*, 2-оксоглутаратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, гипоксия, транскрипция, метилирование, ДНК

DOI: 10.31857/S0015330321010061

ВВЕДЕНИЕ

Естественная среда обитания многих растений нередко подвержена затоплению, которое приводит к недостатку кислорода в почвенном покрове – гипоксии, что вызывает значительные изменения в функционировании как всего организма в целом, так и отдельных его ферментных систем [1–3]. Трансформация дыхательных путей возможна разными способами. При аноксии происходит увеличение доли гликолиза и пентозофосфатного пути [4], а также использование альтернативных путей окисления восстановленных коферментов [5, 6]. Согласно некоторым литературным данным, при снижении уровня концентрации внутриклеточного АТФ на 15–20% наблюдается угнетение ведущих энергозависимых функционально-метаболических процессов [7]. В условиях гипоксии дыхательная цепь митохон-

дрий участвует в формировании системы ответа организма на дефицит кислорода, таким образом, обеспечивая адаптивную реакцию [8–10].

2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (2-ОГДК, КФ 1.2.4.2) – сложная мультиферментная система, включающая в свой состав три независимых фермента, которые обеспечивают окислительное декарбоксилирование 2-оксоглутарата (2ОГ) с образованием сукцинил-СoА: 2-оксоглутаратдегидрогеназу (2-ОГДГ, E1, КФ 1.2.4.2.); дигидролипоамидсукцинилтрансферазу (ДЛСТ, E2, КФ 2.3.1.61) и дегидролипоамиддегидрогеназу (ДЛД, E3, КФ 1.8.1.4.). Известно, что у гетеротрофных организмов наблюдается изменение активности 2-ОГДК в условиях гипоксии [11]. Для растений с C₃-типом метаболизма показано ингибирующее действие низких концентраций кислорода на функционирование 2-ОГДК [4, 12]. Первый компонент 2-ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназа кукурузы (*Zea mays* L.) – кодируется тремя генами, расположенными в разных хромо-

Сокращения: 2-ОГДГ – 2-оксоглутаратдегидрогеназа; МДГ – малатдегидрогеназа; МС-ПЦР – метил-специфичная полимеразная цепная реакция.

сомах. Первый ген *ogdh-1* локализован во 2 хромосоме (LOC100383579, Gene ID: 100383579) и состоит из 10 экзонов. Второй ген *ogdh-2*, ранее аннотированный как кодирующий 2-ОГДГ, в настоящее время признан псевдо-геном, расположенным в 9 хромосоме (LOC103639200, Gene ID: 103639200), он представлен 15 экзонами. Третий ген *ogdh-3* кодирует 2-ОГДГ-подобный белок и расположен в 10 хромосоме (TIDP3354, Gene ID: 100383847), состоит из 9 экзонов. Имеются данные, согласно которым 2-ОГДК, помимо митохондриальной, имеет и ядерную локализацию, обеспечивая процесс сукцинирования за счет связывания с лизин-ацетилтрансферазой 2А (KAT2A) из промоторных областей генов, что говорит о роли данного мультиферментного комплекса в эпигенетической регуляции работы генома [13].

Малатдегидрогеназная система повсеместно распространена в растительной клетке. Малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37) – фермент, катализирующий обратимое окисление малата до оксалоацетата. Анализ международной базы данных GenBank и литературы позволил обнаружить 10 генов НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы, локализованных в разных хромосомах [14, 15]. При этом, митохондриальные формы энзима кодируются двумя генами, локализованными в разных хромосомах: ген *mMdh* (Gene ID: 100274264) в 6 хромосоме и ген *mMdh-2* (Gene ID: 100273428) в 8 хромосоме, которые содержат 7 экзонов.

Митохондриальная МДГ участвует в цикле Кребса, при этом в качестве кофермента использует НАД⁺. Существует МДГ (малик энзим, КФ 1.1.1.39), которая катализирует реакцию декарбоксилирования, участвуя как в выработке НАДН, так и в регуляции уровня диоксида углерода внутри клеток. Известно, что гипоксия оказывает значительное влияние на активность малатдегидрогеназ. Длительное пребывание растений в гипоксических условиях приводит к увеличению активности НАДН-МДГ в корнях и листьях пшеницы, что говорит о смещении равновесия реакции в сторону образования малата [16].

Имеется множество свидетельств того, что в условиях действия гипоксии в растительном организме происходит увеличение уровня внутриклеточного сукцината за счет активизации дополнительных метаболических путей: активации ГАМК-шунта, включения механизма превращения 2-оксоглутарата в обход 2-ОГДК через активацию 2-оксоглутаратоксигеназы (2ОГО, КФ 1.14.11), а также в результате работы аланинаминотрансферазы (АлАТ, КФ 2.6.1.2) [4, 12, 17].

Таким образом, важными точками в механизме стресс-индуцированного ответа растительного организма на гипоксию являются такие ферментные системы как 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс и малатдегидрогеназная система. Ранее

нами было показано, что функционирование сукцинатдегидрогеназы в кукурузе в условиях гипоксии регулируется за счет изменения статуса метилирования отдельных CG-динуклеотидов промоторов генов [18].

Цель работы – исследование статуса метилирования CpG-островков промоторов генов в регуляции функционирования ферментов 2-ОГДК и МДГ в листьях кукурузы в условиях низких концентраций кислорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовались листья 10–12 дневной кукурузы сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно при 10-часовом световом дне и интенсивности света 25 Вт/м² в климатической камере (“LabTech”, Южная Корея). Действие низких концентраций кислорода в среде осуществлялось путем помещения растений с предварительно удаленной корневой системой на 24 ч в вакуум-эксикатор, в который подавался азот. В качестве контрольной группы использовались растения с предварительно удаленной корневой системой, помещенные в вакуум-эксикатор в условиях нормальной аэрации. Для исключения влияния фотосинтетической системы обе группы растений предварительно экспонировались в темноте в течение 24 ч до проведения эксперимента. На протяжении всего эксперимента растения также находились в условиях отсутствия источников света.

Для выделения митохондриальной фракции навеску (5 г) листьев кукурузы растирали в фарфоровой ступке со средой выделения: 0.15 М калий-фосфатный буфер (рН 7.4), 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорид калия, 4 мМ хлорид магния, 0.05% Тритон X-100 в соотношении 1 : 10. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 3 мин при 3000 g на центрифуге Eppendorf 5804R (“Eppendorf”, Германия). Супернатант центрифугировали 10 мин при 18000 g. Выделенную фракцию митохондрий разрушали осмотическим шоком в среде, содержащей 0.15 М калий-фосфатный буфер (рН 7.4). Степень разрушения митохондрий была более 90%, что контролировали методом микроскопии на Olympus CX41RF (“Olympus”, Япония). Полученную фракцию митохондрий использовали для определения активности 2-ОГДГ и МДГ. Все манипуляции проводили при температуре +4°C.

Активность 2-ОГДГ определяли спектрофотометрически на СФ-2000 (ЗАО “ОКБ Спектр”, Россия) по скорости образования НАДН в реакционной смеси следующего состава: 0.1 М калий – фосфатный буфер (рН 7.5), 0.05% Тритон X-100, 0.5 мМ MgCl₂, 2 мМ НАД⁺, 0.12 мМ литий-СоА, 0.2 мМ тиаминдифосфат, 2.5 мМ Cys-HCl, 1 мМ АМФ, 1 мМ 2-оксоглутарат калия, 5Е липоамид-

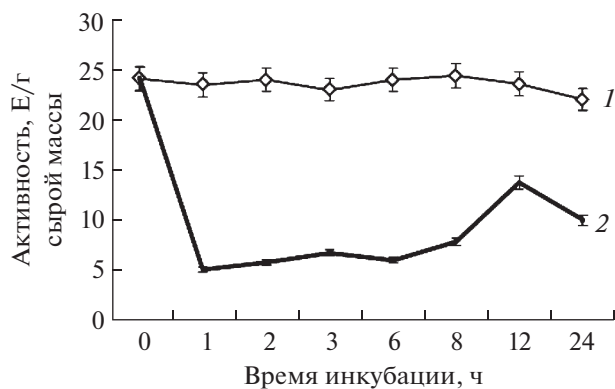


Рис. 1. Динамика ферментативной активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях гипоксии. 1 – контрольная группа растений; 2 – опытная группа растений.

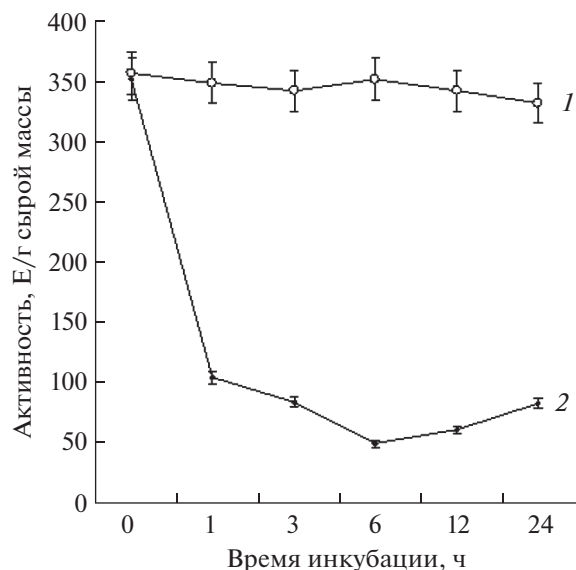


Рис. 2. Динамика ферментативной активности митохондриальной малатдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях гипоксии. 1 – контрольная группа растений; 2 – опытная группа растений.

дегидрогеназы (“Sigma”, США) [19]. В контроле использовали среду без 2-оксоглутарата калия.

Активность МДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм (поглощение восстановленного НАДН), в среде спектрофотометрирования следующего состава: 100мМ трис-НCl, рН–8.0, 1мМ оксалоацетат, 0.2 мМ НАДН, 10 мМ MgCl₂ [20].

РНК из растений выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [21].

Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (“Евроген”, Россия). Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей из GenBank с помощью программы Primer-BLAST (Supplementary, Table 1, 2). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция) с красителем SybrGreen I (“Евроген”, Россия). Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* [22]. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением 2^{-ΔΔC_t}-метода [23].

ДНК выделяли с помощью набора ПРОБА – ГС (“ДНК-Технология”, Россия) согласно рекомендациям производителя. Для исследования изменения статуса метилирования CpG-динуклеотидов промоторов генов *ogdh-1*, *ogdh-2*, *ogdh-3* 2-оксоглутаратдегидрогеназы и промотора гена *mMdh* малатдегидрогеназы была проведена бисульфитная модификация образцов ДНК [24]. Анализ промоторов исследуемых генов на наличие CpG-островков и подбор праймеров для МС-ПЦР осуществляли с помощью программы MethPrimer. Последовательности праймеров для проведения МС-ПЦР представлены в Supplementary (Table 3, 4).

Опыты проводили в 3–4-кратной повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони) [25]. Дополнительно применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при $P < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что в первые часы инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода наблюдалось сильное снижение активности 2-ОГДК, начиная с первого часа эксперимента (рис. 1). Группа контрольных растений не демонстрировала значительных изменений общей ферментативной активности (изменения в пределах колебаний). Анализ динамики активности митохондриальной формы МДГ также показал уменьшение ферментативной активности в первые часы эксперимента – количество ферментативных единиц снизилось почти в 3.5 раза в сравнении с контрольной группой растений (рис. 2).

Регуляция скорости функционирования энзимов в стрессовых условиях может быть связана как с

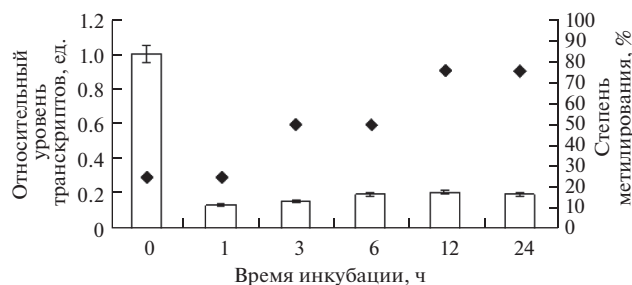


Рис. 3. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *ogdh-1* и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

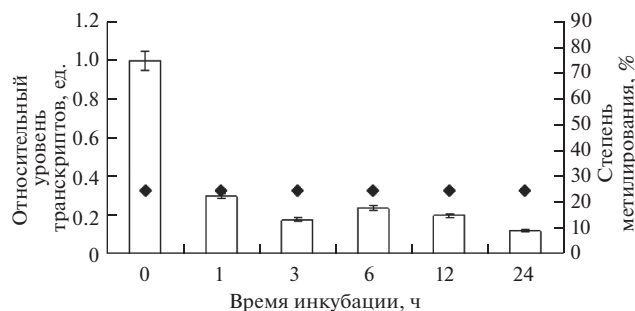


Рис. 4. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *ogdh-2* и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

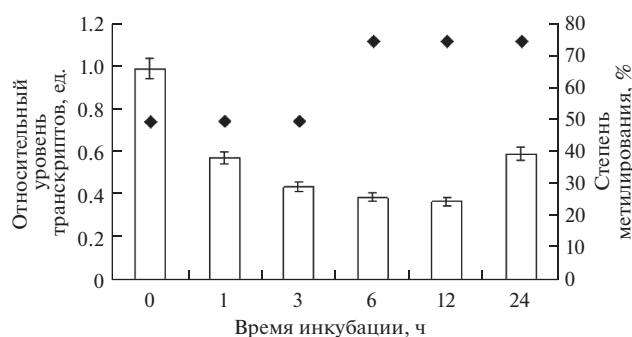


Рис. 5. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *ogdh-3* и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

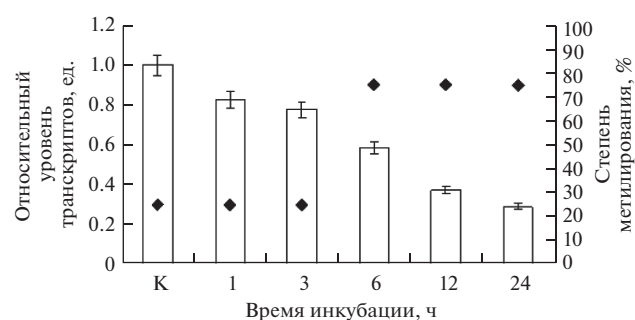


Рис. 6. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *mMdh* и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

конформационными трансформациями белковых молекул, так и с изменением транскрипционной активности генов исследуемых ферментов. В связи с этим нами было проведено исследование уровня транскриптов генов 2-ОГДГ и МДГ в условиях различного газового состава.

Проведенный анализ уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты 2-ОГДГ, выявил корреляцию с изменениями общей ферментативной активности. В группе растений, инкубация которых осуществлялась в среде с низким содержанием кислорода, наблюдалось снижение экспрессии генов 2-ОГДГ *ogdh-1*, *ogdh-2*, *ogdh-3* в 7.4, 3.3 и 1.7 раз, соответственно (рис. 3–5). Постепенное снижение относительного уровня транскриптов в условиях гипоксии было характерно и для гена митохондриальной формы МДГ (*mMdh*). К 24 часу эксперимента уровень транскриптов исследуемого гена начал снижаться (рис. 6). Полученные данные свидетельствуют о регуляции работы генов 2-ОГДГ и МДГ на уровне генома в листьях кукурузы при гипоксии.

Ранее уже упоминалось, что работа некоторых митохондриальных ферментов (сукцинатдегид-

рогеназы, фумаратгидратазы, АТФ-цитратлиазы) регулируется эпигенетически, за счет изменения метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов промоторов их генов [18, 26, 27]. В связи с этим нами был проведен анализ промоторных областей генов, кодирующих 2-ОГДГ и МДГ. Анализ промотора гена *ogdh-1*, кодирующего 2-оксоглутаратдегидрогеназу на наличие CpG-островков, показал, что в промоторной области данный ген не содержит ни одного CpG-островка (рис. 7а). Анализ гена *ogdh-2* позволил выявить в промоторной области наличие трех CpG-островков с размерами 118, 120 и 180 п.н. (рис. 7б). Промотор гена *ogdh-3* содержал два CpG-островка с размерами 116 и 591 п.н., соответственно (рис. 7в).

Исследование гена *mMdh*, кодирующего митохондриальную форму малатдегидрогеназы, показало, что в составе его промотора присутствуют два островка с высоким содержанием CG-динуклеотидов, размеры которых составляют 110 и 157 п.н. (рис. 7г). Наличие CpG-островков в промоторной области может говорить о возможном механизме регуляции работы исследуемых генов посредством изменения степени метилирования [28, 29].

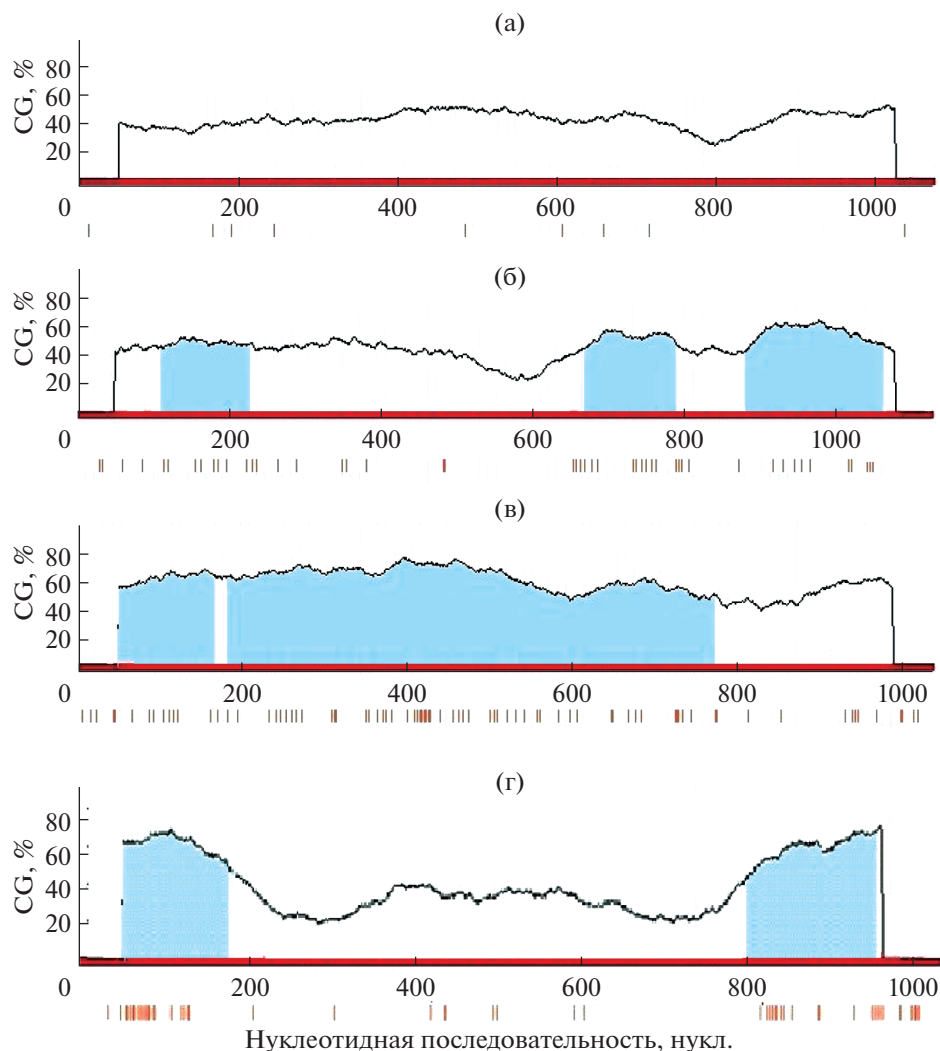


Рис. 7. Анализ промоторов исследуемых генов *Z. mays* на наличие CpG-островков: а) гена *ogdh-1* 2-оксоглутаратдегидрогеназы; б) гена *ogdh-2* 2-оксоглутаратдегидрогеназы; в) гена *ogdh-3* 2-оксоглутаратдегидрогеназы; г) гена *mMdH* митохондриальной формы малатдегидрогеназы. Вертикальными линиями указаны положения CpG-динуклеотидов.

В результате проведенного исследования по влиянию газового состава на степень метилирования CpG-динуклеотидов, входящих в состав промотора гена *ogdh-1* в геноме кукурузы, было установлено, что гипоксия вызывает значительные изменения в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов. При этом установлено, что снижение уровня транскриптов исследуемого гена сопровождалось постепенным увеличением степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов с 25 до 75% (рис. 3).

Для гена *ogdh-2* было установлено, что гипоксия не вызывает изменений метильного статуса исследуемых CpG-динуклеотидов. На протяжении всего времени эксперимента степень метилированных динуклеотидов составляла 25% в группе растений, инкубация которых осуществлялась в газовой среде с низким содержанием

кислорода. Контрольная группа растений, на протяжении всего эксперимента находящаяся в условиях нормальной газовой среды, демонстрировала сходные результаты (25% исследуемых CpG-динуклеотидов были метилированы).

В результате проведенного исследования степени метилирования гена *ogdh-3* показано, что низкие концентрации кислорода вызывают изменение величины метильного статуса CpG-динуклеотидов. В начале эксперимента степень метилированных динуклеотидов составляла 50%. Снижение значений относительного уровня транскриптов данного гена сопровождалось увеличением количества метилированных цитозинов. Спустя 24 ч от начала эксперимента степень метилирования промотора составляла 75%. На протяжении всего опыта в контрольной группе растений, находящейся в нормоксических условиях,

изменения степени метилирования CG-динуклеотидов не наблюдалось (50% всех исследованных цитозинов были метилированы). Ген, кодирующий митохондриальную форму МДГ, также продемонстрировал корреляцию между содержанием транскрипта исследуемого гена и изменением его метильного статуса. Количество метилированных цитозинов в промоторе гена за всё время эксперимента увеличивалось с 25 до 75%.

Таким образом, изменение активности митохондриальных ферментов 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы в гипоксических условиях обусловлено состоянием генетического аппарата клетки. Установлено, что колебания содержания транскриптов генов *ogdh-1* и *ogdh-3* сопряжено с изменением метильного статуса CG-динуклеотидов в их промоторах. Увеличение экспрессии генов связано со снижением степени метилирования их промоторов, в то время как уменьшение значений относительно уровня транскриптов было вызвано увеличением количества метилированных CG-динуклеотидов. Следовательно, регуляция функционирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в условиях низких концентраций кислорода осуществляется на эпигенетическом уровне посредством изменения метильного статуса промоторов их генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00296.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Devin A., Rigoulet M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. V. 292. P. 52.
2. Duchon M., Surin A., Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells // *Meth. Enzymol.* 2003. V. 361. P. 353.
3. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции // *Патогенез.* 2011. Т. 9. С. 4.
4. Narsai R., Rocha M., Geigenberger P., Whelan J., van Dongen J.T. Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytol.* 2011. V. 190. P. 472.
5. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.: Высш. шк., 2006. 743 с.
6. Медведев С.С. Физиология растений. М.: Высш. шк., 2004. 335 с.
7. Лукьянова Л.Д., Дудченко А.М., Цыбина Т.А., Германова Э.Л., Ткачук Е.Н., Эренбург И.В. Действие интервальной нормобарической гипоксии на кинетические свойства митохондриальных ферментов // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2007. Т. 12. С. 644.
8. Lukyanova L.D. Mitochondria signaling in adaptation to hypoxia // *Int. J. Phys. Pathophys.* 2014. V. 5. P. 1.
9. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia // *Am. J. Pathol.* 2004. V.164. P. 1875.
10. Seppet E., Gruno M., Peetsalu A., Gizatullina Z., Nguyen H.P., Vielhaber S., Wussling M.H., Trumbeckaite S., Arandarcikaite O., Jerzembeck D., Sonnabend M., Jegorov K., Zierz S., Striggow F., Gellerich F.N. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. P. 2252.
11. Machado A., Nuñez de Castro I., Mayor F. Isocitrate dehydrogenases and oxoglutarate dehydrogenase activities of baker's yeast grown in a variety of hypoxic conditions // *Mol. Cell Biochem.* 1975. V. 6. P. 93.
12. Pucciariello C., Parlanti S., Banti V., Novi G., Perata P. Reactive oxygen species-driven transcription in Arabidopsis under oxygen deprivation // *Plant Physiol.* 2012. V. 159. P. 184.
13. Wang Y., Guo Y.R., Liu K., Yin Z., Liu R., Xia Y., Tan L., Yang P., Lee J.H., Li X.J., Hawke D., Zheng Y., Qian X., Lyu J., He J., Xing D., Tao Y.J., Lu Z. KAT2A coupled with the alpha-KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase // *Nature.* 2017. V. 552. P. 273.
14. Yudina R.S. Malate dehydrogenase in plants: Its genetics, structure, localization and use as a marker // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2012. V. 3. P. 370.
15. Alexandrov N.N., Brover V.V., Freidin S., Troukhan M.E., Tatarinova T.V., Zhang H., Swaller T.J., Lu Y.P., Bouck J., Flavell R.B., Feldmann K.A. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. P. 179.
16. Войцековская С.А., Астафурова Т.П., Агеев Б.Г., Сапожникова В.А. Особенности биохимических механизмов адаптации к гипобарической гипоксии растений, различающихся по устойчивости // *Вестник ТГПУ. Сер. Естественные и точные науки.* 2003. В 4. С. 112.
17. Blokhina O., Törönen P., Fagerstedt K.V. Oxidative stress components explored in anoxic and hypoxic global gene expression data // *Low oxygen stress in plants. Plant Cell Monographs.* Wien: Springer-Verlag, 2014. V. 21. P. 19.
18. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychnina M.A., Igamberdiev A.U. Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 216. P. 197.
19. Araujo W.L., Nunes-Nesi A., Trenkamp S., Bunik V.I., Fernie A.R. Inhibition of 2-oxoglutarate dehydrogenase in potato tuber suggests the enzyme is limiting for respiration and confirms its importance in nitrogen assimilation // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. P. 1782.
20. Епринцев А.Т., Гатауллина М.О., Лященко М.С. Получение гомогенных препаратов изоформ НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы из мезофилла листьев кукурузы и изучение их физико-химических и каталитических свойств // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2016. Т. 52. С. 365.
21. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-

- chloroform extraction // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156.
22. *Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D.* House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 2907.
23. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method // *Methods.* 2001. V. 25. P. 402.
24. *Hsieh C.L.* Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. P. 46.
25. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 351 с.
26. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U.* Expression of genes encoding subunits A and B of succinate dehydrogenase in germinating maize seeds is regulated by methylation of their promoters // *Journal of Plant Physiology.* 2016. V. 205. P. 33.
27. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Dobychina M.A.* The role of methylation of CpG islands of the *csy3* gene promoter in the light regulation of ATP-citrate lyase activity in maize leaves // *Russ. J. Plant Physl.* 2019. V. 66. P. 259.
28. *Vanyushin B.F., Ashapkin V.V.* DNA methylation in higher plants: Past, present and future // *BBA.* 2011. V. 1809. P. 360.
29. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N. V., Wu T., Makhmud A., Popov V. N.* The role of promoter methylation in the regulation of genes encoding succinate dehydrogenase in maize seedlings. // *Russ. J. Plant Physl.* 2012. V. 59. P. 299.

ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА МОРФОГЕНЕЗ, СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ, Р, К, Са В РАСТЕНИЯХ *Eruca sativa*

© 2021 г. О. В. Наконечная^{а, *}, О. В. Грищенко^а, Ю. А. Хроленко^а, В. П. Булгаков^а,
Е. В. Бурковская^а, В. П. Григорчук^а, Н. А. Прокуда^а, А. С. Холин^б, И. В. Гафицкая^а,
А. В. Михеева^а, И. Ю. Орловская^а, М. Л. Бурдуковский^а, Е. П. Субботин^б, Ю. Н. Кульчин^б

^аФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

^бИнститут автоматизации и процессов управления Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

*e-mail: markelova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 22.05.2020 г.

После доработки 01.08.2020 г.

Принята к публикации 03.08.2020 г.

Изучено влияние разных спектров светодиодных (СД) источников в процессе культивирования на развитие растений *E. sativa* сорта “Диковина”. Исследование проведено с использованием 4 собранных нами СД светильников: солнечный бокс (SB), красно-зелено-синий (RGB), красно-синий (FS) и теплый белый (WW) в качестве контроля, с соотношением энергий в диапазоне синий-зеленый-красный 14% : 48% : 38%. Спектры SB (26% : 41% : 33%), RGB (32% : 19% : 49%) и FS (27% : 11% : 62%) использованы при постановке экспериментов для получения 9 различных вариантов освещения со сменой спектров в процессе культивирования. Растения под вариантами освещения FS-RGB, SB-FS и RGB-SB характеризовались максимальными значениями сырой массы побега. Перенос растений в бокс SB привел к замедлению развития корневой системы у растений. Изменение мезоструктуры листа при переносе в бокс SB свидетельствовало о том, что условия этого бокса способствовали формированию структуры листа с более низкими мембранными индексами, с видоизмененными по форме клетками мезофилла. В то же время, выращивание растений в течение двух недель при SB, а затем четырех недель при FS стимулировало развитие внутренней ассимиляционной поверхности листа с максимальными интегральными индексами поверхности наружных мембран клеток листа (ИМК) и хлоропластов (ИМХ), в сравнении с другими вариантами опыта. Как следствие этого, у растений SB-FS образовалась максимальная сухая масса побега и корней. Растения бокса FS без смены освещения уступали контрольным (WW) по показателям мезоструктуры листа и занимали вторую позицию среди других вариантов. Максимальное накопление Р и Са отмечено для группы FS-RGB, где выявлены максимальные значения процента сухого вещества побега и корней, а также максимальная концентрация аскорбиновой кислоты. Перенос растений из других боксов в FS приводил к снижению аккумуляции макроэлементов в растениях *E. sativa*. Таким образом, применение гибкого графика освещения при культивировании растений *E. sativa* влияет на их характеристики и может быть использовано для оптимизации выращивания растений.

Ключевые слова: *Eruca sativa*, Индау диковина, спектр света, светодиоды, мезоструктура листа, аскорбиновая кислота, кальций, калий, фосфор, защищенный грунт

DOI: 10.31857/S0015330321020135

ВВЕДЕНИЕ

Свет — электромагнитное излучение, является одним из самых важных сигналов, который влияет

Сокращения: Аск — аскорбиновая кислота, ИМК — индекс поверхности наружных мембран клеток листа, ИМХ — индекс поверхности наружных мембран хлоропластов, КОХ — объем клетки, приходящийся на один хлоропласт, СД — светодиоды, ЭТЦ — электрон-транспортные цепи, красно-зелено-синий спектр (RGB), красно-синий спектр (FS), спектр солнечного бокса (SB), спектр теплого белого света (WW).

на развивающиеся растения, регулирует их реакции [1, 2], определяет габитус [3, 4 и др.] и химический состав [5]. При изменении спектрального состава запускается сигнальная система внутри растения [6], действие которой направлено на балансирование или снижение негативного воздействия стрессового фактора. Считается, что качество света оказывает более сложное влияние на морфологию и физиологию растений по сравнению с интенсивностью света и фотопериодом [7]. Каче-

ство света влияет на формирование и накопление фотосинтетических пигментов листьев [8], экспрессию генов растений посредством инициирования сигнального каскада фоторецепторов [9], определяет морфологические различия у растений, культивируемых под одним спектром, но с разным периодом световой обработки [10].

К настоящему времени накоплен определенный опыт по выращиванию растений при разных интенсивностях освещения и под разными спектрами [3, 4 и др.]. Монохроматический свет любой длины волны не способствует нормальному росту растений [10]. Длины волн красного, синего и зеленого света присутствуют в солнечном спектре. При этом оптимальное сочетание трех вариантов света для роста разных растений может отличаться [10]. Ответ растения на свет и его изменение для каждого вида, а иногда и сорта может быть специфичен [11]. Поэтому исследование реакции разных видов растений на изменение света является актуальным. В нашей работе было исследовано влияние 4 источников светодиодного (СД) освещения с разной долей красного, синего и зеленого света. Один из источников (SB) имеет спектр освещения, схожий со спектром Солнца [11].

Объект исследования – салат рукола Индау (*Eruca sativa* Mill., Brassicaceae) сорта “Диковина”. Эти растения – однолетники, относятся к ранне- и среднеспелым культурам длинного дня; листья собраны в полуприподнятую розетку, высотой от 18 до 20 см. Короткий жизненный цикл растений данного сорта, а также их компактность является преимуществом перед другими сортами *E. sativa* при постановке экспериментов. *E. sativa* – важный источник биогенного йода; содержание пролина в биомассе *E. sativa* в 2 раза больше, чем в мяте, шнитт-луке, салате, базилике, кинзе [12]. В растениях *E. sativa* выявлена аскорбиновая кислота (Аск). Она участвует во многих окислительно-восстановительных реакциях, оказывает общестимулирующее влияние на иммунитет человека. Аск не образуется в организме человека, а поступает только с пищей [13]. *E. sativa* богата макро- и микроэлементами (Ca, K, P, Na, Zn, Fe, Mn, Cu, Mo, B) [16], необходимыми для благополучного функционирования организма человека. Так, калий участвует в нормализации ритмов сердечной мышцы, оптимизации кровяного давления, равновесии кислотно-щелочного баланса и регулировании активности ферментов, связанных с превращением белков и углеводов и др. [14]. Фосфор – компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов, АТФ; связан со всеми системами преобразования энергии в живой клетке [15]. Кальций необходим для построения костной ткани; принимает участие в регуляции проницаемости клеточных мембран, механизме мышечного сокращения, секреции и действии гормонов,

контролирует ряд ферментных процессов, участвующих в свертывании крови [16].

Исследования по выращиванию *E. sativa* под разными спектрами представлены в ряде работ. Так, установлено, что добавление синего света в диапазоне (420–450 нм) к основному излучению натриевой лампы высокого давления не повлияло на флуоресценцию хлорофилла, длину стеблей, количество биомассы растений *E. sativa*, но увеличило интенсивность фотосинтеза и количество листьев [17]. Также проверяли влияние белого освещения с цветовой температурой 5000К (в диапазоне 400–700 нм, с пиками 430 и 550 нм), монохромных синего (440) и красного (660 нм) света в качестве досветки к естественному освещению в теплице при выращивании *E. sativa* сорта “Рокет”. При использовании белого и красного СД освещения масса надземной части растений была максимальной, тогда как при синем свете значения были минимальными, по сравнению с контролем (естественный свет) [18]. Канадские авторы, исследовавшие воздействие синего (450 нм) и красного (660 нм) освещения на развитие *E. sativa* сорта “Рокет”, получили противоположные данные [19]. В этом исследовании использовали СД лампы: чистый красный (660 нм), чистый синий (450 нм), сочетание синего и ультрафиолетового (UVA), а также сочетание синего и дальнего красного света. Было установлено, что синий свет во всех сочетаниях способствует более быстрому росту растений, по сравнению с красным светом [19]. Аналогичные результаты были показаны при культивировании *E. sativa* сорта “Рокет” под красным (665 нм) и синим (440 нм) светом СД ламп и 6 вариантах интенсивности света (20, 70, 120, 250, 450 и 650 мкмоль/(с м²)) [20]. Было выявлено, что после 7–8 дней эксперимента синий свет способствовал удлинению гипокотыля и черешков листьев, по сравнению с красным светом при разных уровнях интенсивности; растения под синим светом отличались меньшими показателями биомассы и размеров семядолей, по сравнению с таковыми под красным светом. Вытягивание гипокотыля уменьшалось при повышении интенсивности света [20].

Влияние разного света на содержание макроэлементов P, K, Ca, а также Аск не изучали в растениях *E. sativa*. Действие разного сочетания красного, синего и зеленого света на развитие растений *E. sativa* не исследовано. Целью работы было изучение физиологического ответа растений *E. sativa* сорта “Диковина” на изменяющееся СД освещение для выявления оптимальных условий, определяющих получение максимальных значений морфометрических, мезоструктурных параметров, содержание аскорбиновой кислоты, накопление макроэлементов P, K, Ca.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение развития растений *E. sativa* при воздействии освещения разного спектрального состава проводили в Федеральном научном центре биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) в 2020 г. Для эксперимента использовали семена *E. sativa* сорта “Диковина” урожая 2018 г. компании ООО “Приморские семена” (п. Тимирязевский, Приморский край).

Семена замачивали в дистиллированной воде на 3 дня. После появления зародышевого корешка проростки помещали в пластиковые горшки объемом 10 см³, заполненные почвогрунтом. Для посадки использовали готовый почвогрунт для садово-огородных растений, цветов и рассады “Универсальный” с содержанием элементов: азот – 160–240 мг/л, фосфор – 145–215 мг/л, калий – 180–290 мг/л, магний – 135 мг/л, гуминовые вещества – 35 мг/л, pH водного раствора – 5.5–7 (ООО “Терра мастер”, Новосибирск). Для эксперимента использовали хорошо развитые проростки примерно одинакового размера. Расстояние от горшка до источника света составляло 80 см. Растения выращивали в почве при средней температуре 21°C, влажности воздуха 70% и световом режиме 16 часов света и 8 часов темноты. Полив растений проводили раз в два дня. Сразу после посадки горшки с проросшими семенами поме-

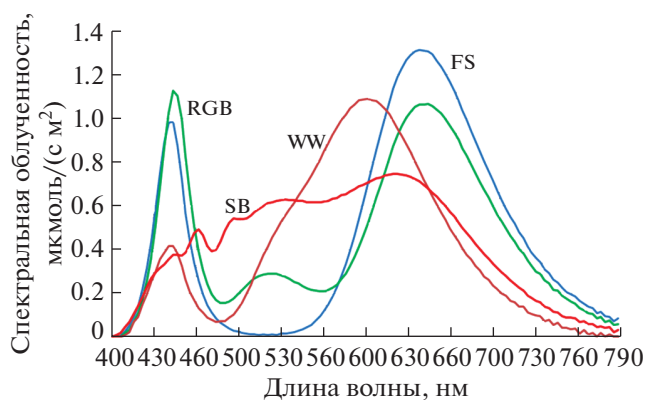


Рис. 1. Сводные спектры излучения источников света с интенсивностью облучения 150 мкмоль/(с м²).

стили в 4 бокса (SB, RGB, FS и WW) экспериментальной установки, сконструированной в Лазерном центре Института автоматики и процессов управления ДВО РАН (ЛЦ ИАПУ ДВО РАН). Каждый отсек оснащен СД светильниками с разными спектральными характеристиками (рис. 1, табл. 1). Соотношение энергий в диапазоне синий-зеленый-красный для светильника SB равно 26% : 41% : 33%, для RGB – 32% : 19% : 3.1%, для FS – 27% : 11% : 62%.

Для выравнивания условий освещения у всех растений внутри боксов создавали диффузное

Таблица 1. Сводные спектральные характеристики исследованных источников света

Параметр	Единица измерения	Тип светильника			
		SB	RGB	FS	WW
Максимальная облученность в диапазоне длин волн	$E_{e_{max}}$, мВт/м ²	145.00	301.00	264.00	219.00
Общая ФАР облученность (400–700 нм)	E_e (PAR), Вт/м ²	33.10	32.40	31.60	31.40
	PPFD, мкмоль/(с м ²)	154.70	153.40	154.60	150.30
	%	100.00	100.00	100.00	100.0
Плотность фотосинтетического фотонного потока / PPFD					
Синий (400–500 нм)	E_e (PAR), Вт/м ²	8.40	10.30	8.50	4.50
	PPFD, мкмоль/(с м ²)	32.60	38.70	31.60	16.90
	%	25.47	31.79	26.84	14.36
Зеленый (500–600 нм)	E_e (PAR), Вт/м ²	13.60	6.20	3.40	15.0
	PPFD, мкмоль/(с м ²)	62.70	28.50	16.40	70.20
	%	41.09	19.04	10.70	47.77
Красный (600–700 нм)	E_e (PAR), Вт/м ²	11.10	15.90	19.70	11.90
	PPFD, мкмоль/(с м ²)	59.30	86.20	106.50	63.20
	%	33.38	49.17	62.37	37.83

освещение с помощью наклеивания на внутренние боковые стенки светоотражающей пленки, формирующей рассеянный свет. Для создания одинакового уровня освещенности подбирали мощность излучения каждого светильника с помощью световых драйверов (EUM-150S105DG, Китай). Уровень освещенности контролировали спектрофотометром “ТКА-Спектр” (НТП “ТКА”, Россия).

Исследовали влияние разного освещения с биарными динамическими спектрами на морфометрические показатели растений, т.е. эксперимент начинали под одним спектром излучения, заканчивали под другим. Выращивание 45 растений в каждом отсеке проводили две недели. Далее по 15 растений из каждого бокса (SB, RGB, FS) были переставлены так, что в каждом экспериментальном боксе оказались растения из других боксов (SB-RGB, SB-FS, RGB-SB, RGB-FS, FS-RGB, FS-SB); по 15 растений остались в исходных боксах без перестановки (SB-SB, RGB-RGB, FS-FS). Выращивание растений до конца эксперимента проводили еще 4 недели.

Бокс WW (теплый белый с цветовой температурой 3500K), используемый для контроля, оснащен источником света, который имеет два основных максимума излучения на длинах волн 440 и 590 нм, с глубоким провалом на длине волны 480 нм между ними (рис. 1, табл. 1). Соотношение энергий внутри диапазонов синий-зеленый-красный равно 14% : 48% : 38%. Растения в боксе WW оставались весь эксперимент без перестановки.

Для оценки результатов изучали морфометрические показатели (число листьев, их длину и ширину, длину черешков, сырую и сухую массу побега и корней, процент сухого вещества побега и корней, соотношение массы корня к общей сырой массе растения, характеристики мезоструктуры листа), содержание Аск и макроэлементов (P, K, Ca).

Исследование мезоструктуры. Параметры ассимиляционного аппарата листа изучали у растений во всех вариантах опыта, для анализа использовали третий настоящий лист. Мезоструктурный анализ оценивает следующие группы параметров мезофилла листа: объемные, связанные с размерами клеток и хлоропластов, и численные, которые связаны с их числом на единицу площади листа. Клетки и хлоропласты принимаются как модели разных геометрических фигур (цилиндра, сферы, эллипсоида вращения и т.д.), объемы которых описываются математическими уравнениями. В уравнениях используются измерения длины и толщины клеток и хлоропластов, соответственно. Детальная методика исследования приведена нами ранее [21].

Методика определения аскорбиновой кислоты. К навеске предварительно измельченного сырого образца (250 мг) добавляли 1 мл раствора муравьиной кислоты (0.5%) в воде. Полученную смесь

интенсивно перемешивали в течение 20 минут в шейкере, затем помещали на 15 минут в центрифугу (18000 об/мин, 4°C). Полученный экстракт анализировали ВЭЖХ с диодно-матричным детектором (1260 “Infinity, Agilent”, США). Элюирование проводили на двух последовательно соединенных колонках Zorbax C18 (150 * 2.1 мм, 3.5 мкм, “Agilent”, США) в изократическом режиме, в качестве элюента использовали раствор муравьиной кислоты (0.1%) в воде. Сигнал детектора записывали при 263 нм. Содержание Аск в образцах рассчитывали методом внешнего стандарта, для определения градуировочной характеристики использовали коммерчески доступный L-Ascorbic acid (99%, “Sigma”, США).

Методика определения макроэлементов. Элементный состав (P, K, Ca) исследовали методом рентгенофлуоресцентного анализа на энергодисперсионном спектрометре “Shimadzu EDX-800HS” (Япония). Для этого 1 г тонкоизмельченного растительного материала запрессовывали с помощью гидравлического пресса в таблетку-излучатель диаметром 13 мм. Для градуировки средств измерений использовали стандартные образцы: ГСО 9091-2008, ГСО 10-173-2011, ГСО 93-18-2009, ГСО 10-176-2011, ГСО 8922-2007, ГСО 8923-2007.

Результаты были обработаны статистически с использованием пакета “Statistica” версии 13.0. Диаграммы построены на основе средних арифметических значений измеренных параметров со стандартной ошибкой. Для сравнений групп растений, культивируемых при разных вариантах освещения, использовали тест ANOVA и сравнение с контрольными растениями с учетом *t*-критерия Стьюдента для 95% уровня значимости. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрические параметры. В течение первых 14 дней культивирования ростовые характеристики растений были сходными (рис. 2). Так, растения трех боксов (WW, SB, FS), кроме группы RGB, по длине гипокоты были близки по значениям к контрольным, выращиваемым в условиях теплого белого света WW. У 25% растений WW наблюдали отставание в разворачивании четвертого листа, в то время как у растений SB отметили разворачивание пятого листа. По длине первого листа меньшими значениями характеризовались растения бокса FS, в то время как по ширине первого листа отставания не наблюдали, по сравнению с растениями WW.

Анализ результатов, полученных после 6 недель роста растений, выявил, что максимальную сырую надземную массу накапливали растения в варианте освещения FS-RGB (рис. 3а). Растения, перене-

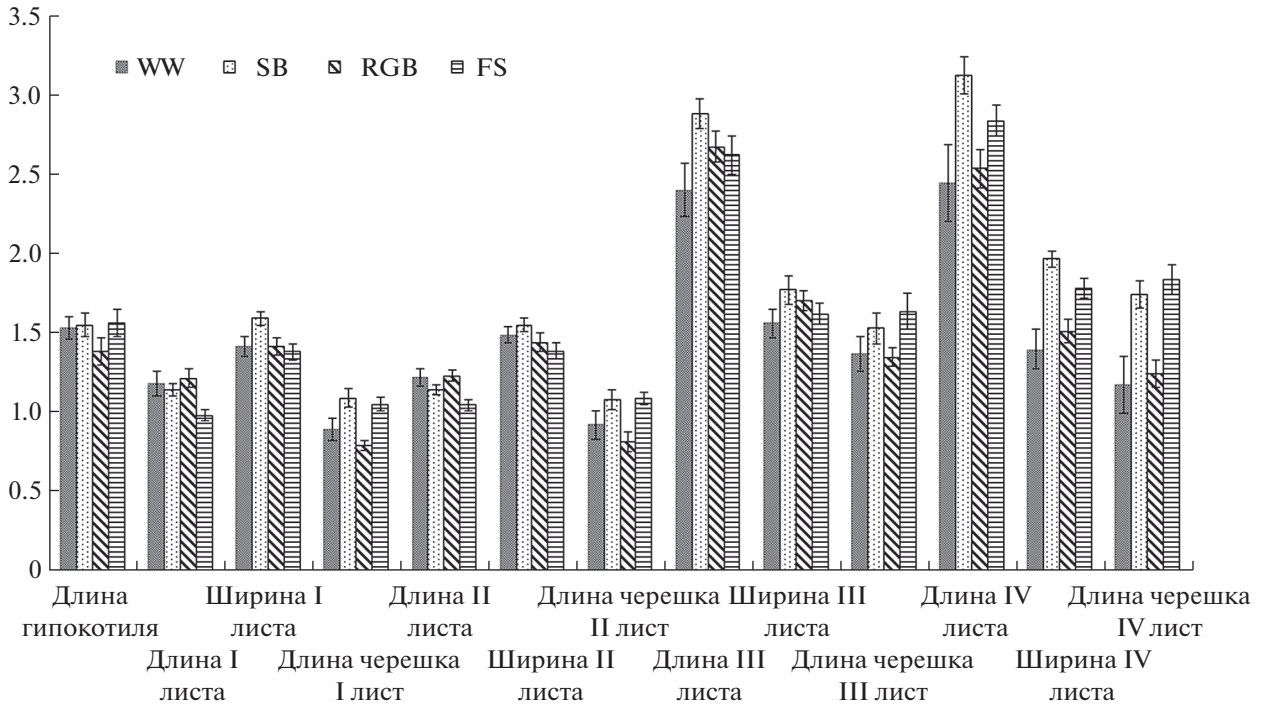


Рис. 2. Диаграмма морфометрических характеристик ювенильных растений *Eruca sativa* сорт “Диковина”, культивируемых под разным спектральным светодиодным освещением 2 недели.

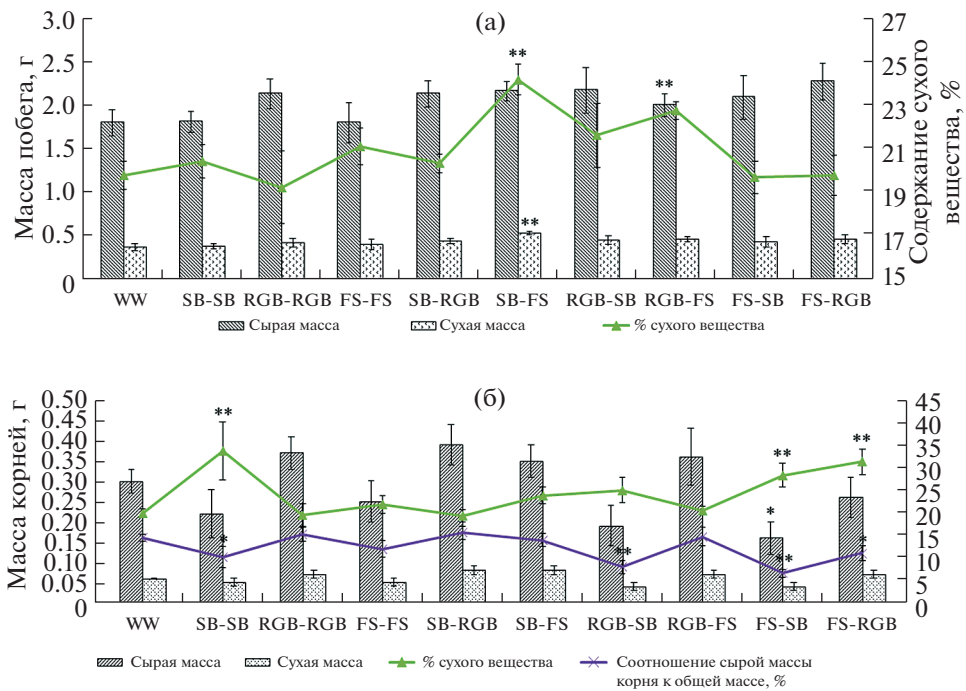


Рис. 3. Диаграмма морфометрических характеристик растений *Eruca sativa* сорт “Диковина”, культивируемых под разным спектральным светодиодным освещением 6 недель. * – достоверность $P < 0.05$ по отношению к контролю; ** – достоверность $P < 0.01$ по отношению к контролю.

Таблица 2. Мезоструктурные характеристики листьев *Eruca sativa* сорт “Диковина”, выращенных в течение 6 недель на свету разного спектрального состава

Параметры	WW-контроль	SB-SB	RGB-RGB	FS-FS	SB-RGB	SB-FS	RGB-SB	RGB-FS	FS-SB	FS-RGB
Толщина листа, мкм	301 ± 1.47	257 ± 3.73	237.00 ± 2.03	254.22 ± 5.13	224.93 ± 2.93	293.67 ± 2.03	205.87 ± 2.71	245.50 ± 2.32	218.73 ± 2.22	217.20 ± 7.92
Число хлоропластов в 1 см ² листа, млн.	19.46 ± 0.81	20.34 ± 1.6	19.26 ± 1.38	24.02 ± 1.54	34.94 ± 1.5*	34.34 ± 2.7*	23.3 ± 3.09	29.01 ± 0.74	22.24 ± 2.87	24.35 ± 1.55
КОХ палисадных клеток, мкм ³	635 ± 28	488.96 ± 21,41	701 ± 15	661 ± 11	290 ± 8	642 ± 64	239 ± 11	366 ± 17	379 ± 15	292 ± 5
КОХ губчатых клеток, мкм ³	475 ± 11	224 ± 8	426 ± 17	398 ± 14	191 ± 11	289 ± 19	164 ± 8	223 ± 13	300 ± 11	137 ± 3
ИМК	17.29	13.48	16.93	21.44	15.51	26.17	9.96	16.96	14.46	10.47
ИМХ	13.30	16.04	17.49	31.81	25.42	41.85*	23.41	23.42	27.62	27.1

сенные из бокса SB в боксы RGB и FS (SB-RGB, SB-FS), а также выращиваемые на протяжении всего эксперимента в боксе RGB, имели тенденцию к более активному накоплению сырой массы побега. Достоверная разница значений сырой массы выявлена между растениями вариантов SB-SB и SB-FS.

Корневая система была лучше развита у растений вариантов RGB-RGB, SB-RGB и RGB-SB (рис. 3б). Наименьшие значения сырой массы корней отмечены у растений варианта FS-SB, этот показатель был в 2 раза меньше, чем у контрольной группы WW. Достоверные различия по значению сырой массы корней выявлены у растений SB-SB и SB-RGB, RGB-RGB и RGB-SB, SB-SB и RGB-RGB пар вариантов.

Максимальное значение сухой зеленой массы отмечено для SB-FS (рис. 3). Достоверное увеличение процента сухого вещества побега выявлено у растений SB-FS и RGB-FS. Процент сухого вещества корней был достоверно выше у растений вариантов SB-SB, FS-SB и FS-RGB. Максимальные значения отношения сырой массы корня к общей массе растения отмечены у растений из вариантов SB-RGB, RGB-RGB и WW (рис. 3). Минимальные значения данного отношения были получены для растений, перенесенных в бокс SB из боксов RGB и FS.

Анализ мезоструктуры листа. В табл. 2 и на рис. 4 приведены характеристики мезоструктуры листьев растений, выращенных при разных спектральных условиях освещения, по сравнению с контролем (бокс WW). Во всех вариантах опыта в листьях наблюдали дифференциацию мезофилла на столбчатую и губчатую ткани (рис. 5). Столбчатая ткань представлена 2–3, а губчатая 4–5 сло-

ями клеток. Соотношение длины палисадной клетки к ее ширине изменяется от 1.5 до 2.2. Для растений варианта SB-RGB отличительной особенностью мезофилла листа является наличие второго слоя столбчатых конусовидных клеток (рис. 5д). Крупные дланевидные клетки встречаются в листьях растений варианта RGB-RGB (рис. 4а, 5в). Максимальное значение индекса поверхности наружных мембран клеток (ИМК) в опыте у варианта SB-FS, минимальное значение индекса поверхности наружных мембран хлоропластов (ИМХ) наблюдается в контроле WW (табл. 2).

Содержание Аск. Результаты ВЭЖХ анализа показали, что под разными спектрами освещения накопление Аск варьировало от 0.88 мг/г (RGB-FS) до 2.14 мг/г (FS-RGB) и в среднем составило 1.37 ± 0.12 мг/г (рис. 6а). Достоверное увеличение содержания Аск наблюдали в растениях под FS-RGB, в сравнении с контролем (WW) и другими вариантами освещения, за исключением SB, RGB-SB и FS-SB. В группе растений SB наибольшее содержание Аск было в растениях, выращенных без смены спектра освещения. Достоверно меньше оно было в растениях SB-RGB. В группе растений RGB наблюдали увеличение накопления Аск в растениях варианта RGB-SB и снижение его накопления в растениях варианта RGB-FS. В группе из бокса FS достоверно больше Аск накапливали растения FS-RGB в сравнении с FS-FS. В целом, наблюдается тенденция к снижению содержания Аск в растениях разных исходных боксов, переставленных в FS бокс, по сравнению с исходными боксами SB и RGB. Во время как в растениях из бокса FS, переставленных в другие боксы, содержание аскорбиновой кислоты увеличивалось.

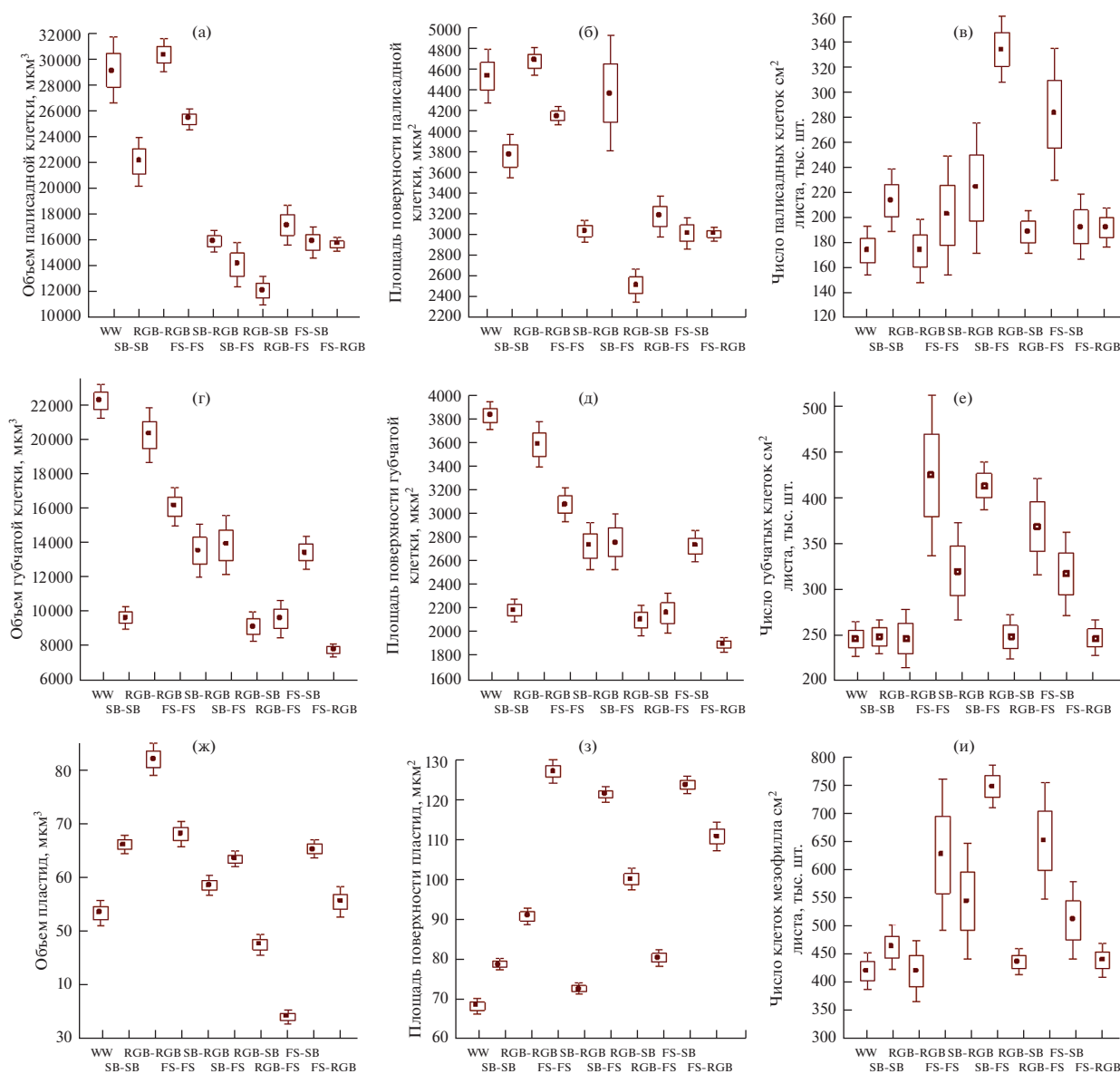


Рис. 4. Диаграмма размаха параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата листа *Eruca sativa* сорт “Диковина” в зависимости от разного спектрального состава светодиодных светильников. а) изменение объема палисадной клетки; б) изменение площади поверхности палисадной клетки; в) изменение числа палисадных клеток в см^2 листа; г) изменение объема губчатой клетки; д) изменение площади поверхности губчатой клетки; е) изменение числа губчатых клеток в см^2 листа; ж) изменение объема пластиид; з) изменение площади поверхности пластиид; и) изменение числа клеток мезофилла в см^2 листа. \square — среднее значение; \square — среднее значение \pm стандартная ошибка; I — среднее значение $\pm 1.96 \times$ стандартная ошибка.

Содержание макроэлементов. Содержание макроэлементов в растениях разных вариантов освещения варьировало (рис. 6б), составляя в среднем для всех растений эксперимента $1.37 \pm 0.09\%$ для К, $1.88 \pm 0.09\%$ для Са, $0.16 \pm 0.00\%$ для Р. Максимальные значения содержания К отмечены у растений варианта RGB-RGB. При перестановке растений в другие боксы содержание К уменьшалось. Достоверно большее, чем в контроле (растения варианта WW), содержание К отмечено в SB-SB, и оно также снижалось при смене бокса. Мини-

мальные значения накопления К наблюдали у растений, перенесенных в FS из других боксов. Среди образцов, выращенных в группе FS, значительно возросло содержание К в FS-RGB. Содержание Са было примерно одинаково у растений большинства боксов. Снижение наблюдали у растений SB-RGB, SB-FS, RGB-FS и FS-SB. Максимальное накопление Р выявлено у растений варианта FS-RGB, а минимальное значение отмечено у растений варианта RGB-FS.

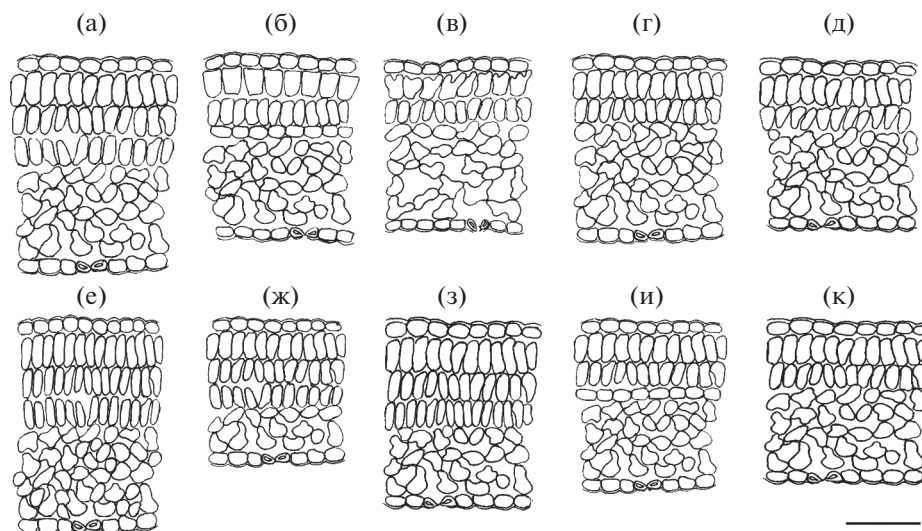


Рис. 5. Схемы строения мягких тканей мезофилла листа растений *Eruca sativa* сорт “Диковина”, культивируемых под разным спектральным светодиодным освещением. а) WW; б) SB-SB; в) RGB-RGB; г) FS-FS; д) SB-RGB; е) SB-FS; ж) RGB-SB; з) RGB-FS; и) FS-SB; к) FS-RGB. Масштаб: 100 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфометрические параметры. Можно отметить, что за 14 дней растения бокса SB демонстрировали более высокую скорость развития по сравнению с растениями трех других боксов, включая контроль (WW). Можно заключить, что уже через 2 недели проявляются особенности развития растений при воздействии света разного спектрального состава.

Анализ результатов, полученных после 6 недель роста растений, выявил, что растения, выращенные при разных вариантах освещения, отличались по значениям морфометрических параметров. Увеличение доли красного света на 16 и 29% при перестановке в боксы RGB и FS, соответственно, способствовало накоплению сырой массы побега. Наблюдаемая тенденция согласуется с опубликованными ранее данными по растениям салата (*Lactuca sativa*) “Waldmann’s Green”, выращенными с использованием четырех видов освещения различного спектра (красно-синий, RB; холодный белый флуоресцентный, CWF; красно-сине-зеленый, RGB; зеленый флуоресцентный, GF) [22]. Было показано, что максимальная сырая и сухая масса получена у растений варианта RGB, значения массы растений CWF и RB близки [22]. Аналогичные результаты получены при выращивании *L. sativa* сорта “Capitata” с применением четырех спектров: белого СД (RBW), флуоресцентного белого (FL), красного и красно-синего. Максимальные значения свежей и сухой массы отмечены у растений RBW и FL [23].

В нашем эксперименте значения показателя сухой массы у растений не отличались в зависимости от условий освещения, за исключением

SB-FS, у которого значение сухой зеленой массы максимально. Вероятно, снижение доли зеленого света в спектре на 30% способствовало увеличению накопления сухого вещества в побегах, как это показано ранее для *L. sativa* [24], и снижению накопления воды. Поскольку максимальное значение процента сухого вещества корней отмечено у растений вариантов SB-SB, FS-SB и FS-RGB, можно предположить, что увеличение доли зеленого света на 30% (для FS-SB) и 8% (для FS-RGB), сохранение 41% для SB-SB в спектре при смене варианта освещения привело к более активному накоплению сухого вещества в корнях. Можно сделать вывод о разнонаправленности влияния зеленого спектра на развитие надземной и подземной частей растений.

Анализируя полученные максимальные значения отношения сырой массы корня к общей массе растения, отмеченные у растений из 4 вариантов (SB-RGB, RGB-RGB, RGB-FS и WW), и минимальные значения данного отношения для растений, перенесенных в бокс SB из боксов RGB и FS, можно отметить, что использование освещения бокса SB на втором этапе культивирования ведет к подавлению развития корневой системы. Это может быть связано с изменением соотношения энергий внутри диапазонов зеленый-красный у светильника SB в сторону увеличения доли зеленого. Так, это соотношение у SB ~1.2 (41% : 33%), в то время как у светильников RGB и FS оно составляет 0.38 (19% : 49%) и ~0.18 (11% : 62%), соответственно. В то же время доля синего света в спектре светильников примерно одинаковая. Ранее при исследовании *L. sativa* сорта “Waldmann’s Green” было показано, что увеличение доли зеленого

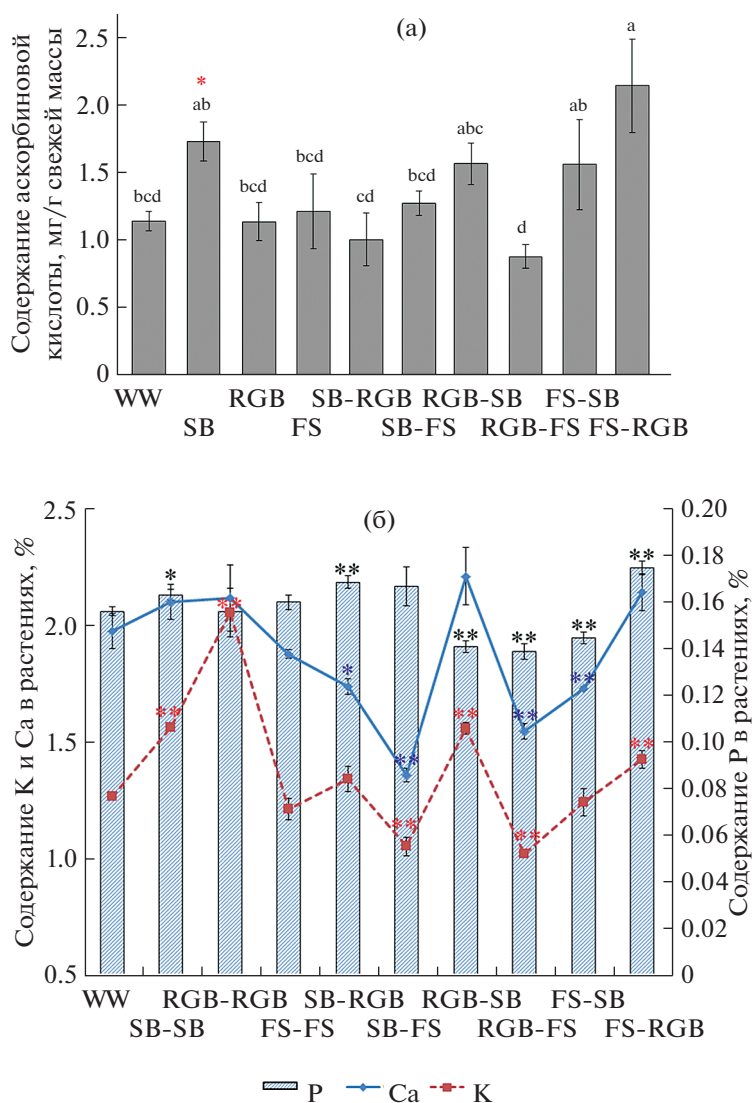


Рис. 6. Содержание аскорбиновой кислоты и макроэлементов К, Са и Р в листьях *Eruca sativa* сорт “Диковина”, $P \leq 0.05$. а) аскорбиновая кислота; б) макроэлементы. * – достоверность $P < 0.05$ по отношению к контролю; ** – достоверность $P < 0.01$ по отношению к контролю.

света в спектре привело к снижению накопления свежей и сухой массы растений [22].

Анализ мезоструктуры листа. В растениях вариантов освещения SB-FS и RGB-FS палисадная паренхима увеличивается до трех слоев, также иногда третий слой палисадной ткани появляется в контрольной группе WW и группе RGB-SB (рис. 5а, е, ж, з). Палисадные клетки типичные, однако, они различались по отношению их длины к ширине в зависимости от спектрального состава СД. Облучение светом с RGB спектром как после SB, так и после FS привело к увеличению соотношения длины палисадной клетки к ее ширине до 2.0, в то время как при постоянном выращивании под RGB спектром это соотношение было меньше (1.5). Самые толстые листья развива-

лись у образцов контроля (WW) и варианта SB-FS (табл. 2, рис. 5а, е), различия между ними находятся в пределах погрешности. Однако, листья этих образцов очень сильно различаются по клеточному и пластидному наполнению (рис. 4в, е, и, табл. 2). По числу клеток на единицу листовой поверхности растения варианта SB-FS превышают таковые в контроле практически в 2 раза и, как следствие, эти растения имеют максимальные значения ИМК (табл. 2, рис. 4и). Группы растений SB-RGB и SB-FS имели достоверно большее (на 39%) число хлоропластов на единицу площади листа, по сравнению с контролем (WW) (табл. 2). Максимальное ИМХ при варианте SB-FS формируется благодаря наибольшему пластидному наполнению листа, что сочетается с наивысшими значе-

ниями ИМК. Именно у растений данной группы были получены максимальные значения сухой массы надземной части и корней, а также процент сухого вещества.

Постоянное облучение RGB спектром способствовало формированию крупных дланевидных столбчатых клеток (рис. 4а, 5в). Влияние RGB спектра также прослеживалось и на размерах пластид: хлоропласты увеличились на 36% по сравнению с WW (контроль) (рис. 4ж). Появление переходной ткани между палисадной и губчатой паренхимой, сложной из округлых клеток, наблюдали у растений вариантов SB-SB, FS-SB (рис. 5б, и). Проекция палисадных клеток верхнего слоя варианта SB-SB приобретала форму перевернутых трапеций (рис. 5б), а хлоропласты палисадных клеток варианта FS-SB имели парастрофное расположение.

Известная литература о влиянии СД источников на мезоструктуру ФА листа свидетельствует о том, что это воздействие видо- и сортоспецифично. Спектр света не влиял на мезоструктуру листьев капусты *Brassica chinensis* L. [25], а у микрорастений картофеля толщина листьев, палисадной и губчатой паренхимы под RGB светом значительно увеличилась, в сравнении с контрольным белым (люминесцентным), RB и R (красным) спектрами, что сказывалось на сырой и сухой массе растений [26].

Изменения, наблюдаемые в структуре листа растений при переносе в SB, свидетельствуют о том, что для *E. sativa* условия освещения бокса SB не соответствуют оптимуму и, как следствие, это отражается на плохом развитии корневой системы (рис. 3б). Минимальное значение ИМК обнаружено в варианте RGB-SB, для него характерны самые низкие в опыте значения толщины листа, размеров клеток и пластид, а также КОХ объема и для палисадной и губчатой ткани, соответственно (табл. 2).

Палисадные клетки дольше растут в длину при обработке RGB спектром после SB и FS, причем у последнего варианта при этом увеличивается синтез Аск и накопление Са и Р. Растения контрольной группы WW имеют самые толстые листья, но структура их сформирована крупными клетками, в то время как листья SB-FS варианта плотно упакованы более мелкими клетками с большим числом слоев этих клеток (рис. 5а, е). Подобная структура листа (SB-FS) с максимальными в опыте значениями интегральных индексов ИМК и ИМХ позволяет растениям иметь потенциально более высокий уровень фотосинтеза [27], по сравнению с другими вариантами. Эти структурные перестройки способствовали развитию растений с максимальными значениями зеленой массы, сухой массы надземной части и корней, а также процента сухого вещества (рис. 3). Среди постоянных вариантов освещения наиболее высо-

кий фотосинтетический потенциал у варианта FS, занимающего вторую позицию по мембранным индексам, однако по морфометрическим показателям растения FS-FS имеют средние значения в опыте. Интересно отметить, что соотношение энергий в диапазоне синий-зеленый-красный у светильника SB равно 26% : 41% : 33%, у FS – 27% : 11% : 62%. Т.е. увеличение доли красного света при снижении доли зеленого в случае с растениями *E. sativa* привело к увеличению внутренней ассимиляционной поверхности листьев. Полученные данные по мезоструктуре листа согласуются с данными по морфометрии, *E. sativa* демонстрирует пластичность к изменяющимся условиям освещения, свойственную большинству видов с дорзовентральным типом строения мезофилла.

Содержание аскорбиновой кислоты. Данные для сорта “Диковина” по содержанию Аск были ниже, чем показано для сорта “Рокет” – 2.67 г/кг сырой массы [12]. Выявленная тенденция по снижению содержания Аск в растениях SB-FS и RGB-FS и увеличению содержания Аск в растениях из бокса FS, переставленных в другие боксы, может быть связана с изменением в светильниках долей красного света в спектре при перестановке. Поскольку доля синего света в светильниках FS, RGB и SB близка по своим значениям, но доля красного света отличается, можно предположить, что синтез Аск связан с уменьшением (на 13% для бокса RGB и 29% для бокса SB) воздействия красного спектра на развитие растений. Другой причиной уменьшения или увеличения синтеза Аск может быть изменение пропорции долей красного (R, 650 нм) и дальнего красного спектров (FR, 725 нм) при смене светильников, как это было показано ранее [13]. Авторы выявили, что отношение R/FR определяло степень накопления Аск в листьях *Phaseolus vulgaris* L. Регулирующее влияние отношения R / FR на синтез Аск запускалось на ранней стадии реакции акклиматизации на изменение освещенности, и происходило раньше других изменений [13]. Еще одной причиной неодинакового накопления Аск в растениях разных вариантов может быть соотношение долей красного (R, 660 нм) и синего света (B, 450 нм), которое менялось при смене освещения. Ранее было показано, что изменение длительности воздействия красного и синего света ведет к изменениям в накоплении Аск в листьях листового салата сорта “Green Oak leaf” [10].

Содержание макроэлементов. Можно наблюдать общую тенденцию по накоплению К и Са в растениях, сходную при разных вариантах освещения. Перенос растений из других боксов в FS приводил к снижению аккумуляции макроэлементов в растениях *E. sativa*. Интересно отметить, что максимальное накопление Р и Са отмечено для группы FS-RGB, где выявлены максимальные значения процента сухого вещества надземной части и

корней, а также максимальная концентрация Аск. Т.е. у растений данной группы первые 2 недели эксперимента соотношение энергий в диапазоне синий-зеленый-красный для светильника FS было 27% : 11% : 62%. Далее до конца эксперимента при освещении RGB спектром соотношение поменялось на 32% : 19% : 49%. При этом доля красного света сократилась в 1.2 раза, изменив соотношения синий-красный и зеленый-красный. Ранее эксперименты, проведенные на растениях хризантем, показали, что при изменяющихся характеристиках освещения накопление элементов в листьях было сходным [28]. Между тем исследование укоренения черенков ромашки *Symphoricarpos novi-belgii* var. *novi-belgii* сорта "Barbados" выявило влияние спектра света на усвоение растениями азота, натрия, железа и марганца, определяя содержание кальция, натрия и железа в надземных частях растений [29]. Tremblay с соавторами [30] отметили эффект модифицирующего воздействия света на усвоение кальция.

Применение динамического освещения для культивирования *E. sativa* сорта "Диковина" привело к изменениям в развитии корневой системы, накоплению сухого вещества в растениях и содержанию макроэлементов, структурно-функциональных характеристик ассимиляционного аппарата листа. У растений варианта освещения FS-RGB отмечены максимальные показатели накопления сырой надземной массы, Аск и содержания Са и Р. Средние значения мезоструктурных параметров оказывают положительный эффект на накопление сырой массы побега.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 02.12.2019 г. № 05.604.21.0229, Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60419X0229).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Whitelam G., Halliday K. Annual plant reviews, light and plant development. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. V. 30. 325 p.
- Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Ефимова М.В. Световая регуляция морфогенеза растений табака, трансформированных геном интерлейкина-18 человека // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 560.
- Chen M., Chory J., Fankhauser C. Light signal transduction in higher plants // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 87. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092259>
- Sysoeva M.I., Markovskaya E.F., Shibaeva T.G. Plants under continuous light: a review // Plant stress. 2010. V. 4. P. 5.
- Карначук Р.А., Тищенко С.Ю., Головацкая И.Ф. Эндогенные фитогормоны и регуляция морфогенеза *Arabidopsis thaliana* синим светом // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 262.
- Bulgakov V.P., Wu H.C., Jinn T.L. Coordination of ABA and Chaperone Signaling in Plant Stress Responses // Trends Plant Sci. 2019. V. 24. P. 636. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.004>
- Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology. New York: Benjamin/Cummings Publishing Co., 1991. P. 179.
- Carvalho R.F., Takaki M., Azevedo R.A. Plant pigments: the many faces of light perception // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. P. 241. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0533-7>
- Lillo C., Appenroth K.J. Light regulation of nitrate reductase in higher plants: which photoreceptors are involved? // Plant Biol. 2001. V. 3. P. 455. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17732>
- Chen X.L., Yang Q.C., Song W.P., Wang L.C., Guo W.Z., Xue X.Z. Growth and nutritional properties of lettuce affected by different alternating intervals of red and blue LED irradiation // Sci. Hortic. 2017. V. 223. P. 44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.037>
- Kulchin Yu.N., Nakonechnaya O.V., Gafitskaya I.V., Grishchenko O.V., Epifanova T.Y., Orlovskaya I.Y., Zhuravlev Yu.N., Subbotin E.P. Plant morphogenesis under different light intensity // Defect Diffus. Forum. 2018. V. 386. P. 201. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/DDF.386.201>
- Головка Т.К., Табаленкова Г.Н., Далькэ И.В., Захожий И.Г., Григорай Е.Е., Буткин А.В. Продуктивность, пищевая ценность и антиоксидантная активность зеленных культур защищенного грунта на Севере // Вестник ИБ Коми НЦ УрО РАН. 2011. Т. 1–2. С. 28.
- Bartoli C.G., Tambussi E.A., Diego F., Foyer C.H. Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in *Phaseolus vulgaris* leaves // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 118. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.034>
- Прокошев В.В. Место и значение калия в агроэкосистеме // Рос. хим. журн. 2005. Т. 49. С. 35.
- Швартау В.В., Гуляев Б.И., Карлова А.Б. Особенности реакции растений на дефицит фосфора // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. С. 208.
- Буслаева Г.Н. Значение кальция для организма и влияние питания на его метаболизм // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. 2009. № 3. С. 4.
- Taulavuori K., Pyysalo A., Taulavuori E., Julkunen-Tiitto R. Responses of phenolic acid and flavonoid synthesis to blue and blue-violet light depends on plant species // Environ. Exp. Bot. 2018. V. 150. P. 183. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.016>
- Matysiak B., Kowalski A. White, blue and red LED lighting on growth, morphology and accumulation of flavonoid compounds in leafy greens // Zemdirbyste-Agriculture. 2019. V. 106. P. 281. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.036>

19. Kong Y., Schiestel K., Zheng Y. Pure blue light effects on growth and morphology are slightly changed by adding low-level UVA or far-red light: A comparison with red light in four microgreen species // *Environ. Exp. Bot.* 2019. V. 157. P. 58.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.024>
20. Johnson R.E., Kong Y., Zheng Y. Elongation growth mediated by blue light varies with light intensities and plant species: a comparison with red light in arugula and mustard seedlings // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 169: e103898.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103898>
21. Наконечная О.В., Гафицкая И.В., Бурковская Е.В., Хроленко Ю.А., Грищенко О.В., Журавлев Ю.Н., Субботин Е.П., Кульчин Ю.Н. Влияние интенсивности света на морфогенез *Stevia rebaudiana* в условиях *in vitro* // *Физиология растений.* 2019. Т. 66. С. 304.
<https://doi.org/10.1134/S0015330319040092>
22. Kim H.H., Goins G.D., Wheeler R.M., Sager J.C. Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and bluelight-emitting diodes // *HortScience.* 2004. V. 39. P. 1617.
23. Lin K.H., Huang M.Y., Huang W.D., Hsu M.H., Yang Z.W., Yang C.M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) // *Sci. Hortic.* 2013. V. 150. P. 86.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.002>
24. Muneer S., Kim E.J., Park J.S., Lee J.H. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. P. 4657.
<https://doi.org/10.3390/ijms15034657>
25. Аверчева О.В., Бассарская Е.М., Жигалова Т.В., Беркович Ю.А., Смолянина С.О., Леонтьева М.Р., Ерохин А.Н. Фотохимическая и фосфорилирующая активность хлоропластов и мезоструктура листьев китайской капусты при выращивании под светодиодами // *Физиология растений.* 2010. Т. 57. С. 404.
26. Chen L.-L., Zhang K., Gong X.-C., Wang H.-Y., Gao Y.-H., Wang X.-Q., Zeng Z.-H., Hu Y.-G. Effects of different LEDs light spectrum on the growth, leaf anatomy, and chloroplast ultrastructure of potato plantlets *in vitro* and minituber production after transplanting in the greenhouse // *J. Integr. Agric.* 2020. V. 19. N 1. P. 108.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62633-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62633-X)
27. Мокроносов А.Т. Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата // Мезоструктура и функциональная активность фотосинтетического аппарата. Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1978. С. 5.
28. Breś W., Sztuka A. Macroelement concentration in leaves of chrysanthemums from the Time group grown in spring and summer-autumn seasons // *Folia Horticulturae.* 2008. V. 20. N 2. P. 57. <https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0114>
29. Schroeter-Zakrzewska A., Kleiber T. The effect of light colour and type of lamps on rooting and nutrient status in cuttings of michaelmas daisy // *Bulg. J. Agric. Sci.* 2014. V. 20. P. 1426.
30. Tremblay N., Gasia M.C., Ferauge M.-Th., Gosselin A., Trudel M.J. Effects of light spectral quality on nutrient uptake by tomato // *Can. J. Plant Sci.* 1988. V. 68. P. 287.

О КАЧЕСТВЕННОМ СОСТАВЕ ЛИПИДОВ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. А. В. Жуков^a, *

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

*e-mail: Zhukov_anatoly@list.ru

Поступила в редакцию 29.05.2020 г.

После доработки 05.06.2020 г.

Принята к публикации 08.06.2020 г.

Обсуждаются литературные данные о качественном составе классов полярных липидов, составляющих мембраны растительных клеток. Приведен целый ряд классов фосфо-, глико- и других липидов, а также гидрофобных соединений, не содержащих ацильных групп. Рассматривается жирнокислотный состав полярных липидов, состав аминокислот, входящих в гликофинголипиды, и оксикислот, которыми богаты цереброзиды. Отмечена определяющая роль насыщенных жирных кислот в создании такого физического состояния мембран, которое является оптимальным для нормального их функционирования. Акцентируется необходимость и возможность построения трехмерных моделей биомембран. Предложен логический подход, посвященный наилучшему пониманию роли качественного многообразия состава липидов в устройстве биомембран. Приведены материалы, свидетельствующие о возможности химической и биологической трансформации липидов в растениях. Рассмотрены некоторые вопросы структуры мембран, в том числе микродомены, ремоделирование бислоя и везикулярный трафик.

Ключевые слова: клеточные мембраны, фосфолипиды, гликолипиды, сульфоллипиды, сфинголипиды, аминокислоты, оксикислоты

DOI: 10.31857/S001533032101022X

ВВЕДЕНИЕ

Необходимыми компонентами клеточных мембран являются полярные липиды (ПЛ). ПЛ существуют в оводненных клетках в виде обширных биомолекулярных слоев, имеющих гидрофильную внешнюю поверхность и гидрофобное внутреннее пространство. Вместе с пронизывающими бислоем белковыми молекулами (интегральными белками) они образуют основу жидкой мозаичной структуры биологических мембран и определяют их функцию [1, 2]. Отдельные области мембран

образуют микродомены, включающие специфические белки [3].

Известно, что биологические мембраны являются латерально неоднородными и включают отделы (субкомпарменты), различающиеся по своим биологическим свойствам и составу. В последние годы множество работ посвящено разгадке основы этой гетерогенности. Для формализации физико-химического принципа, подтверждающего такую латеральную мембранную неоднородность, была предложена гипотеза мембранного (или липидного) плота ("raft"). Эта гипотеза основана на факте возникновения в определенных участках липидного бислоя преимущественных ассоциаций между окружающими ПЛ и холестерином, сфингогликолипидами, гликозилфосфатидилинозитом (ГФИ)-связанными белками, интегральными белками, протеолипидами, содержащими C₁₄₋₁₆ жирные кислоты (ЖК) или некоторыми классами липидов, содержащими повышенную долю насыщенных ЖК. Эти участки, образующие четкие, значительно более упорядоченные домены, образование которых обусловлено липид-липидными и липид-белковыми взаимодействиями, было предложено называть мембранными плотами. Эти пло-

Сокращения: ГЛ и ФЛ – глико- и фосфолипиды; ГФИ – гликозилфосфатидилинозит; ДАГ, МАГ и ТАГ – ди-, моно- и триацилглицерины (ди-, моно- и триглицериды); ДГДГ и МГДГ – ди- и моногалактозилдиацилглицерины; ДФГ – дифосфатидилглицерины (кардиолипины); ЖК и ЖКОДЦ – жирные кислоты и ЖК с очень длинной цепью; ИФ₃ – инозит-1,4,5-трифосфат; ИФЦ – инозитфосфорилсерамиды; ПГГ – полярная головная группа; ПЛ – полярные липиды; СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицерины; ФГ и ФИ – фосфатидил-(глицерины и инозиты); ФГЛ и ФК – фитогликолипиды и фосфатидные кислоты; ФС, ФХ и ФЭ – фосфатидил-(серина, холина и этаноламина); ЭГС – этерифицированные гликозиды стероидов; ЭР – эндоплазматический ретикулум; N-АФЭ – N-ацилфосфатидилэтанолламины.

ты имеют размер 10–200 нм и чередуются с менее организованными и более текучими участками бислоя [4].

Можно предполагать, что индивидуальные ПЛ, стерины, интегральные и периферические белки и некоторые другие соединения содержатся в биомембранах в определенных молярных соотношениях. Поэтому один из возможных путей исследования структуры этих образований может состоять в установлении такого соотношения, т. е. в достоверном и точном определении молярного содержания каждого класса ПЛ и всех других компонентов какой-либо индивидуальной мембраны и построении на основе полученных данных ее теоретической модели. Несмотря на очевидный прогресс в биофизике модельных систем, которая используется для изучения биологических мембран, в настоящее время возникают значительные проблемы, связанные с нехваткой данных, касающихся полного анализа состава липидов в каждой отдельной органелле или конкретном участке двуслойной мембраны. Выполнение этого анализа иногда затруднено из-за значительной сложности качественного состава липидов в клетках растений [5].

Таким образом, для понимания строения мембран необходимо прежде всего располагать достоверными сведениями о качественном составе всех классов ПЛ в изучаемом объекте и, далее, о их молярном содержании. В имеющихся обзорах на указанную тему круг обсуждаемых классов ПЛ мембран часто ограничен и, кроме того, они иногда включает запасные липиды, не свойственные мембранам, или ПЛ животного происхождения и микроорганизмов [6–10]. Иногда имеющийся обзор посвящен лишь некоторой части многообразного мира высших растений и водорослей [11] или, наоборот, охватывает весь огромный раздел обмена липидов в растениях [12].

Полярные липиды – это различные производные ЖК, иначе называемые ацилсодержащими липидами. Эти соединения представляют собой амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной функциональной группы (иногда заряженной) и гидрофобных жирнокислотных хвостов. Это свойство позволяет им образовывать сдвоенные слои, в которых направленные друг к другу углеводородные хвосты контактируют между собой благодаря гидрофобным взаимодействиям, а гидрофильные головки направлены в разные стороны и обращены к водной фазе. Так формируется основная структура биологической мембраны [2, 13].

Следует пояснить, что в нашей работе термин “полярные липиды” охватывает все природные вещества, которые содержат остатки высших ЖК, соединенные сложноэфирными или амидными связями с полярными радикалами молекулы, и уступают триацилглицеринам (ТАГ) по величине

подвижности при адсорбционной хроматографии, т. е. превышают по величине полярности ТАГ. Столь широкое применение данного термина является необычным, поскольку чаще всего его используют только для обозначения совокупности фосфо- и гликолипидов (ФЛ и ГЛ), называемых также “сложными липидами”. Однако сейчас хорошо известно, что такие представители “простых” липидов, как моно- и диацилглицерины (МАГ и ДАГ) также служат интегральными компонентами мембран многих растений. Поэтому было бы неправильным не учитывать данные соединения, наряду со сложными липидами, в работах по количественному изучению мембранных липидов растительных тканей.

Таким образом, у ФЛ или ГЛ в качестве гидрофильных головок могут выступать либо фосфат и его эфиры, либо гексозы, либо аминокетильная группа, к которой иногда присоединена глюкоза или фосфат. При гидролизе ПЛ образуются три или более первичных продукта [14, 15]. Химические формулы перечисленных ПЛ приведены в обзорах [6–10, 15, 16], а их полные химические наименования – в работах Кейтса [17] и Cristie [18].

Большинство классов ПЛ растительных тканей можно сгруппировать в разделы ФЛ и ГЛ; группа сфинголипидов растений почти полностью входит в раздел ГЛ (это гликоцилинголипиды).

ФОСФОЛИПИДЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ МЕМБРАН

ФЛ, именуемые также глицерофосфолипидами обычно состоят из глицерина, этерифицированного двумя молекулами ЖК, тогда как к третьей ОН-группе присоединен фосфат, который этерифицирован разными азотистыми основаниями (холином, этаноламином или серином), а также глицерином или инозитом [6–9, 15, 16]. Таким образом, к глицерофосфолипидам относятся производные фосфатидных кислот (ФК; 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфата). ФК – глицерофосфолипиды, не этерифицированные веществами с упомянутыми азотистыми основаниями – содержатся в мембранах в ничтожно малом количестве, но играют важную роль как вторичные мессенджеры в сигнальных путях [16, 19]. В отличие от ФК, фосфатидилхолины (ФХ) в большинстве растительных объектов являются главным классом среди ПЛ, составляющих матрикс мембран [6, 7].

Фосфатидилэтанол амины (ФЭ), как известно, также широко встречаются в мембранах растительных клеток. Информации о физиологической функции ФЭ в растениях получено в настоящее время довольно мало. Известно, что ФЭ являются донорами остатка фосфоэтанол амина, необходимого для удерживания (заякоривания) белков на наружной поверхности мембран моле-

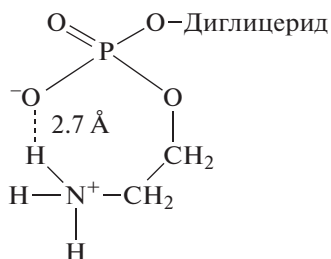


Рис. 1. Семичленная кольцевая структура полярной головной группы фосфатидилэтаноламина.

кулами фосфатидилинозитгликанов (ФИ-гликаны; они же ГФИ) [20]. Помимо ФЭ, могут встречаться фосфатидил-N-метилэтаноламин и фосфатидил-N,N-диметилэтаноламин [17]. ФЭ часто образует форму N-ацетата ФЭ (N-АФЭ), которая также несет важную физиологическую роль в жизни растений. Активация метаболизма этого соединения связана с клеточными стрессами и, в частности, с патогенным стрессом. При этом N-АФЭ гидролизует фосфолипазой D, и насыщенные N-ацетилэтанолламины действуют как липидные медиаторы для регулирования ионного потока, активируя экспрессию генов защиты [21]. Иногда N-АФЭ могут содержать при атоме азота ацетат вместо остатков высших ЖК.

Структуру и функции ФЛ-матрикса клеточных мембран во многом определяют химические свойства полярной головной группы (ПГГ) ФЭ, как одних из главных составляющих мембраны. Свойства ПГГ зависят от входящих в ее состав химических связей и, прежде всего, от сложной P-O-C-связи между остатками фосфорной кислоты и этаноламина. Химическое расщепление этой связи достигается лишь в весьма жестких условиях, путем кипячения в сильном (0,4 N) растворе щелочи [22]. Нами предположено, что высокая устойчивость P-O-C-связи обусловлена тем, что фосфоэтанолламмониевая полярная головная группа ФЭ представляет собой прочную семичленную кольцевую структуру с нейтральным или слабоотрицательным зарядом (рис. 1). Образование кольцевой ПГГ вызвано внутримолекулярным электростатическим притяжением противоположно заряженных групп, а также присутствием водородной связи. Благодаря внутримолекулярному взаимодействию в кольцевой ПГГ ее атом азота располагается на близком расстоянии (2,7 Å) от кислородных атомов фосфата, а из-за отсутствия в этой кольцевой группе ФЭ свободных доноров/акцепторов водородных связей она очень слабо гидратирована.

Устранение внутримолекулярного взаимодействия в кольцевой группе ФЭ достигается ацетилированием остатка этаноламина этого соединения по атому азота уксусным ангидридом. При

этом внутримолекулярная водородная связь разрывается, а полученный таким путем N-ацетамид ФЭ содержит практически нейтральную NH-группу и имеет отрицательный заряд, локализованный на атомах кислорода фосфатной группы. Способность ПГГ N-ацетамида ФЭ к гидратации как по остатку фосфата, так и NH-группировки резко возрастает, и потому устойчивость P-O-C-связи к гидролизу значительно снижается. Таким образом, нами обнаружено, что кольцевая группа ФЭ является прочной негидратируемой кольцевой структурой, которая, вероятно, играет особую роль в функционировании мембран [22].

Фосфатидилглицерины (ФГ) всегда содержатся в хлоропластах, являясь необходимым компонентом реакционного центра фотосистемы II, их тилакоидов. Внешний слой мембран хлоропластов также состоит преимущественно из ФГ и галактолипидов [13]. Представляет значительный интерес, что ЖК клеток хлореллы включают *транс*-3-гексадеценую кислоту (до 3,5% от суммы ЖК). При этом она почти исключительно сосредоточена в *sn*-2-положении ФГ.

В случае дифосфатидилглицеринов (ДФГ; другое название – кардиолипиды) к молекуле ФГ присоединяется еще один диацилглицерофосфат, так, что образуется молекула ФЛ, включающая 4 ЖК, 2 фосфата и 3 глицерина. Кардиолипиды – это липиды с уникальными свойствами и обнаруживаются они исключительно в мембранах, генерирующих электрический потенциал. Эти липиды имеют тенденцию к образованию неламинарных структур, уменьшающих механическую устойчивость бислоя. Тем самым ДФГ инициируют изменения в мембранах (ремоделирование их двуслойной структуры) и делают их более проницаемыми [23]. Кардиолипиды являются специфическим компонентом внутренней мембраны митохондрий у растений и у животных, синтезируются ферментами этой мембраны и составляют около 22% от суммы всех ее ФЛ [12, 24]. Помимо ФГ и ДФГ, возможно существование фосфатидилглицерофосфатов и фосфатидил-O-аминоацилглицеринов, где аминоацильная группировка R" представлена остатком лизина, аргинина или аланина [17].

Фосфатидилсерин (ФС) – кислые ФЛ мембран – являются одной из составляющих ферментативного комплекса протеинкиназы С, формирующей ряд специфических ферментов. Связывание протеинкиназы С с ионами кальция позволяет ферменту вступать в кальций-опосредованное взаимодействие с молекулами ФС. Диацилглицерины, занимая специфические центры в протеинкиназе С, еще более увеличивают ее сродство с ионами кальция [22, 24].

Помимо азотистых оснований, глицерофосфолипиды могут включать и миоинозит, образуя

фосфатидилинозиты (ФИ) [17, 18, 25]. Кроме ФИ, в растениях могут встречаться и ди-, и трифосфоинозитиды (ФИ₍₄₎-фосфат и ФИ_(4,5)-дифосфат; табл. 1). В листьях гороха (*Pinus sativum*) и суспензии одноклеточной зеленой водоросли *Chlamidomonas eugametos* были найдены лишь соединения ФИ₍₄₎-фосфат и ФИ_(4,5)-дифосфат [26]; эти же классы ПЛ были найдены и в *Arabidopsis thaliana* [44] и в *Dunaliella salina* [45]. Однако дифосфоинозитиды могут встречаться, помимо главного изомера (ФИ₍₄₎-фосфат), также в виде ФИ₍₃₎-фосфата или ФИ₍₅₎-фосфата, как это было обнаружено в *Chlamydomonas* [27], а трифосфоинозитиды могут образовывать, помимо изомера ФИ_(4,5)-дифосфат, ФИ_(3,4)-дифосфат и ФИ_(3,5)-дифосфат [28, 29]. ФИ можно извлечь из ткани только после добавления в экстрагент небольшого количества минеральной кислоты, причем сдвиг pH не может быть заменен увеличением ионной силы экстрагента. По-видимому, кислота необходима для разрыва прочных ионных связей между сильно полярными группировками липидных молекул и нерастворимыми полимерами клетки.

К ФИ через посредство олигосахарида могут присоединяться специфические белки наружной поверхности мембраны. ФИ с присоединенным к одной из гидроксильных групп инозита олигосахаридом (гликаном) называют фосфатидилинозитгликанами. Связь белков с этими молекулами осуществляется через фосфоэтаноламин. ФИ-гликаны могут выполнять в мембране “якорную” функцию и отсюда их другое название – ГФИ-заякоренные белки. Считается, что при этом белок может образовывать ковалентную связь с ФИ-гликаном (например – щелочная фосфатаза), а отделение белка от поверхности мембраны происходит под действием фосфолипазы С [24]. Эти соединения найдены в арабидопсисе, рисе и многокореннике (*Spirodela oligorrhiza*; род травянистых растений из подсем. Рясковые или Lemnoideae) [30]. Становится все более очевидным, что некоторые ПЛ, помимо обеспечения среды для работы мембранных белков, во многих случаях способны влиять на их структуру и функции. Особенно это касается высокополярных заряженных ФЛ, каковыми являются ФИ и ФС, которые могут оказывать подобное влияние [46].

Возможно существование других вариантов структуры глицерофосфолипидов: лизоформ ряда ФЛ (таких, как ФЭ, ФХ, ФС и ФК), в которых молекула содержит лишь один остаток ЖК, а также моноацилмоноалкилфосфатидов (образующихся из ФЭ или ФХ) и диалкилфосфатидов (образующихся из ФГ или фосфатидилглицерофосфата) [17]. Такие ФЛ, как плазмалогены, у которых в первом положении глицерина находится не ЖК, а остаток спирта с длинной алифатической це-

пью, связанный простой эфирной связью, до настоящего времени в растениях не найдены. Также не найдены в растительных объектах фосфосфинголипиды, в которых сфингомиелин связан с фосфохолином в качестве полярной головной группы.

ФЛ участвуют в построении всех видов клеточных мембран; в основном состоят из ФЛ мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондрий. Даже олесомы – сферические масляные тела, формируемые в ЭР и состоящие из ТАГ, окружены монослоем из фосфолипидов, который содержит особые интегральные белки олеозины, а также и ряд других белков [13].

ГЛИКОЛИПИДЫ И ДРУГИЕ ЛИПИДЫ МЕМБРАН

Специфической особенностью растений является наличие в их мембранах, помимо ФЛ, также и гликолипидов, которые являются липидными производными сахаров [6, 10, 30, 31, 47]. В данном разделе речь пойдет о таких пяти группах гликолипидов, как гликозилдиацилглицерины, сульфохиновозилдиацилглицерины (СХДГ), эфиры гликозидов стероидов (ЭГС), эфиры глюкозы и сахарозы и, наконец, гликофинголипиды.

В молекулах группы 1 ГЛ – гликозилдиацилглицеринов – к гидроксильной группе диацилглицерина гликозидной связью присоединяются моно-, ди- или трисахариды. Это моно-, ди- и тригалактозилдиацилглицерины (МГДГ, ДГДГ и ТГДГ). Кроме того, что в растительных объектах найдены ТГДГ (табл. 1), найдены также и 6-О-ацил-МГДГ или 6-О-ацил-ДГДГ [14]. Хлоропласты содержат ГЛ, которые являются основными компонентами тилакоидных мембран, но встречаются также и во внешней мембране. ГЛ не формируют истинный бислой, однако присутствие их клиновидных молекул важно для образования изгибов мембран и формирования тилакоидов. Форма молекул ГЛ способствует также встраиванию белков в липидный слой мембраны [13].

Последовательное добавление к МГДГ (β -D-гал-ДАГ) остатков α -D-галактопиранозила в положении С6 галактозы приводит к образованию не только ДГДГ (α -D-гал(1,6)- β -D-гал-ДАГ), но и три- (две формы) и тетрагалактозилдиацилглицеринов (также две формы) [18]. Добавление остатков β -D-галактопиранозила приводит к получению еще и all- β -дигалактозил-, all- β -тригалактозил- и all- β -тетрагалактозилдиацилглицеринов. Однако не ясно, содержатся ли все эти компоненты в мембранах клеток растений, в частности, мембранах пластид. Кроме того, из корней кукурузы выделен ацилгалактопиранозилэтандиол. А в прорастающих бобах мунг (*Phaseolus mungo* L.) найден рамнозиллированный тригалактолипид

Таблица 1. Некоторые необычные классы ПЛ, встречающиеся в составе мембран растительных клеток*

№	Наименование	Объект	Ссылка
1.	Фосфатидилметил- и фосфатидил-N,N-диметил-этанолamines	Эукариоты	[7, 9, 17]
2.	N-ацетаты ФЭ	Высшие растения	[21]
3.	Фосфатидилглицерофосфаты	Эукариоты	[17]
4.	Фосфатидил-O-аминоацилглицерины	Эукариоты	[17]
5.	ФИ ₍₄₎ -, ФИ ₍₃₎ - и ФИ ₍₅₎ -фосфаты	<i>Pinus sativum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Chlamidomonas</i>	[7, 9, 26, 27]
6.	ФИ _(4,5) -, ФИ _(3,5) -дифосфаты	<i>P. sativum</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>Dunaliella salina</i>	[7, 9, 26, 28, 29]
7.	ФИ-гликаны, ковалентно связанные с белками	Рис, <i>A. thaliana</i> , <i>Spirodela oligorrhiza</i>	[20, 24, 30]
8.	Моноацилмоноалкилфосфатиды (из ФЭ или ФХ)	Эукариоты	[17]
9.	Диалкилфосфатиды (из ФГ или фосфатидилглицерофосфата)	Эукариоты	[17]
10.	Три- и тетра-галактозилдиацилглицерины	Клубни картофеля, листья шпината	[6, 10, 14]
11.	Ацилгалактопиранозилэтандиоли	Корни кукурузы	[10, 18]
12.	Гексадецилрамнопиранозилглицерины	Бобы <i>Phaseolus mungo</i> L.	[10, 18]
13.	Моно-, ди- и all-β-ди-галактозилмоноглицериды	Высшие растения	[10, 18]
14.	Ацилированные формы МГДГ, ДГДГ и моногалактозилмоноглицеридов	Пшеница, шпинат	[14]
15.	Пальмитоил-β-D-глюкозид β-ситостерина	Высшие растения	[17]
16.	1,2,3-три-O-капроил-α-D-глюкопираноза	Высшие растения	[18]
17.	D-глюко- и β-D-манно-пиранозил-N-ацилфитосфингозины	Высшие растения	[17]
18.	Ди- и тригексозиды церамидов и тригексозид-N-ацетил-галактозамин церамидов	Эукариоты	[15, 17]
19.	N-ацилфитосфингозил-фосфоринозиты (ФГЛ)	Корни кукурузы, листья табака	[17, 18, 31, 32]
20.	Инозитфосфорилцерамиды	Кукуруза, табак	[18, 33–36]
21.	Диацилглицеротриметилгомосерины	<i>Dunaliella salina</i>	[28, 37, 38]
22.	Диацилглицерогидроксиметил-триметилаланин	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[37–40]
23.	3-Ацетил-1.2-диацилглицерины	<i>Euonimus</i>	[41]
24.	Моно-, ди- и триацильные производные гликозида этиленгликоля	Семена пшеницы	[42]
25.	Ацильные производные 1-O-β-D-глюкопиранозилэтиленгликоля	Семена пшеницы	[43]

* Помимо известных ФЛ и ГЛ, а также их лизоформ и оксипинов в составе МГДГ и ДГДГ.

(гексадецилрамнопиранозилглицерин, включающий три галактопиранозильных остатка) [18].

В результате воздействия ферментов при повреждениях клеток возможно образование некоторых производных МГДГ и ДГДГ. Уменьшение количества ацильных групп приводит к возникновению моногалактозилмоноглицеридов, дигалактозилмоноглицеридов и all-β-дигалактозилмоноглицеридов. Присоединение ацильных групп к положению С6 терминала галактозы приводит к получению ацилированных форм моногалактозилмоноглицеридов, МГДГ и ДГДГ. Следует иметь в

виду, что МГДГ и ДГДГ при гомогенизации клеток могут подвергаться действию ферментов ацилтрансферазы и гидролазы ацилов эфиров. Возможно также образование оксипинов одной или обеих полиненасыщенных ацильных групп в составе МГДГ и ДГДГ; не установлено, задействован ли при этом ферментативный катализ [18].

Помимо гликозилдиацилглицеринов, важными компонентами мембран растительных клеток, в первую очередь мембранных систем хлоропластов и других форм пластид являются СХДГ (группа 2 ГЛ), в которых к гидроксильной группе

диацилглицерина гликозидной связью присоединен сульфохиновопиранозил. СХДГ являются единственными растительными сульфолипидами [10, 18, 48–50]. СХДГ содержат остаток глюкозы, к которой присоединена группа сульфоновой кислоты; эта часть молекулы липида служит полярной головкой. СХДГ относятся к кислым полярным липидам и найдены только у растений, составляя около 10% от общего содержания липидов мембран. СХДГ сосредоточены главным образом во внутреннем слое мембран хлоропластов. СХДГ вместе с ФЛ определяют поверхностный заряд мембран, а также влияют на функциональную активность белковых комплексов тилакоидных мембран [13].

В раздел ГЛ многие авторы включают также класс гликозидов стериннов [51], которые не содержат остатков ЖК, и потому, по нашей градации, не являются липидами (см. выше). В то же время существуют и сложные эфиры гликозидов стериннов с ЖК (ЭГС), которые, таким образом, уже несомненно являются ПЛ и относятся к ГЛ (группа 3) [6]. ЭГС представляют собой широко распространенный класс гликолипидов растений. Из стериннов в них, как правило, встречается стигмастерин. ЭГС могут образовывать дисахаридные производные, из которых только целлобиозиды (β -1,4) и гентиобиозиды (β -1,6) в дальнейшем могут удлиняться до три-, тетра- и пентасахаридных цепей [18]. В растениях встречаются глюкопиранозиды стериннов, преимущественно ситостерина и стигмастерина, а также 6-пальмитоил- β -D-глюкозид β -ситостерина [17]. Эти модифицированные стероиды широко встречаются у растений, однако не все исследователи признают, что они вместе с остальными ГЛ являются компонентами мембран.

К гликолипидам (группа 4) относятся также эфиры глюкозы и сахарозы с коротко- (до C_{12}) и, возможно, среднецепочечными ЖК, которые могут иногда составлять более 80% эпикуткулярных экссудатов (экстрацеллюлярный материал эпидермальных поверхностей) некоторых растений – сем. Solanaceae, томатов, табака. Эти соединения могут включать до трех остатков каприловой кислоты, как, например, в 1,2,3-три-О-капроил- α -D-глюкопиранозе [18]. К ГЛ (группа 5) относится и группа гликофинголипидов [52, 53]. Необходимо отметить, что, помимо этой группы, существует исходный вид простых сфинголипидов, которые не содержат в своем составе остатков сахаров и имеют название церамиды (N-ацилсфингозины или сфингенины). Гликофинголипиды являются производными церамидов и включают: 1- цереброзиды (они же глюкозилцерамиды, церамидгексозиды или глюкозиды N-ацилсфингозинов), 2 – ди- и полигексозиды церамидов и 3 – фитогликолипиды (ФГЛ), которые

иногда называют инозитфосфорилцерамидами (см. ниже) [17, 32, 54].

Цереброзиды образуются при взаимодействии церамидов через гидроксильные группы с другими радикалами, в частности, с углеводами [15, 17, 55, 56]. Растительные цереброзиды содержат от одного до четырех остатков сахаров (глюкозы и маннозы) в цепи. Примером таких соединений может служить 1-О- β -D-глюкопиранозил-N-ацилфитосфингозин, где R – 2-окси-(пальмитоил, стеароил, бегеноил или лигноцерил) [17]. Исходными можно считать два моноглюкозилцерамида, содержащих остатки либо β -D-глюкопиранозила, либо β -D-маннопиранозила, из которых первый преобладает в фотосинтезирующих тканях. Глюкопиранозилцерамиды могут дополнительно присоединять по одному остатку маннозы или глюкозы, образуя диглюкозилцерамиды. Те из последних, которые содержат остаток маннозы на терминальном конце, могут присоединять еще остатки маннозы или глюкозы, образуя два три- и два тетраглюкозилцерамида с разным соотношением остатков двух сахаров [18]. Примером дигексозидов церамидов могут служить церамидлактозиды (1-О- β -D-галактопиранозил-О- β -D-глюкопиранозил-N-ацилсфингозины) [17]. Показано существование еще и тригексозидцерамид-N-ацетилгалактозамина [20]. Следует иметь в виду, что каждый из моно-, ди- и тригексозидов церамидов образуют при адсорбционной хроматографии по две хроматографические зоны, содержащие соединения либо с нормальными ЖК, либо с гидроксизЖК [15]. В полигексозидов церамидов, как правило, гликозидная часть представляет собой олигосахаридную цепь, содержащую от двух до шести моносакхаридов.

Помимо цереброзидов и полигексозидов церамидов, группа гликофинголипидов включает ФГЛ, которые представляют собой N-ацилфитосфингозилфосфоринозиты, связанные гликозидной связью с остатками ряда моносакхаридов или полисахаридных групп [17, 18, 30, 33]; структура их установлена лишь в общих чертах [32, 34, 57]. Кроме инозита, фосфора и сфингозиновых оснований, содержащихся в молекуле ФГЛ, там могут присутствовать еще до десяти различных компонентов, включающих, возможно, до 16 и даже более остатков моносакхаридов [17, 18, 30, 33, 58]. В ФГЛ церамид-1-фосфат связан с глюкозилированным инозитом фосфодиэфирной связью [18]. Центральной частью (ядром) молекулы ФГЛ являются инозитфосфорилцерамиды (ИФЦ), которые, возможно, могут встречаться в растительных тканях и в свободном состоянии. В других работах предполагается, что ИФЦ (другое их обозначение – фосфорилсфинголипиды) могут содержать в своем составе различные полисахаридные остатки и представляют собой разнообразную группу сфинголипидов, присутствующих в высших рас-

тениях и грибах; здесь, вероятно, обозначение ИФЦ приравнивается к ФГЛ [32]. Известна лишь предполагаемая структура ядра для главных разновидностей ИФЦ из кукурузы и табака [32–34, 37, 35]. Присутствие в молекулах ФГЛ различных полисахаридных групп препятствует возврату этих соединений в органическую фазу из водной при очистке экстракта, приводя к недооценке их содержания в растительных тканях [32, 34].

Первые данные о существовании ФГЛ в корнях кукурузы и их структуре получены Carter с соавт. [33]. Позднее, ссылаясь на эту работу, некоторые авторы приводят возможные формулы этих веществ [17, 18, 30, 32]. Кроме того, ФГЛ обнаружены в листьях табака Hsieh с соавт. [34] и Kaul с соавт. [35], на которых также ссылаются в упомянутых более поздних работах [18, 32]. Присутствие ИФЦ показано, по крайней мере, в 7 различных растениях [32]. Церамидная часть ИФЦ обычно состоит из гидроксисфинганина или гидроксисфингенина и C_{24} -гидроксиЖК. В свою очередь, в фосфорилсфинголипидах гидроксильная группа этерифицирована фосфатом или фосфохолином [32]. Функции ИФЦ в растениях изучены еще недостаточно; известно, что они могут служить, аналогично ГФИ, как якорь для удерживания белков.

Гликофинголипиды, также как все упомянутые выше ПЛ, активно участвуют в создании структуры мембран, и, кроме того, являются метаболическими посредниками ряда клеточных процессов, таких как развитие пыльцы, передача сигнала трансдукции на абсцизовую кислоту и ответная реакция растений на гипоксию и атаку патогенов. Гликофинголипиды, включая ФГЛ, входят в состав ЭР и плазмалеммы [59].

Основа гликофинголипидов – церамиды – это амиды ЖК с высшими аминоспиртами [17, 25, 30]; последние иногда называют длинноцепочечными ди- или тригидроксиоснованиями, или сфингооснованиями [15]. Наименования этих соединений, встречающиеся в литературе, к сожалению, часто довольно сильно различаются у разных авторов. Высшие аминоспирты в сфинголипидах обычно могут варьировать по длине цепи между C_{16} и C_{20} и подвергаться гидроксильрованию и/или десатурации. Двойная связь в $\Delta 8$ -положении может находиться как в *цис*-, так и *транс*-конфигурации, и соотношение этих изомеров варьирует в разных объектах. Двойная связь в $\Delta 4$ -положении обычно присутствует в *транс*-конфигурации [50].

Высшие аминоспирты представлены, как правило, производными или гомологами насыщенного C_{18} -аминодиола сфинганина (дигидросфингозина; 2-D-аминооктадекандиол-1,3-D). В этот класс веществ входят C_{18} - и C_{20} -аминоспирты, которые могут быть диолами или триолами, а также быть насыщенными или мононенасыщенными. К C_{18} -аминоспиртам, помимо дигидросфингозина, от-

носятся сфингозин, фитосфингозин и дегидрофитосфингозин, из которых первые два – диолы, а вторые два – триолы. Двойная связь имеется в сфингозине и дегидросфингозине. Из C_{20} -аминоспиртов наиболее известны насыщенные C_{20} -дигидросфингозин и C_{20} -фитосфингозин [12]. По другим данным, из длинноцепочечных оснований наиболее часто встречаются 4-гидроксисфинганин (триол; t18:0; он же фитосфингозин), 4-гидрокси-8-сфингенин (t18:1⁸), дигидросфингозин (диол; d18:0; он же сфинганин), 8-сфингенин (d18:1⁸), 4-сфингенин (d18:1⁴, известный как сфингазин) и 4,8-сфингадиенин (d18:2^{4,8}) [50].

Таким образом, сфинголипиды содержат в молекуле высший аминоспирт, включающий гидроксильные группы и аминогруппу, благодаря которой эти липиды имеют слабощелочные свойства. К аминогруппе аминоспиртов амидной связью (значительно более прочной, чем сложноэфирная) присоединена ЖК, которая содержит не более двух двойных связей. Гидролиз амидной связи для получения свободных оснований и ЖК из сфинголипидов обычно выполняют кипячением в 1M метанольном растворе NaOH в течение 18 ч [13, 22] или в 2N водно-метанольном растворе HCl в течение 5 или 18 ч [17].

В свободных церамидах из высших аминоспиртов преобладают производные триола фитосфингозина, например, триолы с добавлением или без добавления *цис/транс*-двойных связей при C8. В фитогликолипидах также преобладают триолы. В цереброзидах диолы и триолы встречаются в равных пропорциях с преобладанием 8-сфингенина, 4,8-сфингадиенина и 4-гидроксисфинганина (фитосфингозина) [10, 18, 60]. Только четыре высших аминоспирта найдены в цереброзидах арабидопсиса: 4-гидрокси-8-*цис*-сфингенин, 4-гидрокси-8-*транс*-сфингенин, 8-*транс*-сфингенин и 8-*цис*-сфингенин. Из них главным компонентом является 4-гидрокси-8-*цис*-сфингенин, сопровождаемый преимущественно 2-оксинервоновой кислотой ($C_{24:1}$ -оксикислота) [61]. Помимо высших аминоспиртов, цереброзиды включают жирные кислоты с очень длинной цепью (ЖКОДЦ; до 78% от суммы всех ЖК). Кроме того, в цереброзидах могут содержаться до 14 видов оксикислот (см. ниже).

Обычно ПЛ сопутствуют в мембранах стерины и гликозиды стериннов, которые по нашей градации не входят в состав липидов, поскольку не содержат ЖК. Так, в плазмалемме есть ситостерин, стигмастерин и кампестерин и лишь следы холестерина. Кроме того, растительные ткани (особенно семена) содержат сложные эфиры стериннов и ЖК, которые из-за их большой хроматографической подвижности относятся не к ПЛ, а к нейтральным липидам. Стерины также амфифильны: гидроксильные группы образуют гидрофильную головку,

а циклопентанпергидрофенантрен с боковыми заместителями играет роль гидрофобного хвоста. Стерины содержатся в наружной мембране митохондрий, ЭР и плазмалемме. Известно, что обогащение отдельных участков мембран стеринами необходимо, в частности, для стабилизации активной конформации молекул НАДФ^H-оксидазы в этих участках.

Среди ПЛ одноклеточной водоросли *Dunaliella salina*, обитающей преимущественно в соленых морях, обнаружено значительное количество (8% от общих липидов плазматической мембраны) диацилглицеротриметилгмосерина, количество которого возрастает в 1.7 раза (в отличие от других ПЛ) при увеличении засоления среды выращивания в два раза [28]. Это соединение найдено и в водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [36, 37]. Кроме того, в водорослях обнаружен диацилглицерогидроксиметилтриметилаланин. Эти два соединения представляют собой N-метилованные гидроксиаминокислоты и называются бетаин липидами [38, 39].

Помимо ПЛ и стеринов, в составе внутренних мембран митохондрий и в тилакоидных мембранах важными функциональными компонентами служат изопреноиды и их производные, в частности каротиноиды и их эфиры с ЖК, убихиноны и пластохиноны. Каротиноиды представляют собой тетратерпены и являются углеводородами, содержащими несколько ненасыщенных связей. Эта группа включает в себя до 70 пигментов, содержащихся в разных растениях и грибах. Каротиноиды обычно рассматривают как производные ликопина, который обнаружен в плодах томатов и других растений.

В природных соединениях часто встречаются моно- и диацильные производные алкен-1-иловых эфиров глицерина, а также ацилалкиловые эфиры глицерина (моно- и диацильные производные алкилглицеринов) [17]. В созревающих семенах пшеницы найдены гликозилдиглицериды, а также диольные гликолипиды, которые представляют собой ацильные производные 1-О-β-D-глюкопиранозилэтиленгликоля [42]. Этими же авторами в созревающих семенах кукурузы найден аналогичный класс диольных гликолипидов — ацильное производное 1-О-β-D-галактопиранозилэтиленгликоля. Предполагается, что в семенах пшеницы содержатся моно-, ди- и триацильные производные гликозида этиленгликоля. При этом моноацильные производные по величине R_f близки к МГДГ, а ди- и триацильные не отделяются от свободных стеринов и ДАГ соответственно [41].

Нами обнаружены новые, не отмеченные в них ранее липидные компоненты в зрелых семенах сои [62]. Так, наряду с ДАГ и МАГ, обнаружены неидентифицированные липиды, близкие к этим глицеридам по R_f ; некоторые из них сохра-

няются и после омыления. Возможно, что эти зоны включают высшие алифатические спирты и/или О-диалкиловые эфиры глицерина, а также 1-О-моноалкиловые эфиры глицерина [22]. Помимо спиртов и простых эфиров, во фракциях малополярных липидов могут содержаться терпены и токоферолы, которые были предположительно идентифицированы в незрелых семенах сои [63]. Кроме того, в семенах сои могут содержаться эфиры каротиноидов и терпенов с ЖК, а также ацилированные гликозиды этиленгликоля, которые найдены в семенах кукурузы и пшеницы [64]. Помимо обычных ДАГ, в семенах и присемянниках бересклета (*Euonymus L.*) и ряда других растений содержатся ацетилДАГ (3-ацетил-1,2-диацил-*sn*-глицерина). В этих оптически активных соединениях две ОН-группы остатка глицерина этерифицированы высшими ЖК, а одна — уксусной кислотой [40].

В растительных объектах найдены также и протеолипиды. Они представляют собой интегральные гидрофобные белки биомембран и могут быть выделены из этих мембран только в виде комплексов с липидами. В растительных объектах протеолипиды обнаружены в семенах сои [65], злаков [66] и *Guizotia abyssinica* Cass. [67], в соевом масле [68] и в протопластах листьев гороха [69]. Ранее, после применения исчерпывающей экстракции липидов, нами показано присутствие в зрелых семенах сои около 20 неизвестных компонентов ПЛ [62].

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ МЕМБРАН

В отличие от ТАГ, полярные, или конституционные, липиды растительных тканей характеризуются более разнообразным набором ЖК за счет многочисленных минорных компонентов и продуктов удлинения цепей кислот. Эти особенности обуславливают богатство структурных модификаций мембранных липидов, связанное с их функциональным многообразием.

Полярные липиды в основном содержат ЖК с 14–18 атомами углерода. Большинство этих ЖК является ненасыщенными и имеют 1–3 двойные связи, как правило, не сопряженные. Эти двойные связи всегда находятся в *цис*-конфигурации и крайне редко — в *транс*-положении. Последние имеются в *транс*-гексадецен-3-овой, элаидиновой (*транс*-октадецен-9-овой), брассидиновой (*транс*-докозен-13-овой), элеостеариновой (*цис*, *транс*, *транс*-октадекатриен-9,11,13-овой) ЖК, а также в высших Δ4-*транс* или Δ8-*транс*-аминоспиртах сфинголипидов. Нами приняты следующие сокращенные обозначения индивидуальных ЖК (на примере α-линоленовой кислоты: 18:3^{Δ9,12,15}, где указано количество атомов С в цепи, число двойных связей и номера атомов, от ко-

торых отходит двойная связь, считая от карбоксильной группы (знак Δ). Эту кислоту можно обозначить как ω3-ЖК, поскольку последняя двойная связь расположена в ней в положении С-3 от метильного конца ЖК. Аналогично, ЖК 18:2^{Δ9,12} (линолевая), а также и 18:3^{Δ6,9,12} (γ-линоленовая) могут быть обозначены как ω6-ЖК.

α-Линоленовая кислота имеет особое, уникальное значение среди других ЖК в жизни растений. Независимо от генотипа растения α-линолеат всегда доминирует в липидах хлоропластов, где его уровень в галактолипидах тилакоидов может достигать 95%. Исходя из этого рассчитано, что во всей совокупности ЖК, содержащихся в живом веществе биосферы, доля α-линоленовой кислоты превышает 90%. Преобладание этой ЖК в хлоропластах, где она играет как структурную, так и метаболическую роль связаны с особенностями ее строения: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$.

На метильном конце цепи α-линоленовой кислоты расположена незаряженная система из трех двойных связей, отделенных от метильной группы 3, 6 и 9 атомами С, соответственно. Интересно, что аналогичная система двойных связей содержится и в цепи структурного аналога α-линолеата — гексадекатриеновой кислоты (16:3^{Δ7,10,13}), которая встречается только в хлоропластах.

Значение данной ω-3,6,9-системы двойных связей состоит в том, что она способна принимать спиралевидную конформацию, которая образует тесную ассоциацию со спиральными цепями мембранных белков пластидных ламелл благодаря гидрофобному взаимодействию этой системы с p-орбиталями остатков ароматических аминокислот. При построении фотосинтетических субъединиц хлоропласта наиболее плотная упаковка галактолипидов, включая указанные ЖК, осуществляется не только с белками, но и с пигментами и, главным образом, с хлорофиллом. При этом обеспечивается оптимальная пространственная ориентация гидрофильных фоторецепторных порфириновых структур хлоропласта на поверхности липопротеиновых мембран и возможность быстрого переноса электронов в безводной среде с низкой диэлектрической постоянной [70].

В составе полиненасыщенных ЖК можно выделить две группы этих соединений. В первой группе биосинтез происходит по пути образования ЖК с регулярым положением *цис*-двойных связей в углеводородной цепи с участием мембранных ω6- и ω3-ацил-липидных десатураз, а во второй — с последующим образованием Δ5-ЖК при участии фронтальной Δ5-ацил-липидной десатуразы [71]. Наличие таких Δ5-ЖК, как таксолеиновая (18:2^{Δ5,9}), эфедриновая (18:2^{Δ5,11}), пиноленовая (18:3^{Δ5,9,12}), кониферонозная (18:4^{Δ5,9,12,15}), скиадонозная (20:3^{Δ5,11,14}), юниферонозная (20:4^{Δ5,11,14,17}) и

кислота 20:2^{Δ5,11} является отличительным признаком фотосинтезирующих и не фотосинтезирующих тканей голосеменных (Pinophyta) [72, 73], в том числе и сем. Саговниковых (Cycadaceae) [74]. Δ5-ЖК присутствуют в липидах семян сем. Лютиковых (Ranunculaceae), тканей мхов, лишайников, грибов и микроводорослей [71]. При этом содержание Δ5-ЖК может составлять до 30% от суммы ЖК и более. Фронтальная Δ5-десатураза принимает участие и в образовании таких важных для человека Δ5-ЖК, как арахидонозная (20:4^{Δ5,8,11,14}) и эйкозапентаэнозная (20:5^{Δ5,8,11,14,17}), которые также характерны для наиболее древних в эволюционном отношении семейств растений. При этом синтез 20:4^{Δ5,8,11,14} и 20:5^{Δ5,8,11,14,17} осуществляется из дигомо-γ-линоленовой (20:3^{Δ8,11,14}) и эйкозатетраэнозной (20:4^{Δ8,11,14,17}) кислот соответственно [75]. Можно видеть, что из перечисленных Δ5-ЖК 18:4 и 20:4, также как и эйкозапентаэнозная кислота (20:5), являются ω3-ЖК; 18:3 и 20:3, также как и арахидонозная кислота (20:4), представляют собой ω6-ЖК; 18:2 и 20:2 относятся к ω9-ЖК, а эфедриновою кислоту можно считать ω7-ЖК.

Ранее нами показано, что наиболее прочно удерживаемые липиды мембран, как правило, бывают обогащены насыщенными ЖК и, в частности, пальмитиновой кислотой (16:0). С увеличением полярности в ряду отдельных фракций, полученных из суммарных липидов, возрастает содержание 16:0 в сумме ЖК данной фракции [76, 77]. Учитывая, что выделенные нами высокополярные липиды (ВПЛ), представляющие собой “аннулярные липиды” или липиды микроокружения ферментов, как раз и являются наиболее важными в составе мембран, можно говорить о физиологическом значении этой закономерности. Как известно, насыщенность алифатических остатков ПЛ определенного класса обратно пропорциональна текучести (fluidity) последних [78]. Следовательно, существование отмеченной нами обратной корреляции указывает на то, что диацилглицериновые радикалы мембранных ПЛ значительно уступают ТАГ тех же растений по величине текучести. Весьма вероятно, что в мембранах высших растений и водорослей содержание пальмитиновой кислоты не может снижаться ниже определенного уровня. Полученные данные позволяют заключить, что для создания жидкокристаллической структуры клеточных мембран высших растений и водорослей требуются ацильные остатки с менее высокой текучестью, чем те, которые необходимы для ферментативной мобилизации запасных масел при возобновлении роста [76]. Известно, что насыщенные липиды способствуют образованию относительно упорядоченных мембранных доменов, которые избирательно включают определенные липиды и белки [4]. Помимо обычных насыщенных ЖК в растениях мо-

гут встречаться аналогичные ЖК с разветвленной цепью; так, в липидах голосеменных найдены три насыщенные ЖК с разветвленной цепью – антеизо-13:0, антеизо-15:0 и антеизо-17:0 [72, 74].

ВПЛ, состоящие главным образом из ФИ, ФС, ФГЛ и протеолипидов, как правило, бывают обогащены C_{20-26} -ЖК, способными, благодаря своей длине, входить одновременно в обе половины бислоя мембраны, дополнительно скрепляя ее [75]. Установлено, что синтез ЖКОДЦ в эпидермисе имеет важное значение для контроля пролиферации клеток и, тем самым, для регуляции роста растений. Этот контроль может осуществляться путем воздействия на биосинтез цитокининов в сосудистой системе и изменение активности деления клеток при ростовых процессах [79].

В течение последних десятилетий показано, что в растительных тканях широко распространены оксипирины, которые представляют собой продукты перекисного окисления ацильных остатков ди- и триненасыщенных ЖК в полярных и нейтральных липидах под действием реактивных форм кислорода или липоксигеназных ферментов [80].

Уже упоминалось, что цереброзиды содержат значительное количество оксикислот; главным образом это насыщенные α -оксикислоты. α -Оксикислоты образуют гомологический ряд с четным числом атомов С общей формулы $CH_3(CH_2)_nCH(OH)COOH$ (n – нечетное число, от 7 до 21) [17]. Примером таких оксикислот может служить 2-оксипальмитиновая (16:0h), а преобладают среди них 16:0h, 20:0h и 24:0h [10, 16, 60]. Здесь буква h обозначает “hydroxy”. В дрожжах и грамотрицательных бактериях встречаются β -оксикислоты; примером насыщенных β -оксикислот является 3-оксипальмитиновая кислота. 3-Оксикислоты D-ряда являются промежуточными продуктами биосинтеза ЖК, а 3-оксикислоты L-ряда – промежуточными продуктами β -окисления. К ненасыщенным оксикислотам относится, например, 12-оксиолеиновая (рицинолевая) кислота, которая, однако, в цереброзидах практически не встречается, а также 2-окси-*цис*-тетракозен-15-овая (2-оксинервоновая; 24h:1) кислота [17].

Таким образом, связанные амидной связью ЖК или ЖКОДЦ могут подвергаться модификациям, варьируя по длине цепи от 14 до 30 атомов С и могут быть гидроксильрованы в С2 положении и десатурированы в ω -9 положении, приводя к возникновению разнообразных изоформ сфинголипидов [54].

В свободных церамидах и гликозидах церамидов из всех исследованных источников преобладает 2-оксиглицероиновая кислота (или цереброновая кислота; $C_{24:0}$ -оксикислота или 24h:0); то же относится к фитогликолипидам. Часто гликоцереброзиды из листьев содержат много 2-оксипальмитиновой кислоты (16:0h); в руте, а также в корнях

овса (в гликозилцерамидах плазматической мембраны) найдено высокое содержание 2-оксинервоновой кислоты (см. выше) [18].

В составе ЖК цереброзидов корней и листьев арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) найдены как насыщенные C_{16-26} -2-оксикислоты, так и мононенасыщенные (20h:1, 22h:1, 24h:1 и 26h:1), и даже кислоты с нечетным числом атомов углерода (23h:1 и 25h:1). Главные из них – 2-оксинервоновая кислота (24h:1; 37–47%), 24h:0, 16h:0, 22h:0, 26h:0 и 26h:1. Существенно, что C_{16} и C_{18} моеновые 2-оксикислоты отсутствуют в изучаемых объектах [18].

В различных тканях обнаружена тенденция комбинирования диольных аминокислот с короткоцепочечными ($C_{16:0}$) оксикислотами, тогда как триольные аминокислоты обычно сопровождаются очень длинноцепочечными ($C_{24:0}$) оксикислотами [18]. Известно, что гликозилцерамиды семян обычно обогащены диольными аминокислотами и C_{16-20} насыщенными оксикислотами, в то время как в листьях эти липиды обогащены триольными аминокислотами и насыщенными, очень длинными ацильными цепями (C_{20-26}) [32, 81].

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И УЧАСТИЕ В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ ПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ

Разнообразие качественного и видового состава липидов мембран неразрывно связано с той многогранной ролью, которую последние выполняют в органах растений [82]. Клетки всех эукариотических организмов, в том числе и растений, помимо того, что сами ограничены мембраной, разделены на различные области или компартменты, также окруженные мембранами; эти образования называются органеллами. Таким образом, мембраны представляют собой одну из главных составляющих, “основу основ” растительных клеток – их мягкий скелет. Кроме того, именно на мембранах протекают многие важнейшие метаболические процессы, поскольку вторая главная составляющая всех эукариотических клеток – ферменты – большей частью базируются на мембранах и часто не способны выполнять свои функции вне этих мембран. Наконец, еще одна важнейшая составляющая растительных клеток – фотоактивные пигменты и реакционные центры, где эти пигменты функционируют (фотосистемы I и II), – требует жестких условий структурной организации. Эти реакционные центры локализованы, как известно, в мембранах стромальных и гранальных тилакоидов [83]. Известно, что толщина всей мембраны составляет 7–8 нм, а соответствующая величина для ее внутреннего гидрофобного слоя иногда принимается равной лишь 3 нм [5]. Биомембраны (в частности, плазмалемма), поми-

мо липидов, белков, стероидов включают значительное количество углеводов, большая часть которых, однако, не являются самостоятельной составляющей биомембран, а входят в состав ГЛ [1, 12, 13].

Как известно, функции мембран очень разнообразны. 1. Барьерная. Избирательная проницаемость обеспечивает отделение клетки и клеточных компартментов от окружающей среды и снабжение их необходимыми веществами и защиту от опасных для клетки веществ. 2. Транспортная. Пассивный и активный транспорт через мембраны обеспечивает доставку питательных веществ, удаление конечных продуктов обмена веществ, секрецию различных веществ, создание ионных градиентов, поддержание в клетке оптимального рН и концентрации ионов, которые нужны для работы клеточных ферментов. Так, транспортную функцию ПЛ можно наблюдать, если в нижнюю часть U-образной трубки поместить хлороформ, в левое колено – раствор меченой сахарозы, а в правое колено – воду. При этом сахароза не должна переходить в правое колено. Если же в слой хлороформа вносится ФХ, сахароза быстро распределяется в обоих коленах [84]. Аналогичное солюбилизирующее действие оказывают ФЛ и на нелипидные компоненты биологических тканей. Так, при количественной экстракции липидов из семян сои в экстракт переходит до 56% массы семян, тогда как на долю самих ПЛ в сухом остатке полученного экстракта приходится менее 5% [85].

3. Матричная. Обеспечивает определенное взаиморасположение и ориентацию мембранных белков, их оптимальное взаимодействие. 4. Механическая. Обеспечивает автономность клетки, ее внутриклеточных структур, а также соединение с другими клетками в тканях. 5. Энергетическая. При фотосинтезе в хлоропластах и клеточном дыхании в митохондриях в их мембранах действуют системы переноса энергии, в которых участвуют как липиды, так и белки. 6. Рецепторная. Некоторые белки, содержащиеся в мембране, являются рецепторами, при помощи которых клетка воспринимает те или иные сигналы. 7. Ферментативная. Мембранные белки нередко являются ферментами. 8. Маркировка клетки. На мембране имеются антигены, действующие как маркеры, позволяющие опознать клетку. Это гликопротеины с разветвленными олигосахаридными боковыми цепями, играющие роль “антенн”. С помощью маркеров клетки могут распознавать другие клетки и действовать согласованно с ними, например, при формировании органов и тканей, а также определять чужеродные антигены [13, 77].

Считается, что белки отвечают, в основном, за функционирование клеточных мембран, а ПЛ – за их структуру. В действительности и липиды могут

выполнять в мембранах разнообразные функции. При рассмотрении перечисленных функций мембран можно видеть, что участие и роль ПЛ в одних случаях больше, в других меньше, в третьих – их роль еще мало изучена, но ясно, что все эти функции осуществимы только при наличии и участии липидов этих мембран (табл. 2). В последнее время при описании макроструктуры, динамики и функционирования мембран подтверждается важность специализированных доменов, таких как липидные плоты и белково-гликопротеиновые комплексы [4, 86]. Липидные плоты действуют как буферы физических свойств мембран, противодействуя изменениям в окружающей среде путем коррекции своего состава. При этом в жидкой фазе бислоя распределяются липиды либо с большей, либо с меньшей температурой плавления, т. е. насыщенные или ненасыщенные [87].

Понятие липидных плотов имеет как широкое распространение, так и большую противоречивость. Главное затруднение в исследовании мембранных плотов сводится к отсутствию прямого микроскопического обнаружения этих областей в невозмущенном состоянии живой клетки, а также в определении их размеров, продолжительности жизни и частоты встречаемости в бислоях. Необходимо учитывать, что живые мембраны чрезвычайно сложны и разнообразны и могут содержать множество различных типов мембранных плотов, которые способны существовать лишь в определенных пространственных и временных масштабах [4].

Относительно рецепторной функции мембран необходимо отметить, что многие компоненты плазмалеммы после восприятия сигналов служат источником вторичных мессенджеров, которые передают сигнал по эстафете и усиливают его. Такими вторичными мессенджерами служат инозит-1,4,5-трифосфат (ИФ₃), ДАГ, ФК и продукты перекисного окисления липидов. Все эти соединения образуются из липидов плазмалеммы в результате воздействия сигнала на рецепторы [16, 86, 88].

Некоторые ПЛ являются предшественниками и участниками системы передачи гормонального сигнала. Так, известна фосфатидилинозитная система вторичных мессенджеров, работающая с рецепторами, расположенными на внешней стороне плазмалеммы. При связывании с гормоном белок-рецептор передает сигнал на *G*-белок, который связывает и удерживает гуанозинтрифосфат, при этом активируется до 10 молекул фосфолипазы С, входящей в состав мембранных белков. Затем происходит гидролиз гуанозинтрифосфата, гуанозиндифосфата, и фосфат освобождается. Активация фосфолипазы С приводит к гидролизу фосфатидилинозитдифосфата (ФИ_(4,5)-дифосфа-

Таблица 2. Главные классы ПЛ, участвующие в функционировании мембран растительных клеток*

№	Функции мембран	Класс липидов	Ссылка
1.	Барьерная	Главные ФЛ и ГЛ, бетаин-липиды, эфиры глюкозы и сахарозы с ЖК	[18, 37]
2.	Транспортная	ФЭ, ФХ, ФГ, N-АФЭ и ГЛ	[21, 84]
3.	Матричная	Аннулярные липиды	[76]
4.	Механическая	ФХ, ФЭ, ФИ и ГЛ	[7, 15, 16]
5.	Энергетическая		
	а) в хлоропластах	а) МГДГ, ДГДГ, СХДГ, ФГ	а) [10, 13, 18, 31, 32]
	б) в митохондриях	б)ДФГ	б) [12, 24]
6.	Рецепторная	ФК, ДАГ, ФИ, ФГЛ, ЖКОДЦ	[16, 17, 19, 31, 33, 59, 85]
7.	Ферментативная	ФИ, ФС, ФГ, ФЭ, ФХ	[17, 18, 22, 24, 26, 28]
8.	Маркировка клетки	Цереброзиды, ЖКОДЦ	[15, 55, 75]

*Помимо указанных, в рамках каждой из функций мембран участвуют и многие другие минорные, составляющие группу ПЛ.

та); именно этот процесс дал название всему каскаду вторичных мессенджеров. При этом в мембране остается остаток ДАГ, а в цитоплазму поступают ИФ₃ и активатор протеинкиназы С [89]. Эти реакции происходят уже через 10–15 с после получения сигнала, достигая максимума через 60 с. ИФ₃ может взаимодействовать с Ca²⁺-каналами на мембране, и кальций начинает поступать в клетку [89]. Чтобы избежать избытка Ca²⁺ и автолиза клетки, происходит дополнительное фосфорилирование ИФ₃, а инозиттетрафосфат уже не взаимодействует с Ca²⁺-каналами; при необходимости из него может быть получена новая порция ИФ₃. После достижения максимума ИФ₃ поэтапно гидролизуется до инозита, который включается в ФИ и только в составе мембраны фосфорилируется до ФИ_(4,5)-дифосфата и используется еще раз [13, 86, 90]. Таким образом, плазматическая мембрана является местом не только рецепции сигналов, но и их усиления и дифференцирования.

Важнейшая функция растительной клетки – фотосинтез, в осуществлении которого мембраны принимают активное участие. Эффективное поглощение света и преобразование его энергии хлорофиллом основывается на высокой степени организации внутренних мембранных структур хлоропластов, наиболее важными моментами которой можно считать перечисленные ниже. 1. Необходимая ориентация пигментов в мембране. 2. Наличие соответствующих структур, в которых фотовозбужденный пигмент и химический акцептор жестко ориентированы относительно друг друга. 3. Определенная последовательность и строгая ориентация переносчиков электронов и протонов в мембране. 4. Организованная система мембран в хлоропластах, обеспечивающая сопряжение транспорта электронов и синтеза АТФ [13].

Известно, что клеточные мембраны часто асимметричны, то есть слои различаются по со-

ставу липидов. Так, в наружном слое могут содержаться преимущественно ФХ, ГЛ, сфинголипиды и ФИ, тогда как во внутреннем – ФЭ, ФС и ФИ. Важную часть мембран составляют интегральные белки, пронизывающие их и отвечающие за их разнообразные свойства. Рядом с этими мембранными белками находятся аннулярные липиды, которые более упорядочены, менее подвижны, имеют в составе более насыщенные ЖК и выделяются из мембран вместе с белками. Без аннулярных липидов большинство мембранных белков не функционируют [13, 76].

Все органеллы клетки могут быть одномембранными, как ЭР, аппарат Гольджи, лизосомы, вакуоли и пероксисомы, либо двумембранные, как ядро, митохондрии и пластиды. Внутренняя мембрана оболочки хлоропластов участвует в формировании внутренней мембранной системы этих органелл. Внутренние мембраны (ламеллы) образуют тилакоиды, которые уложены в стопки или грани (тилакоиды гран) или пронизывают строму (матрикс хлоропластов), соединяя грани между собой (тилакоиды стромы). Соответственно, образующие их мембраны называют мембранами (ламеллами) гран, либо стромы. Тилакоиды гран могут быть пронизаны одной или несколькими тилакоидами стромы.

Химический анализ внутренних мембран хлоропластов показывает, что соотношение липидов и белков по массе близко к 1 : 1, а их молярное соотношение составляет 500 : 1; к липидам здесь причислены хлорофиллы, каротиноиды и пласто- и филлохиноны, которые составляют около 65% липидов мембран хлоропластов. Кроме того, в мембранах хлоропластов содержится много α-токоферола, который повышает их устойчивость к свободнорадикальным процессам. Стерины придают мембранам жесткость, занимая свободное пространство между гидрофобными хво-

стами липидов и упорядочивая их расположение [13, 47].

Особенностью мембран хлоропластов является высокое содержание в них ГЛ, в отличие от других мембран клетки, где преобладают ФЛ. В мембранах тилакоидов хлоропластов ГЛ составляют 75% всех липидов мембран. Основными представителями ФЛ в мембранах хлоропластов являются ФГ (11% от общего содержания в них липидов). В ФГ этих мембран входит специфичная для них ЖК — *транс*-3-гексадеценовая (16:3^{Δ7,10,13}). Ее присутствие необходимо для сборки светособирающих комплексов хлоропластов [70].

Особого внимания заслуживают мембраны ЭР, поскольку они не только сами состоят из ПЛ, но и являются местом синтеза как ПЛ, так и входящих в них ЖК. Как и прочие органеллы, ЭР имеет полость, которая отделена от цитозоля лишь одинарной мембраной; эта полость занимает не менее 10% от общего объема клетки. Мембрана ЭР имеет многочисленные складки и изгибы и образует непрерывную поверхность, ограничивающую единое внутреннее пространство, которое и является полостью ЭР. Таким образом, ЭР представляет собой непрерывную сеть канальцев, которые состоят из пластинчатых и трубчатых цистерн, пронизывают всю цитоплазму и соединяются с ядерной оболочкой. На мембранах этих канальцев приходится более половины общего количества всех мембран клетки [13]. Следует отметить, что при фракционировании органелл разрушенных клеток с помощью центрифугирования фрагменты ЭР обнаруживаются в микросомальной фракции.

ЭР характеризуется практически неподвижным, фиксированным расположением спиралеобразных участков сети и канальцев со слепыми окончаниями. Исходной структурой ЭР являются трубчатые канальцы, характерные для гладкого ЭР. Шероховатый ЭР отличается от гладкого наличием закрепленных на его мембранах рибосом. Одна из основных функций мембран гладкого ЭР — синтез молекул липидов, поэтому они обогащены различными ферментами биосинтеза как глицеролипидов, так и других близких к ним соединений [13].

Дальнейшее понимание биохимических (и биофизических, в случае фотосинтеза) процессов, происходящих в растительной клетке, затруднено без изучения физического и химического состояния мембран и, что очень важно, строения мембран на молекулярном уровне. Важно строить и изучать трехмерные модели каждой отдельной мембраны с учетом молярного содержания в ней каждого из классов ПЛ, а также всех стеринов, каждого из белков и всех остальных соединений, контактирующих с мембраной в данный момент. Приводимый многими авторами со-

став ПЛ в отдельных мембранах, как правило, почти не привлекается для продолжения изучения строения и функционирования этой мембраны. Для преодоления технических и концептуальных барьеров, с которыми сталкивается дальнейшее изучение строения биологических мембран, необходим междисциплинарный подход, предполагающий совместную работу биохимиков, физиков, математиков и специалистов в области компьютерных технологий [5]. В настоящее время возможности компьютерной и вычислительной техники позволяют, вероятно, строить пространственные, трехмерные модели мембран, и с учетом достижений физической химии и стереохимии изучать липид-белковые взаимодействия, контакты стеринов с окружающими их липидами и другими соединениями, взаимодействие ферментов с их липидным микроокружением, плотную упаковку хлорофилла и других порфиринов в липидных бислоях. Методы компьютерного моделирования уже успешно применяются при изучении мембран *Sulfolobus acidocaldarius*, состоящих как из ди-, так и тетраэфирных ФЛ [91].

Очевидно, что роль мембранных липидов при выполнении мембранами перечисленных функций достаточно велика. Можно представить, насколько продвинется вперед познание всех этих процессов, когда будут построены трехмерные стереохимические и физико-химические модели всех характерных мембран или их определяющих участков. Дополнительные трудности в моделировании участков бислоя создает отсутствие единой концепции в определении общего силового электрического поля, который образуется суммой заряженных ПЛ [46]. Липидный бислой мембран может быть связан с сопутствующими белками тремя различными способами. Интегральные белки расположены непосредственно в бислое, тогда как периферийные ассоциированы либо с интегральными белками, либо с бислоем за счет водородных связей, слабых электростатических взаимодействий, либо ионных связей [92]. В отличие от остальных, интегральные белки не растворимы в воде и не могут быть удалены из мембраны без ее разрушения, поскольку часть этого белка встроена в гидрофобную часть бислоя мембраны. Наконец, роль мембранного удерживающего фактора (“якоря”) могут выполнять ковалентно связанные с белком остатки насыщенных ЖК 14:0 и 16:0, некоторые изопреноиды или ФИ. Белки, ковалентно связанные с ЖК, локализованы в основном на внутренней поверхности плазматической мембраны. Кислота 14:0 присоединяется к N-концевой (терминальной) группе глицина с образованием амидной связи [93]. Кислота 16:0 образует тиоэфирную связь с цистеинами в C-конце полипептидной цепи или сложноэфирную связь с остатками серина и треонина [2, 15].

ГФИ-заякоренные белки [59, 94] присоединяются к внешней (экстрацеллюлярной) стороне мембраны следующим образом: глицерин – Р – инозит – глюкозамин – (манноза + галактоза) – манноза – манноза – Р – этаноламин – белок. Присоединение белков к липидам мембран осуществляется также с помощью предварительного пренилирования этих белков, которое включает в себя присоединение к ним таких гидрофобных молекул, как пренильные группы (3-метилбут-2-ен-1-ил), что облегчает дальнейшее присоединение их к липидным мембранам, аналогично якорным белкам. При пренилировании происходит присоединение либо фарнезила (C_{15}), либо остатка геранилгеранила (C_{20}), встроенных в бислой, к С-терминалу цистеина белка-мишени с помощью фарнезилтрансферазы и геранилгеранилтрансферазы [95–97].

О МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛИРОВАНИЯ СТРУКТУРЫ МЕМБРАН

Полиморфные переходы цепей ЖК под действием температуры (термотрофный мезоморфизм) и процессы гидратации полярных радикалов (лиотропный мезоморфизм) служат теми рычагами, с помощью которых клетка может регулировать структуру мембран. Существуют разные динамические характеристики липидного бислоя, такие как латеральная диффузия молекул, молекулярная подвижность, вращение цепей ЖК и др. Для характеристики степени неупорядоченности или молекулярной подвижности внутренней части липидного бислоя используется термин “текучесть” мембран (fluidity), т.е. способность липидов (а также и белков) к латеральной диффузии. Скорость перемещения молекул при этом зависит от микровязкости мембран, которая, в свою очередь, определяется относительным содержанием насыщенных и ненасыщенных ЖК в составе липидов. Текучесть мембран больше, если в составе липидов преобладают ненасыщенные ЖК и меньше при высоком содержании насыщенных кислот.

Насыщенные ЖК образуют в мембране участки с плотной упаковкой и регулярной структурой. В участках с ненасыщенными кислотами плотная упаковка нарушается изгибами углеводородной цепи, возникающими за счет двойных связей в *cis*-конфигурации, что препятствуют слишком плотной упаковке молекул в липидном бислое, ведет к разрыхлению и увеличению текучести последнего. На текучесть мембран также влияют размеры углеводородных хвостов ЖК, с увеличением длины которых мембрана становится более текучей [24]. В этом случае, например, миристиновая кислота может уменьшать текучесть мембран и за счет того, что она насыщенная, и за счет своей короткой цепи. Известно, что при снижении темпера-

туры окружающей среды текучесть мембран снижается. В настоящее время текучесть мембран может быть оценена различными физическими методами: измерением анизотропии поляризации флюоресценции дифенилгексатриенов, внедряемых в мембраны, с помощью электронного парамагнитного резонанса и инфракрасной спектроскопии Фурье.

В последнем методе более высокие значения частот колебаний групп CH_2 соответствуют более неупорядоченным структурам ЖК-цепей липидов мембран и, следовательно, большей текучести. Способом установления текучести мембран является и ГЖХ-анализ ЖК-состава этих мембран с последующим определением соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК. В этом случае, вероятно, не будут обнаружены различия, вызванные быстрым изменением температуры роста до температур низкотемпературного и теплового шока; для нахождения различий в ЖК-составе потребуются более длительное время, необходимое для синтеза и включения в мембрану новых кислот.

От соотношения ненасыщенных и насыщенных ЖК в ПЛ, составляющих мембрану, зависит ее текучесть. Считается, что у растений, выращиваемых при низких температурах, степень ненасыщенности ЖК в составе мембран растет для того, чтобы компенсировать снижение текучести, вызываемое охлаждением.

Установлено, что при снижении температуры происходит уменьшение текучести мембран, которое воспринимается сенсором – мембранной гистидинкиназой Nik 33. Эта киназа передает сигнал регуляторным молекулам, которые взаимодействуют с промоторами генов и вызывают их индукцию. В результате синтезируются десатуразы ЖК, осуществляется десатурация, и текучесть мембран восстанавливается до оптимального уровня, физиологически эквивалентного уровню текучести при нормальной температуре [98].

В опытах по изучению мембран их текучесть можно изменить и без снижения температуры, с помощью метода каталитического гидрирования ЖК мембранных липидов (плазмалеммы клеток) с использованием платино-палладиевого катализатора, который позволяет контролировать насыщение двойных связей в цепях ЖК [96]. Такое гидрирование осуществлялось в течение короткого времени (1–4 мин) и контролировалось по наличию фотосинтетической активности клеток (скорости выделения кислорода).

Регуляция физических свойств мембран для температурной компенсации может зависеть от распределения ЖК в положениях *sn*-1 и *sn*-2 в различных молекулярных формах некоторых фосфоглицеридов [24]. Так, в состав трифосфоинозитидов по первому положению глицерина входят в основном ацильные остатки насыщенных (C_{16} и C_{18}) ЖК. Наличие в мембранах стери-

нов уменьшает подвижность ЖК, снижает латеральную диффузию липидов и белков, и поэтому также может влиять на функцию мембранных белков. Молекулы стеринов состоят из жесткого гидрофобного ядра и гибкой углеводородной цепи, а полярной головкой является единственная гидроксильная группа, которая контактирует с гидрофильными головками других ПЛ. Эти молекулы располагаются в липидном слое мембраны параллельно алифатическим цепям молекул ПЛ [24].

Не следует забывать о трансмембранной (поперечной) асимметрии, когда ПЛ с более объемными полярными головками стремятся находиться в наружном монослое, так как там больше площадь поверхности, приходящаяся на одну полярную головку. Так, ФХ и гликофинголипиды локализованы преимущественно в наружном слое, а ФЭ и ФС, в основном, во внутреннем. Специфическим ФЛ внутренней мембраны митохондрий является кардиолипин; он синтезируется ферментами внутренней мембраны митохондрий и составляет более 20% от всех ФЛ этой мембраны [8]. Известно, что липиды в некоторых мембранах могут мигрировать с одной стороны мембраны на другую, т.е. совершают “флип-флоп” перескоки. Такое перемещение липидных молекул затрудняют их полярные головки, поэтому ПЛ, находящиеся на внутренней стороне мембраны, имеют в этом отношении преимущество и имеют относительно высокую скорость трансмембранной миграции.

Помимо участия в формировании липидного бислоя, ФЛ и ГЛ выполняют ряд других важных функций. Липиды формируют среду для функционирования мембранных белков, принимаящих в ней нативную конформацию. Уже говорилось, что выделенные из мембран ферменты, лишенные липидного окружения (аннулярных липидов), как правило, не проявляют каталитической активности. С другой стороны, есть данные, что белки, даже после многочасового выдерживания их при 72°C, способны после контакта их с ФЛ восстанавливать свою биологическую активность [99]. В регулировании внутриклеточного транспорта широкого спектра молекул играют важную роль различные модификации белков липидами или родственными им производными.

В настоящее время молекулярный механизм транслокации белков через мембраны остается недостаточно изученным. До сих пор непонятно, проходит ли белок через заполненные водой поры в мембране или проникает через сам липидный бислой. Возможно, белки (особенно заряженные положительно) проходят через внутреннюю, гидрофобную часть мембраны внутри “вывернутых” липосом, у которых наружный слой образован гидрофобными хвостами ЖК, а полярные головки находятся внутри и охватывают молекулу белка [79]. Такая липосома может

формироваться при электростатическом взаимодействии молекулы белка с отрицательно заряженными кислыми ФЛ наружного слоя мембраны; участок внешнего слоя мембраны при этом отрывается, охватывает белок, и образовавшаяся липосома преодолевает оставшуюся часть пути. При этом особенно велика роль такого отрицательно заряженного фосфолипида, как ДФГ, который, в отличие от остальных кислых ПЛ (ФИ, ФГ, ФС и СХДГ), имеет не одну, как обычно, а две кислотные группы.

Показано, что присутствие ДФГ в составе искусственных липосом приводит к 8-кратному увеличению включения белка рибонуклеазы в эти липосомы по сравнению с аналогичными липосомами с ФХ [100]. Это увеличение обусловлено, очевидно, тем, что рибонуклеаза, подобно другим растворимым, положительно заряженным белкам (апоцитохрому С и др.), взаимодействует с кислыми ФЛ в большей степени, чем с нейтральными. Показано также, что ДФГ вызывает структурные изменения в биомембранах, увеличивает текучесть бислоя и его пропускную способность. Присутствие ДФГ в бислое мембран приводит к образованию в нем замкнутых со всех сторон 4-слойных участков, аналогичных митохондриальным контактными площадкам. Эти неламеллярные образования играют, вероятно, ключевую роль в структуре и функциях мембран [23].

Все полученные экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли физического состояния биологических мембран, определяемого степенью ненасыщенности ЖК липидов этих мембран. Очевидно, что изменения в физических свойствах мембран связаны с изменением состава и строения ПЛ, составляющих эти мембраны. С другой стороны, эти изменения играют важную роль в регуляции стрессовых ответов у различных растительных организмов. Мембраны растительных клеток могут быть первичным сенсором изменений параметров внешней среды. Эти изменения воспринимаются с помощью мембранных сенсорных белков, которые переносят сигнал от внешнего раздражителя внутрь клетки, запуская регуляторные процессы, связанные с передачей сигнала и экспрессией определенных групп генов, необходимых для приспособления организма к новым условиям. Изменение состава и строения ПЛ также может напрямую влиять на активность мембраносвязанных ферментов, таких, как переносчики молекул, ионные каналы, рецепторные протеинкиназы, а также и на другие сенсорные белки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, согласованное функционирование мембранных систем — бислоя ПЛ, рецепторов, ферментов, транспортных механизмов помогает под-

держивать гомеостаз клетки и, в то же время, быстро реагировать на изменения внешней среды. Приведенные данные показывают, насколько может быть разнообразен качественный состав ПЛ бислоя мембран. Кроме того, отдельные классы ПЛ, помимо ряда обычных ЖК и ЖКОДЦ, обогащены оксикислотами или содержат высшие аминоспирты. В настоящее время роль многих минорных компонентов мембран еще мало изучена по отношению участия их как в построении бислоя, так и в целом ряде физиологических процессов в клетке. Так называемый “вычислительный микроскоп” – моделирование молекулярной динамики ПЛ – послужит, вероятно, важным инструментом для изучения их воздействия на структуру и функции белков биомембран.

Если наиболее распространенные в количественном отношении полярные липиды – ФХ и ФЭ, по-видимому, составляют основу биомембран (матрицу), то ряд классов липидов, относящихся либо к заряженным (ДФГ, ФГ), либо к высокополярным (ФГЛ), либо совмещающим эти два свойства (ФИ, ФС и СХДГ) соединениям, несомненно, входят в состав липидных плотов, изучение которых находится еще в самом начале. Известные несколько ранее аннулярные липиды, сопутствующие ферментам, базирующимся в биомембранах, по своему качественному составу практически совпадают с липидами плотов. Эти классы липидов, как правило, бывают обогащены насыщенными ЖК и, в первую очередь, пальмитиновой кислотой.

Наши данные свидетельствуют о том, что регуляторную структуру мембран, необходимую для поддержания жизнедеятельности клеток, можно создать лишь в том случае, если насыщенность ацильных компонентов липидов этих мембран не будет ниже определенного уровня. В зависимости от гено- и фенотипа растения, а также от качественного состава классов липидов этот уровень может быть различным.

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

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Проект № 0106-2019-0008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Геннис Р.* Биомембраны. Молекулярная структура и функции. Москва: Мир, 1997. 624 с.
2. *Dowhan W., Bogdanov M., Mileykovskaya E.* Functional roles of lipids in membranes // *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* / Eds. Vance D.E., Vance J.E. Elsevier, 2008. P. 2.
3. *Watson H.* Biological membranes // *Essays Biochem.* 2015. V. 59. P. 43.
<https://doi.org/10.1042/BSE0590043>
4. *Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C.* The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts // *Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. P. 361.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
5. *van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W.* Membrane lipids: Where They Are and How They Behave // *Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 112.
<https://doi.org/10.1038/nrm2330>
6. *Harwood J.L.* Plant acyl lipids: structure, distribution, and analysis // *The Biochemistry of Plants*. V. 4. Lipids: Structure and Function / Ed. by Stumpf P.K. N.Y.: Academic Press, 1980. P. 1.
7. *Ansell G.V., Hawthorne J.N., Dawson R.M.C.* Form and function of phospholipids. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1973. P. 494.
8. *Hsieh T.C.-Y., Lester R.L., Laine R.A.* Glycophosphoceramides from plants. Purification and characterization of a novel tetrasaccharide derived from tobacco leaf Glycolipids // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 7747.
9. *Mudd J.B.* Phospholipid biosynthesis // *The Biochemistry of plants*. V. 4. Lipids: Structure and Function / Ed. by Stumpf P.K. N.Y.: Academic Press, 1980. P. 250.
10. *Heinz E.* Plant glycolipids: structure, isolation and analysis // *Advances in Lipid Methodology – Three* V. 7. /Ed. by *Christie W.W. Dundee*: The Only Press, 1996. P. 211.
11. *Li-Beisson Y., Thelen J.J., Fedosejevs E., Harwood J.L.* The lipid biochemistry of eukaryotic algae // *Progress in Lipid Res.* 2019. V. 74. P. 31.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>
12. *Schmid K.M., Ohrogge J.B.* Lipid metabolism in plants // *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* / Eds. Vance D.E., Vance J.E. Elsevier, 2008. P. 98.
13. *Физиология растений* / Под ред. Ермакова И.П. Москва: Академия, 2007. 635 с.
14. *Douce R., Joyard J.* Plant galactolipid // *The Biochemistry of Plants*. V. 4. Lipids: Structure and Function / Ed. Stumpf P.K. N.Y.: Acad. Press, 1980. P. 321.
15. *Christie W.W.* Lipid Analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Oxford, N.Y., Toronto: Pergamon Press, 1973. P. 338.
16. *Хелдт Г.-В.* Биохимия растений. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 471 с.
17. *Кейтс М.* Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. Москва: Мир, 1975. 322 с.
18. *Christie W.W.* Separation of phospholipid classes by high-performance liquid chromatography // *Advances in Lipid Methodology – Three* / Ed. by *W.W. Christie. Dundee*: The Oily Press, 1996. P. 77.
19. *Choudhury S.R., Pandey S.* Phosphatidic acid binding inhibits RGS1 activity to affect specific signaling pathways in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2017. V. 90. P. 466.
20. *Menon A.K., Stevens V.L.* Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a gly-

- cosylphosphatidylinositol anchor to protein // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 15277.
21. *Chapman K.D.* Emerging physiological role for N-acylphosphatidylethanolamine metabolism in plants: signal transduction and membrane protection // *Chem. Phys. Lipids.* 2000. V. 108. P. 221.
 22. *Zhukov A.V., Vereshchagin A.G.* Mild nonenzymatic hydrolysis of an ester bond between the orthophosphoric acid and ethanolamine residues in phosphatidylethanolamines // *Chemistry and Physics of Lipids.* 1996. V. 82. P. 1.
 23. *Unsay J.D., Cosentino K., Subburaj Y., García-Sáez A.J.* Cardiolipin Effects on Membrane Structure and Dynamics // *Am. Chem. Soc.* 2013. V. 29. P. 15878. <https://doi.org/10.1021/la402669z>
 24. *Северин Е.С.* Биохимия. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 759 с.
 25. *Cote G.G., Crain R.C.* Biochemistry of phosphoinositides // *Plant Physiol. and Plant Molecular Biol.* 1993. V. 44. P. 333.
 26. *Irvine R.F., Letcher A.J., Lander D.J., Drobak B.K., Dawson A.P., Musgrave A.* Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate and phosphatidylinositol (4) phosphate in plant tissues // *Plant Physiol.* 1989. V. 89. P. 888. <https://doi.org/10.1104/pp.89.03.888>
 27. *Furt F., Simon-Plas F., Mongrand S.* Lipids of the plant plasma membrane // *The Plant Plasma Membrane. Plant Cell Monographs* / Eds. Murphy A.S. et al. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. P. 3.
 28. *Michell R.H.* The cellular function of phosphoinositides // *Advances in Plant Lipid Research* / Eds. Sánchez J. et al. Spain: Universidad de Sevilla, 1998. P. 389.
 29. *Carpaneto A., Voccaccio A., Lagostena L., Di Zanni E., Scholz-Starke J.* The signaling lipid phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate targets plant CLC-a anion/H⁺ exchange activity // *Embo Reports.* 2017. V. 18. P. 1100. <https://doi.org/10.15252/embr.201643814>
 30. *Okamoto T., Dariania L., Nishikoori M., Nakazato H., Okuyama H., Thompson, Jr. G.A.* Studies of Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Spirodela oligorrhiza*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa* // *Advances in Plant Lipid Research* / Eds. Sánchez J. et al. Sevilla: Univer. de Sevilla, 1998. P. 410.
 31. *Gurr M.I., James A.T.* Lipid Biochemistry: an Introduction. London: Chapman and Hall Ltd., 1971. P. 231.
 32. *Siegenthaler P.A.* Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants // *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* / Eds. Siegenthaler P.A., Murata N. V. 6. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. P. 119.
 33. *Lynch D.V., Bromley P.E.* The structure and synthesis of inositolphosphorylceramides in plants // *Advances in Plant Lipid Research* / Eds. Sánchez J. et al. Sevilla: Univer. de Sevilla, 1998. P. 406.
 34. *Carter H.E., Strobach D.R., Hawthorne J.N.* Biochemistry of the sphingolipids. XVIII. Complete structure of tetrasaccharide glycolipid // *Biochemistry.* 1969. V. 8. P. 383.
 35. *Hsieh T.C., Kaul K., Laine R.A., Lester R.L.* Structure of a major glycosphosphoceramide from tobacco leaves, PSL-1 // *Biochemistry.* 1978. V. 17. P. 3575.
 36. *Kaul K., Lester R.L.* Isolation of six novel phosphoinositol-containing sphingolipids from tobacco leaves // *Biochemistry.* 1978. V. 17. P. 3569.
 37. *Du Z., Chen Z., Moore Jr. T.S.* Biosynthesis of diacylglyceroltrimethylhomoserine in *Chlamydomonas reinhardtii*. Compartmentalization and general characteristics // *Advances in Plant Lipid Research* / Eds. Sánchez E. et al. Sevilla: Univer. de Sevilla, 1998. P. 240.
 38. *Lee J.-W., Shin S.-Y., Kim H.-S., Jin E.S., Lee H.-G., Oh H.-M.* Lipid turnover between membrane lipids and neutral lipids via inhibition of diacylglycerol N, N, N-trimethylhomoserine synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Algal Research.* 2017. V. 27. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.001>
 39. *Eichenberger W.* Identification of new plant lipids: structure of a second betaine lipid from algae // *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* / Eds. Quinn P.J., Harwood J.L. London: Portland Press Limited, 1990. P. 9.
 40. *Vogel G., Eichenberger W.* Biosynthesis and metabolism of betaine lipids in *Ochromonas danica* (Chryso-phyceae) // *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* / Eds. Quinn P.J., Harwood J.L. London: Portland Press Limited, 1990. P. 235.
 41. *Sidorov R.A., Zhukov A.V., Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G., Tsyendambaev V.D.* Content and fatty acid composition of neutral acylglycerols in *Eunymus* fruits // *Amer. Oil Chem. Soc.* 2014. V. 91. P. 805.
 42. *Scholfield C.R.* Composition of soybean lecithin // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1981. V. 58. P. 889.
 43. *Вавер В.А., Стоянова В.Г., Гейко Н.С., Нечаев А.П., Тодрия К.Г., Бергельсон Л.Д.* Диольные липиды. Ацильные производные 1-О-β-D-глюкозилэтиленгликоля в созревающих семенах пшеницы // *Биоорганич. химия.* 1976. Т. 2. С. 530.
 44. *Stanislas T., Platre M.P., Liu M., Rambaud-Lavigne L.E.S., Jaillais Y., Hamant O.* A phosphoinositide map at the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Biology.* 2018. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0490-y>
 45. *Peeler T.C., Stephenson M.B., Einspahr K.J.* Lipid characterization of an enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity // *Plant Physiol.* 1989. V. 89. P. 970.
 46. *Pöyry S., Vattulainen I.* Role of charged lipids in membrane structures — Insight given by simulations // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1858. P. 2322. <https://doi.org/10.1016/j.bbamen.2016.03.016>
 47. *Rawlyer A., Meylan M., Siegenthaler P.-A.* Galactolipid synthesis in intact spinach chloroplasts and its relations with lipid asymmetry in thylacoid membranes // *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* / Eds. Quinn P.J., Harwood J.L. London: Portland Press Limited, 1990. P. 84.
 48. *Harwood J.L.* Sulfolipid // *The Biochemistry of Plants.* V. 4. Lipids: Structure and Function / Ed. by Stumpf P.K. N.Y.: Academic Press, 1980. P. 301.
 49. *Joyard J., Block M.A., Malherbe A., Marechal E., Douce R.* Origin and synthesis of galactolipid and sul-

- folipid head-groups // Lipid Metabolism in Plants / Ed. by T.S. Moore Jr. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1993. P. 231.
50. Michaelson L.V., Napier J.A., Molino D., Faure J.-D. Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaptation // Biochem. Biophys. Acta. 2016. V. 1861. P. 1329.
51. Hou C.T., Umemura Y., Nakamura M., Funahashi S. Enzymatic synthesis of steryl glucoside by a particulate preparation from immature soybean seeds // J. Biochem. 1968. V. 63. P. 351.
52. Lester R.L., Dickson R.C. Sphingolipids with inositol-phosphate-containing head group // Adv. Lipid Res. 1993. V. 26. P. 253.
53. Lynch D.V. Sphingolipids // Lipid Metabolism in Plants / Ed. by T.S. Moore Jr. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1993. P. 285.
54. Murata N., Sato N., Takahashi N. Very-long-chain saturated fatty acids in phosphatidylserine from higher plant tissues // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 795. P. 147.
55. Imai H., Ohnishi M., Kojima M., Ito S. Cerebrosides in seed-plant leaves: composition of fatty acids and sphingoid bases // Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids / Eds. Williams J.P. et al. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 1997. P. 224.
56. Sperling P., Franke S., Luthje S., Heinz E. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? // Plant Physiol. Biochem. 2005. V. 43. P. 1031.
57. Imre Z. Phytoglycolipids in the seeds of *Pistacia vera* L. // Z. Naturforschung. 1974. V. 29. P. 195.
58. Fang L., Ishikawa T., Rennie E.A., Murawska G.H., Lao J., Yan J., Tsai A. Y.-L., Baidoo E.E.K., Xu J., Keasling J.D., Demura T., Kawai-Yamada M., Scheller H.V., Mortimer J.C. Loss of inositol phosphorylceramide sphingolipid mannosylation induced plant immune responses and reduces cellulose content in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2016. V. 28. P. 2991.
<https://doi.org/10/1105/tpc.16.00186>
59. Morita N., Nakazato H., Okuyama H., Kim Y., Thompson Jr. G.A. Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza* // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 21. P. 53.
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00185-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(95)00185-9)
60. Bohn M., Heinz E., Luthje S. Lipid composition of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots // Arch. Biochem. Biophys. 2001. V. 387. P. 35.
61. Imai H. Glucocerebrosides containing unsaturated hydroxy fatty acids in *Arabidopsis thaliana* // Advances in Plant Lipid Research / Eds. Sánchez E. et al. Sevilla: Univer. de Sevilla, 1998. P. 38.
62. Жуков А.В., Стефанов К.Л., Верещагин А.Г. О качественном составе отдельных классов полярных липидов из семян сои // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 518.
63. Privett O.S., Dougherty K.A., Erdahl W. E., Stolyhwo A. Studies on the lipid composition of developing soybeans // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1973. V. 50. P. 516.
64. Harwood V.L. Lipid synthesis by germinating soya bean // Phytochemistry. 1975. V. 14. P. 1985.
65. Singh H., Privett O.S. Studies on the glycolipids and phospholipids of immature soybeans // Lipids. 1970. V. 5. P. 692.
66. Rohrllich M., Niederauer Th. Untersuchungen über Fett-Eiweiss-Komplexe in Cerealien. II. Über die Zusammensetzung der Protein- und der Lipoidkomponente // Fette, Seifen, Anstrichmitt. 1968. V. 70. P. 58.
67. Eklund A. Preparation and chemical analyses of a lipoprotein concentrate from Niger Seed (*Guisotia abyssinica* Cass.) // Acta Chemica Scandinavica. 1971. V. 25. P. 2225.
68. Kito M., Nakayama Y., Kanamoto K., Sato K. Occurrence of a protein-phospholipid complex in soybean oil // Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. P. 2219.
69. Doherty A., Gray J.C. Synthesis of a dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipids by isolated pea chloroplasts // Eur. Biochem. 1980. V. 108. P. 131.
70. Верещагин А.Г. Липиды в жизни растений. 66-е Тимирязевское чтение. Москва: Наука, 2007. 78 с.
71. Макаренко С.Л., Коненкина Т.А., Путилина Т.Е., Донская Л.И., Музалевская О.В. Жирнокислотный состав липидов эндосперма и зародыша семян *Pinus sibirica* и *P. silvestris* // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 535.
72. Mongrand S., Badoc A., Patouille B., Lacomblez Ch., Chavent M., Cassagne C., Bessoule J.-J. Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition // Phytochemistry. 2001. V. 58. P. 101.
73. Wolff R.L., Pedrono F., Pasquier E., Marpeau A.M. General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of $\Delta 5$ -olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus // Lipids. 2000. V. 35. P. 1.
74. Жуков А.В., Кузнецова Э.И., Сидоров Р.А., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д. Жирнокислотный состав липидов листьев и стробилов саговника поникающего (*Cycas revoluta*) // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 18.
75. Жуков А.В. Жирные кислоты с очень длинной цепью в составе мембранных липидов растений // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 418.
76. Жуков А.В. Пальмитиновая кислота и ее роль в строении и функциях мембран растительной клетки // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 751.
77. Жуков А.В., Верещагин А.Г. Характеристика состава отдельных фракций полярных липидов семян сои // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 390.
78. Sander mann H. Regulation of membrane enzymes by lipids // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 515. P. 209.
79. Nobusawa T., Okushima Y., Nagata N., Kojima M., Sakakibara H., Umeda M. Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation // PLoS Biol. 2013. V. 11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001531>
80. Bocttcher C., Weiler E.W. Cyclo-oxylin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics // Planta. 2007. V. 226. P. 629.

81. *Bach L., Faure J.-D.* Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter // *Comptes Rendus Biologies*. 2010. V. 333. P. 361.
82. *Epanand R.M.* Introduction to Membrane Lipids. Methods in Membrane Lipids. Methods in Molecular Biology / Ed. by Owen D.M. V. 1232. N.Y.: Springer Science + Business Media, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1762-6>
83. *Higashi S., Fujimura Y., Murata N.* Analysis of lipids in spinach photosystem 2 // *Plant Lipid Biochemistry, Structure and Utilization* / Eds. Quinn P.J., Harwood J.L. London: Portland Press Limited, 1990. P. 87.
84. *Bailey J.M.* Specificity of sugar-phospholipid interactions // *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. V. 158. P. 586.
85. *Zhukov A.V., Vereshchagin A.G.* Current techniques of extraction, purification and preliminary fractionation of polar lipids of natural origin // *Advans. Lipid Res.* N.-Y.: Academic Press, 1981. V. 18. P. 247.
86. *Heilmann I., Perera I.Y., Stevenson J.M., Ransom W.D., Gross W., Boss W.F.* Inositol lipid signaling: what can we learn from plants? // *Advances in Plant Lipid Research* / Eds. Sevilla: Univer. de Sevilla, 1998. P. 394.
87. *Nicolson G.L.* The Fluid – Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // *Bioch. Biophys. Acta*. 2014. V. 1838. P. 1451. <https://doi.org/10.1016/j.bhamem2013.10.019>
88. *Nickels J.D., Smith M.D., Alsop R. J., Himbert S., Yahya A., Cordner D., Zolnierczuk P., Stanley C.B., Katsaras J, Cheng X., Rheinstädter M.C.* Lipid Rafts: Buffers of Cell Membrane Physical Properties // *J. Phys Chem*. 2019. V. 123. P. 2050. <https://doi.org/10.1021/acs.jpch.8b12126>
89. *Berridge M.J.* Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers // *Biochem. J.* 1984. V. 220. P. 345.
90. *Schumaker K.S., Sze H.* Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 3944.
91. *De Castro L.F.P., Dopson M., Friedman R.* Biological Membranes in Extreme Conditions: Anionic Tetraether Lipid Membranes and Their Interactions with Sodium and Potassium // *J. Phys Chem*. 2016. V. 120. P. 10628. <https://doi.org/10.1021/acs.jpch.6b06296>
92. *Леву А., Сикевиц Ф.* Структура и функции клетки. Москва: Мир, 1971. 583 с.
93. *Resh M.D.* Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins // *Nature Chemical Biology*. 2006. V. 2. P. 584. <https://doi.org/10.1038/nchembio834>
94. *Kinoshita T., Fujita M.* Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling // *J. Lipid Res.* 2016. V. 57. P. 6. <https://doi.org/10.1194/jlr.R063313>
95. *Cassey P.J., Seabre M.C.* Protein prenyltransferases // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 5289. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5282>
96. *Novelli G., D'Apice M.R.* Protein farnesylation and disease // *J. Inherited Metabolic Disease*. 2012. V. 35. P. 917. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9445-y>
97. *Lane K.T., Beese L.S.* Thematic revive series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type 1 // *J. Lipid Res.* 2006. V. 47. P. 681. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600002-JLR200>
98. *Murata N., Los D.A.* Membrane fluidity and temperature perception // *Plant Physiol*. 1997. V. 115. P. 875.
99. *Кутюрин В.М., Шутилова Н.И.* Электронно-донорные свойства пигмент-белково-липидного комплекса хлоропластов // *Биохимия*. 1974. Т. 39. С. 102.
100. *Янопольская Н.Д., Деборин Г.А.* Исследование транслокации рибонуклеазы через мембраны липосом различного липидного состава // *Биохимия*. 1988. Т. 53. С. 781.