

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 68, номер 3, 2021

---

---

## ОБЗОРЫ

Перспективные биотехнологии: коллекции культур клеток высших растений как основа разработки и производства лекарственных препаратов

*Е. В. Попова, А. В. Носов, М. В. Титова, Д. В. Кочкин,  
А. А. Фоменков, И. Е. Куличенко, А. М. Носов*

227

Наночастицы золота в физиологии растений: основные эффекты и перспективы использования

*Ю. В. Венжик, И. Е. Мошков, Л. А. Дыкман*

245

---

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Выбор референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР в реальном времени у двух форм березы повислой

*Ю. Л. Мощенская, Н. А. Галибина, Т. В. Тарелкина, К. М. Никерова,  
О. В. Чирва, Л. Л. Новицкая*

258

Влияние лактон- и кетонсодержащих brassinosteroidов на фотосинтетическую активность листьев ячменя при старении

*И. С. Ковтун, Н. Е. Кухаренко, В. В. Кузнецов, В. А. Хрипач, М. В. Ефимова*

268

Действие стрессовых фитогормонов на метаболизм стеринов *Triticum aestivum* L.

*А. Г. Ренкова, В. Р. Хабибрахманова, Ю. Н. Валитова,  
Ф. К. Мухитова, Ф. В. Минибаева*

279

Влияние салициловой кислоты на антиоксидантные ферменты и холодоустойчивость растений огурца

*А. А. Игнатенко, В. В. Таланова, Н. С. Репкина, А. Ф. Титов*

289

Способность лактон- и кетонсодержащих brassinosteroidов индуцировать прайминг у растений рапса к солевому стрессу

*Л. В. Коломейчук, Е. Д. Данилова, В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский,  
Вл. В. Кузнецов, М. В. Ефимова*

297

Водный потенциал апопласта подустьичной полости листа *Suaeda altissima* (L.) Pall. при солевом стрессе

*П. Ю. Воронин, Н. А. Мясоедов, Л. А. Халилова, Ю. В. Балнокин*

308

Сезонные изменения содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в зоне влияния теплового поля газового факела

*С. А. Шавнин, И. А. Юсупов, Н. В. Марина, А. А. Монтиле, Д. Ю. Голиков*

315

Ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток *Phlojodicarpus sibiricus*

*М. Т. Ханды, Д. В. Кочкин, С. В. Томилова, А. Г. Ключин, Б. А. Галишев, А. М. Носов*

326

---

---



УДК 581.1

Посвящается 100-летию со дня рождения чл.-корр. РАН Раисы Георгиевны Бутенко, основателю направления “культуры изолированных клеток и тканей высших растений” в России

## ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ: КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ КАК ОСНОВА РАЗРАБОТКИ И ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2021 г. Е. В. Попова<sup>а, \*</sup>, А. В. Носов<sup>а</sup>, М. В. Титова<sup>а</sup>, Д. В. Кочкин<sup>а, b</sup>,  
А. А. Фоменков<sup>а</sup>, И. Е. Куличенко<sup>а</sup>, А. М. Носов<sup>а, b</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: elena\_aygol@hotmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

В обзоре рассматриваются принципы становления и формирования коллекций культур клеток и тканей высших растений *in vitro* как варианта генетических коллекций, анализируются современное состояние и перспективные возможности использования коллекций в исследованиях особенностей и закономерностей синтеза биологически активных веществ высших растений, рассматривается важная роль коллекций в биотехнологических производствах субстанций для лекарственных препаратов, обсуждаются методы поддержания и сохранения стабильности культур клеток в процессе длительного культивирования. Особое внимание уделяется ретроспективному и современному состоянию Всероссийской коллекции культур клеток высших растений, основателем которой была член-корреспондент РАН Р.Г. Бутенко.

**Ключевые слова:** биобанкирование, биологически активные вещества, биотехнология, вторичный метаболизм, генетические коллекции, криосохранение, культуры клеток

DOI: 10.31857/S0015330321030167

### ВВЕДЕНИЕ

#### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОЛЛЕКЦИИ И ИХ РОЛЬ В СОХРАНЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

В современном мире остро стоит проблема сохранения генетических ресурсов. Подходы к ее решению разрабатываются как на уровне отдельных отраслей (сельское хозяйство, биотехнология, экология, лесное хозяйство), так и в национальном и в мировом масштабах. Сохранение генетического разнообразия семян и культивируемых растений, в том числе “посредством содержания разнообразных (их) банков на национальном, региональном и международном уровнях, и расширение доступа к ним”, является одной из основных задач Цели 2 “Ликвидация голода” — одной из 17 целей устойчивого развития ООН. Во всем мире активно развиваются коллекции *ex situ*: генетические банки и ботанические сады, где в созданных че-

ловеком условиях сохраняются ценные генотипы культурных растений, их дикорастущих сороридей, а также редких и исчезающих природных видов. В 2010 г. по данным ФАО в мире насчитывалось 1750 генетических банков, в которых сохранялось 7.4 млн образцов только сельскохозяйственных культур [1]. Более 90% таких коллекций составляют ортодоксальные семена, чья долговечность (longevity) предсказуемо увеличивается с понижением температуры и влажности [2]. Международные стандарты сохранения семян (7% влажности,  $-18^{\circ}\text{C}$ ) легко достижимы практически в любой точке мира. Классическим примером является международное хранилище в Свальбарде (Норвегия), где в условиях вечной мерзлоты хранится более миллиона дубликатов образцов семян сельскохозяйственных культур [3]. Однако для целого ряда культурных и дикорастущих видов использование семенных банков для сохранения генетических ресурсов невозможно или нецелесообразно

но. К ним относятся растения, которые в ходе одомашнивания потеряли способность производить семена, а также культурные сорта, чьи уникальные характеристики передаются только путем вегетативного размножения [4]. Для семян многих редких и исчезающих видов характерна низкая всхожесть даже при оптимальных условиях [5]. К “проблемным” также можно отнести виды, семена которых быстро теряют всхожесть при температурах, рекомендованных ФАО для длительного хранения или не выносят дегидратацию. Это большинство тропических и субтропических видов, многие древесные виды и виды, производящие семена с высоким содержанием липидов [6]. Такие виды обычно поддерживаются в виде растений на полях или в ботанических садах, а также в коллекциях *in vitro* (в стерильных контролируемых условиях на искусственных питательных средах) и в криобанках в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) или его парах [2, 4, 5, 7]. Однако, несмотря на значительные успехи в разработке и оптимизации технологий *in vitro* и криосохранения, масштабное применение этих методов для сохранения генофонда вегетативно размножаемых растений до сих пор ограничено. Согласно анализу 2017 г. [8], 66% вегетативно размножаемых сельскохозяйственных культур все еще сохраняется в полевых коллекциях, 46% *in vitro* и только 16% в криобанках. При этом только для восьми культур число образцов в криобанках превышает 100. Из зарегистрированных в онлайн-системе BGCI 3679 ботанических садов и институтов, 466 содержат банки семян, и только 172 имеют функционирующие лаборатории для размножения и сохранения растений *in vitro*, а криосохранением занимаются лишь единичные группы [9]. Особую озабоченность вызывает отсутствие надежного длительного хранения для дубликатов образцов вегетативно размножаемых культур, аналогичного хранилищу в Свальбарде [8]. Таким образом, в настоящий момент многие вегетативно размножаемые культурные сорта, а также редкие и исчезающие виды с неортодоксальными семенами находятся в группе повышенного риска, учитывая высокую стоимость поддержания полевых коллекций (до \$200 за образец в год) с одной стороны, а также риски безвозвратной потери уникального генетического материала, не продублированного в условиях *in vitro* или криосохранения, из-за природных катаклизмов, болезней и вредителей, да и просто человеческой ошибки — с другой [8, 10].

Особую группу генетических банков составляют коллекции культур изолированных клеток и органов растений, такие как коллекции эмбрионных культур, адвентивных и трансформированных (“бородатых”, или “hairly roots”) корней и культур недифференцированных клеток. Эти коллекции исторически создавались не только для сохранения растительного биоразнообразия, но прежде всего —

как депозитарии потенциально ценных линий для биотехнологических производств и фармакологии, о чем будет сказано ниже. Очевидно, что такие культуры были созданы и существуют только в условиях *in vitro*, и для их поддержания целесообразно использовать только коллекции *in vitro* и криосохранение, то есть те же методы, которые применяются и для вегетативно размножаемых растений [4, 6, 8, 11, 12]. В данном обзоре, посвященном прежде всего коллекциям культур клеток высших растений, рассматривается связь между двумя самостоятельными концепциями — (1) концепцией биобанкирования и генетических коллекций, с одной стороны, и (2) концепцией Hi-Tech биотехнологий на основе культуры клеток, с другой. На основе российского и мирового опыта рассматриваются принципы формирования коллекций культур клеток, их история и современное состояние, а также использование культур клеток в биотехнологических производствах. Особое внимание уделяется роли Р.Г. Бутенко как основателя данного направления в России и созданной ею Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР).

#### КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ – РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ И ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ

Ключевое понятие предлагаемого обзора — культура клеток высших растений, которая представляет собой пул соматических клеток, выращиваемых *in vitro* на искусственной питательной среде в стерильных контролируемых условиях. Традиционно единицей формирования коллекции считается клеточный штамм (линия), то есть популяция клеток, обладающая уникальными только для нее ростовыми, биосинтетическими, цитогенетическими и молекулярно-генетическими характеристиками. История зарождения и развития культуры клеток растений и тесно связанная с ней история биотехнологии растений детально изложены в ряде публикаций [13–15] и не являются предметом рассмотрения данного обзора. Однако для понимания принципов формирования коллекций культур клеток растений необходима рекапитуляция важнейших моментов становления метода.

В основе культуры клеток лежит идея тотипотентности — возможности хранения в клетках “памяти” о функциональном потенциале всего организма — сформировавшаяся как результат коллективных наблюдений, исследований и прогнозов микроскопистов, ботаников и анатомов конца XVIII — начала XIX века. Отправной точкой для экспериментов по культивированию клеток животных и растений *in vitro* стали эксперименты Vöchting, показавшие, что мельчайшие фрагменты стеблевых черенков или таллома некоторых видов

способны к регенерации [16, 17]. Придя к выводу о тотипотентности клеток, Vöchting предложил исследовать это свойство: выращивать клетки изолированно на искусственной питательной среде, чтобы оградить их от влияния соседних клеток. Однако основателем культуры клеток растений *in vitro* как отдельного научного направления справедливо считается немецкий ботаник Haberlandt, который первым попытался получить экспериментальные доказательства тотипотентности путем культивирования растительных клеток в питательных растворах в надежде на регенерацию целых растений [18]. Дифференцированные палисадные клетки яснотки, клетки железистых волосков медуницы и крапивы, клетки волосков тычиночных нитей традесканции и другие виды клеток растений увеличивались в размерах, но не делились и, в конце концов, культуры были потеряны из-за инфекции.

Начало системных работ по культурам клеток и тканей во многом было связано с открытием фитогормонов. Gautheret [19] (рис. 1в) и Nobecourt [20] во Франции и White [21] в США независимо получили первые культуры растительных тканей на полностью синтетических средах на основе раствора Кнопа с добавлением глюкозы или сахарозы, тиамин, глицина и недавно открытого фитогормона — индолилуксусной кислоты. Получение Miller и Skoog кинетина [22], важнейшего синтетического цитокинина и компонента большинства современных питательных сред, позволило значительно расширить видовой и тканевой спектры эксплантов растений для культивирования *in vitro*. В конце 50-х годов XX века, согласно классической монографии Готре [23], список культур клеток и тканей растений включал уже 142 вида. В 1957 г. директор Института физиологии растений АН СССР (ныне ИФР РАН) академик А.Л. Курсанов после посещения лаборатории, руководимой Готре, предложил Р.Г. Бутенко развивать это направление в ИФР РАН. В конце 50-х — середине 60-х годов Р.Г. Бутенко с немногочисленными сотрудниками получила каллусные культуры из разных тканей более десятка видов растений. Интересуясь лекарственными растениями и, возможно, наблюдая за относительно быстрым ростом культивируемых клеток и его независимостью от внешних природных условий, Р.Г. Бутенко приступила к получению культуры клеток медленно растущих ценных лекарственных растений, таких как женьшень настоящий, а также растений, не встречающихся во флоре СССР. Впервые в мире были получены культуры клеток *Panax ginseng* (рис. 1г), других представителей рода *Panax spp.*, *Rauwolfia serpentina*, *Dichroa febrifuga*, *Catharanthus roseus* и др. [24–28]. В 1965 году при Группе культуры тканей и морфогенеза ИФР РАН была создана Коллекция культур клеток и тканей растений. В 1978 году [29], значительно расширив свои фонды, Всероссийская коллекция

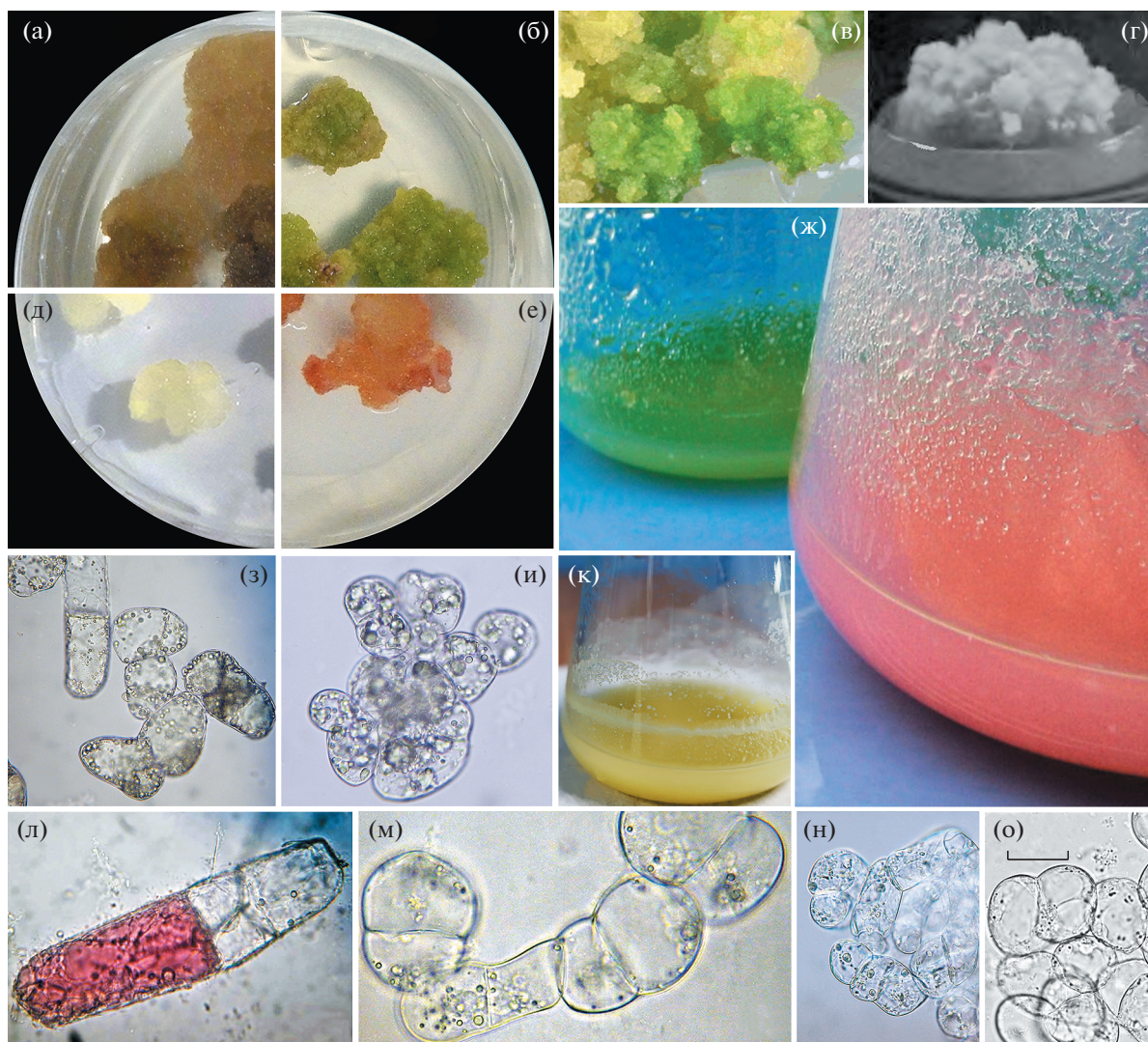
культур клеток высших растений (ВККК ВР) вошла в состав Российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений (РККК).

В период перехода от этапа проверки концепции культуры клеток и тканей растений к ее становлению как важного и полезного инструмента для исследований и манипуляций с растениями и их клетками у исследователей всего мира формировались локальные рабочие коллекции линий и штаммов клеток. С одной стороны, видовой состав этих коллекций определялся конкретными задачами фитопатологии и физиологии растений [23, 24, 26, 30], с другой стороны, был осознанный выбор растений, связанный с их химическим составом, представляющих интерес для фармацевтики и других отраслей промышленности [25, 31]. С 60-х и вплоть до начала 80-х годов XX века число публикаций с упоминанием культур клеток растений постоянно росло и, безусловно, в пополнении списка тон задавали школы Р. Готре, Ф. Уайта, А. Хильдебрандта, Ф. Скуга, Х. Стрита, О. Гамборга, и, конечно, Р. Бутенко. Так формировались коллекции культур клеток и тканей растений *in vitro*, ставшие важным инструментом как для фундаментальных исследований, так и для практического использования.

## КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ – СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

До середины 60-х годов XX века коллекции формировались в научных лабораториях в университетах и научных институтах, и исследователи, работавшие с культурами клеток, могли свободно получить тот или иной штамм культивируемых клеток для научных целей. К сожалению, важной современной особенностью состояния коллекций штаммов культур клеток высших растений является практически полное отсутствие информации о них в открытых источниках. В частности, в списке членов Европейской Ассоциации коллекций культур (ECCO) (<https://www.eccosite.org/members/>) на данный момент значатся всего две национальные коллекции культур клеток растений — немецкая (<http://www.dsmz.de>) и финская (<http://culturecollection.vtt.fi/>). Функционирует японская коллекция культур клеток растений (<https://epd.brc.riken.jp/en/pcellc>). Более детальная информация о коллекциях культур клеток высших растений представлена в табл. 1.

Сложившаяся ситуация объясняется, по-видимому, несколькими причинами. Поддержание пересадочных коллекций культур клеток растений — процесс трудоемкий и дорогой. Вероятно, это стало одной из причин существенного сокращения числа активно поддерживаемых коллекций культур клеток высших растений в настоящее время по сравнению с 70–80 гг. прошлого века, а среди оставшихся преобладают коллекции, имеющие



**Рис. 1.** Каллусные и суспензионные культуры клеток высших растений: (а) каллусная культура *Cladocheta candidissima*\*; (б) световая каллусная культура *Sutherlandia frutescens*\*; (в) каллусная культура, полученная из корнеплода *Daucus carota* R. Gautheret в 1937 г. и более 63 лет поддерживаемая в пересадочной культуре; источник – Le Conservatoire botanique national du Bassin parisien (<http://cbnbp.mnhn.fr/cbnbp/actualites/evenement.jsp>), фотография Bernard Faye; (г) культура ткани корня *Mandragora turcomanica*\*; (е) каллусная культура *Pancretium maritimum*\*; (ж) суспензионная миксотрофная культура *Arabidopsis thaliana*\*\* (задний план) и суспензионная световая культура *Euonymus maximowiczianus*\* (передний план); (з) клетки суспензионной культуры *Taxus baccata*\*\*; (и) клетки суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea*\*\*; (к) суспензионная гетеротрофная культура *Arabidopsis thaliana*\*\*; (л) клетки суспензионной световой культуры *Euonymus maximowiczianus*\*; (м) клетки суспензионной культуры *Panax japonicus*\*\*; (н) клетки гетеротрофной суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*\*\*; (о) клетки суспензионной культуры *Ajuga turkestanica*\*. Масштабная линейка (50 мкм) приведена на (о) и одинакова для всех фотографий клеток. \* – штаммы Отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН, не депонированные в ВККК ВР; \*\* – штаммы Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР).

государственную финансовую поддержку. Обширные коллекции культур клеток поддерживаются также некоторыми биотехнологическими и биофармацевтическими компаниями, о чем говорят их рекламные материалы, однако подробной информации о составе таких коллекций в открытом доступе найти не удалось.

Среди мировых коллекций ВККК ВР (далее Коллекция) выделяется как по разнообразию, так

и по возрасту сохраняемых образцов. В настоящий момент в Коллекции поддерживаются в активном состоянии 47 линий культур клеток 29 видов высших растений, из них 19 линий поддерживаются в виде каллусных культур и 32 линии в виде суспензионных культур (некоторые культуры дублированы в каллусах и суспензиях). Поддерживаемые культуры клеток включают как модельные штаммы, которые служат объектами для фундаментальных

**Таблица 1.** Информация о некоторых мировых коллекциях культивируемых клеток растений

Страна, название, принадлежность коллекции	Число таксонов, число линий/штаммов культур клеток растений	Комментарии	Ссылка
Германия, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, частная с правительственным наблюдательным советом	более 80 семейств; более 700 линий культур клеток растений на 2019 г.	в апреле 2019 г. в каталоге значилась 41 линия клеток растений [36]	<a href="https://www.dsmz.de/">https://www.dsmz.de/</a>
Финляндия, VTT Culture Collection, полугосударственная	23 вида растений; 25 калусных культур, 22 суспензионные культуры, 12 линий бородачатых корней	для каждого штамма приведена основная информация	<a href="http://culturecollection.vtt.fi/">http://culturecollection.vtt.fi/</a>
США, Massachusets, Plant Cell Culture Library UMass Amherst, университет	более 1000 видов растений; все образцы заявлены как калусные культуры клеток	для каждого штамма приведена основная информация	<a href="https://www.umass.edu/ials/pccl-database">https://www.umass.edu/ials/pccl-database</a>
Япония, RIKEN BRC Plant Cultured Cell Resources, полугосударственная	32 вида растений; 38 калусных культур, 22 суспензионные культуры	на каждый штамм имеется очень подробный паспорт и дополнительная документация	<a href="https://epd.brc.riken.jp/en/pcellc">https://epd.brc.riken.jp/en/pcellc</a>
Украина, Банк клеточных культур <i>in vitro</i> Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, полугосударственная	более 2000 линий культур клеток растений	—	<a href="http://germplasm.icbge.org.ua/en/">http://germplasm.icbge.org.ua/en/</a>
Венгрия, Tissue culture collection Department of Botany University of Debrecen, университет	26 видов растений; 28 калусных культур	информация из публикации	<a href="http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2784">http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2784</a> [37]
Чехия, Collection of <i>in vitro</i> plant cell cultures, Institute of Experimental Botany of CAS, институт	более 20 видов растений; 500 отобранных штаммов или клонов	—	<a href="http://lpb.ueb.cas.cz/About.html">http://lpb.ueb.cas.cz/About.html</a>

исследований по физиологии растений, так и штаммы-продуценты биологически активных соединений (гинзенозидов и других тритерпеновых гликозидов, стероидных гликозидов фураностанолового ряда, фенольных соединений и некоторых других), а также штаммы редких и эндемичных видов растений. Среди них штаммы-сверхпродуценты диоскореи дельтовидной (содержание фураностаноловых гликозидов до 12% к сухой биомассе кле-

ток), различных видов аралиевых (продуцентов тритерпеновых гликозидов), нескольких видов тиса (продуцентов противоопухолевых таксоидов) и других (табл. 2). Некоторые штаммы, например *Beta vulgaris*, *Dioscorea deltoidea*, *Mandragora turcomanica*, *Medicago sativa* поддерживаются методом пересадок в активной коллекции с 70-80-х гг. XX века. Наиболее представленными семействами на данный момент являются *Araliaceae* (8 линий),

**Таблица 2.** Некоторые штаммы, поддерживаемые в состоянии активного роста методом пересадок во Всероссийской Коллекции Культур Клеток Высших Растений ИФР РАН

Видовое название	Традиционное название	Число линий	Происхождение	Год получения	Тип культуры	Назначение
<b>Модельные культуры</b>						
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	Резуховидка Таля	2	Листья	2006, 2009	Суспензия	Модельный объект
<i>Beta vulgaris</i> L.	Свекла обыкновенная	1	Корень	1972	Суспензия	Модельный объект
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Табак обыкновенный	2	Стеблевая паренхима		Суспензия	Модельный объект
<i>Triticum timopheevii</i> Zhuk.	Пшеница Тимофеева	1	Зародыш	1986	Суспензия	Модельный объект
<b>Культуры-продуценты</b>						
<i>Dioscorea deltoidea</i> Wall.	Диоскорея дельтовидная	3	Культура клеток	1972	Суспензия, каллус	Продуцент стероидных гликозидов фурастанолового ряда
<i>Medicago sativa</i> L.	Люцерна посевная	1	Лист	1985	Суспензия	Продуцент пероксидазы
<i>Rapax ginseng</i> C.A. Mey.	Женьшень настоящий	3	Корень	1977–2001	Суспензия, каллус	Продуцент гинзенозидов
<i>Rapax japonicus</i> C.A. Mey. var. <i>terrens</i>	Женьшень ползучий	2	Корень	1995–1997	Суспензия	Продуцент гинзенозидов
<i>Rapax vietnamensis</i> Ha et Grushv.	Женьшень вьетнамский	1	Корень	2014	Суспензия	Продуцент гинзенозидов
<i>Polyscias filicifolia</i> Bailey	Полисиас папортничколистный	2	Лист	1991	Суспензия, каллус	Пищевая добавка с выраженным тонизирующим и антигипертензивным действием
<i>Polyscias frutescens</i> (L.) Harms.	Полисиас кустарниковый	1	Лист	2005	Суспензия, каллус	Продуцент тритерпеновых гликозидов
<i>Stephania glabra</i> (Roxb.) Miers	Стефания гладкая	2	Культура клеток	2004	Суспензия, каллус	Продуцент стефарина
<i>Taxus baccata</i> L.	Тис ягодный	3	Стебель, лист		Каллус	Продуцент таксоидов
<i>Taxus x media</i>	Тис средний	1	Стебель, лист		Каллус	Продуцент таксоидов
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	Тис гималайский	1	Культура клеток	2016	Суспензия	Продуцент таксоидов
<i>Tribulus terrestris</i> L.	Якорцы стелющиеся	1	Семена	2014	Суспензия	Продуцент стероидных гликозидов

Примечание: полный каталог культур представлен на странице Коллекции на сайте ИФР РАН ([https://ippras.ru/institut/nauchnye\\_podrazdeleniya/vserossiyskaya-kollektsiya-rastitelnykh-kletok-i-organov-vysshihkh-rasteniy/](https://ippras.ru/institut/nauchnye_podrazdeleniya/vserossiyskaya-kollektsiya-rastitelnykh-kletok-i-organov-vysshihkh-rasteniy/))



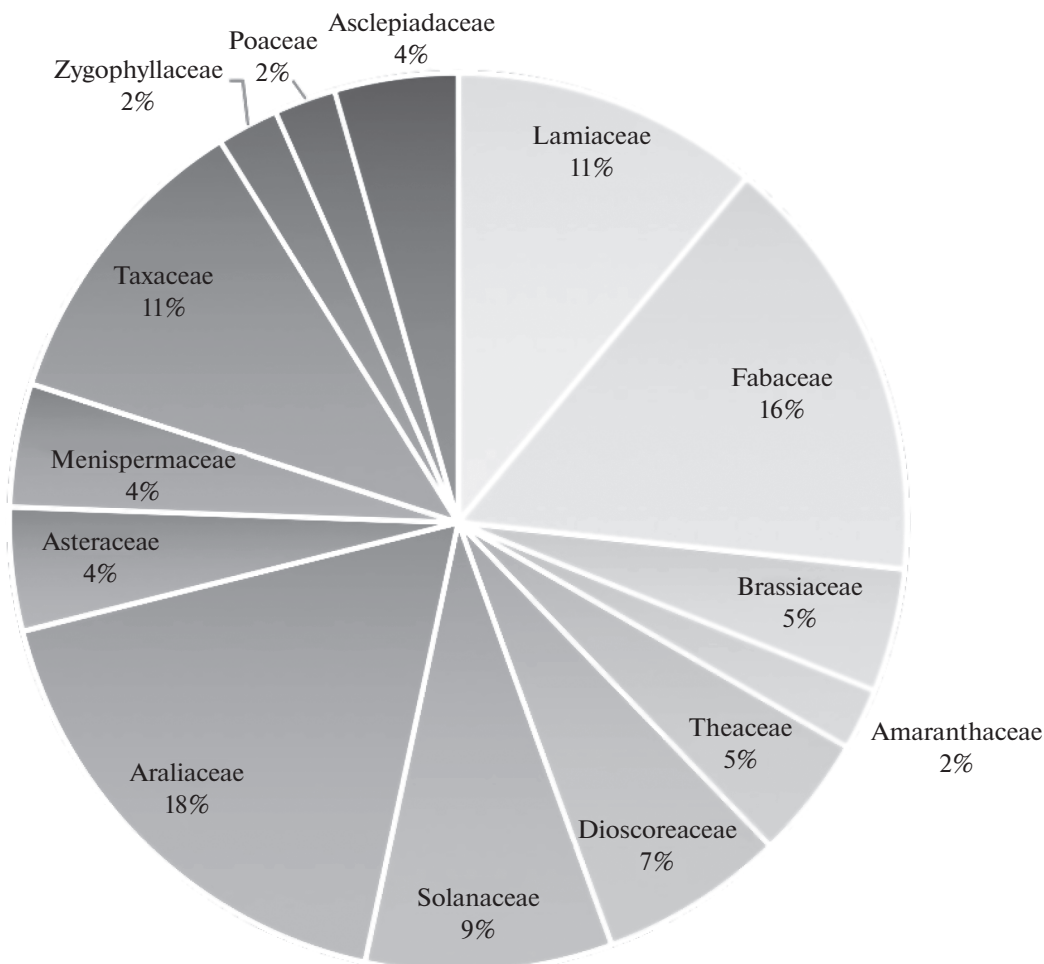


Рис. 2. Семейства высших растений, представленные в ВККК ВР.

*Fabaceae* (7 линий), *Lamiaceae* (5 линий) и *Taxaceae* (5 линий) (рис. 2). Наличие в Коллекции различных видов растений одного и того же семейства, а также линий одного вида, полученных из одного экспланта, но культивируемых долгое время на средах с различным минеральным и фитогормональным составом позволяет проводить уникальные исследования по влиянию условий культивирования на рост культур, качественный и количественный состав вторичных соединений в них, а также исследовать внутри- и межвидовые закономерности биосинтеза в культуре изолированных клеток по сравнению с целым растением [32–35]. Ведется работа по пополнению Коллекции новыми культурами. Только в 2019 г. были получены 16 новых линий культур клеток 9 видов высших растений, являющихся эндемиками, редкими или лекарственными, в том числе, это культуры видов *Dioscorea bulbifera*, *Polyscias filicifolia*, *Rubus arcticus*, *Rubus chamaemorus*, *Sutherlandia frutescens*, *Cladochaeta candidissima*, *Thuja occidentalis*, *Olea europaea*, *Alhagi persarum*, *Alcea kusjariensis*. Совмест-

но с научными группами других институтов проводится скрининг коллекционных культур на биологическую активность, для ряда штаммов-продуцентов биологически активных веществ (БАВ) ведутся исследования по токсикологии, что является следующим шагом к их применению в биотехнологии.

Работы ВККК ВР и опыт других коллекций [36, 37], позволяют говорить о том, что коллекции культур клеток, несмотря на свою немногочисленность, — это не “музеи”, а живые, активно функционирующие системы, где не только сохраняются ценные генетические образцы, но и ведутся научные исследования по их изучению, активный обмен и сбор нового материала. Эти особенности, наряду с используемыми методами сохранения, такими как *in vitro* и криосохранение, позволяют рассматривать коллекции культур клеток как равноправную часть большой международной сети по сохранению, изучению и обмену генетическими ресурсами растений. Однако у коллекций культур клеток есть и уникальная осо-

бенность — наряду с важной функцией сохранения генетического материала, они являются первым звеном в многостадийной цепочке получения возобновляемого сырья лекарственных растений и продуктов на его основе, в том числе различных препаратов, содержащих БАВ.

### КУЛЬТУРА КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ КАК ОСНОВА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Культуры *in vitro* представляют собой “удобную” систему для изучения различных процессов в клетках растений. В рамках данной методологии имеется потенциальная возможность строго контролировать условия выращивания клеток, что позволяет ограничивать число факторов, влияющих на изучаемый процесс. Классическим примером может служить культура клеток табака ВУ-2 — одна из самых популярных моделей в биологии клетки растений, благодаря ее быстрой пролиферации, гомогенному клеточному фенотипу и наличию эффективных протоколов синхронизации [38]. Эта культура популярна в исследованиях регуляции клеточного цикла, запрограммированной гибели клеток, в изучении стресс-реакций и т. п. [39]. Не меньшую роль в экспериментальной биологии клетки играют разные линии культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana*, чей геном полностью секвенирован [40, 41].

Однако традиционно наиболее важной “функциональной” частью коллекций культур клеток высших растений являются штаммы продуцентов БАВ [25]. Как правило, БАВ растительного происхождения являются продуктами вторичного метаболизма и играют важнейшую роль в современной медицине [42]. В большинстве обзоров, посвященных данной теме, повторяются сходные утверждения, характеризующие преимущества культуры клеток в качестве альтернативного способа получения БАВ [43–46]. Мы не будем нарушать традицию и приведем наиболее значимые преимущества:

1. Потенциальная возможность широкого выбора исходных растений независимо от наличия и доступности ареалов их обитания в конкретной стране, охранного статуса или угрозы исчезновения данных видов;

2. Экологическая чистота производства биомассы в строго контролируемых условиях, гарантирующих безопасность препаратов;

3. При условии оптимизации условий поддержания/выращивания и ростовых/биосинтетических характеристик конкретных линий/штаммов культур клеток возможно гарантированное получение биомассы с заданными характеристиками,

независимо от сезона, климатических и погодных условий;

4. Высокая производительность и более сжатые сроки получения биомассы и/или целевых БАВ по сравнению с интактными растениями; при этом в ряде случаев, например для женьшеня настоящего, речь может идти о сокращении срока культивирования с нескольких лет до нескольких месяцев;

5. Использование штаммов-сверхпродуцентов, позволяющее в некоторых случаях решить проблему низкого содержания БАВ в природном растительном сырье;

6. Потенциальная возможность масштабирования производства биомассы клеток растений с определенными свойствами.

Столь очевидные преимущества должны были бы привести к повсеместному использованию культур клеток высших растений для промышленного производства БАВ, однако этого не произошло. В публикациях начала 1980-х — конца 1990-х годов упоминается целый ряд пилотных производств на основе культур клеток высших растений, запущенных в Японии, США, Германии и других странах. Это, например, производство розмариновой кислоты из культуры клеток *Coleus blumei* [47], антоцианов на основе клеток *Aralia cordata* [48], биомассы клеток *Catharanthus roseus* [49], паклитаксела из *Taxus spp.* [50], берберина из клеток *Coptis japonica* [51], производных шиконины из *Lithospermum erythrorhizon* var. *erythrorhizon* [52] и некоторые другие [53]. Среди наиболее масштабных проектов можно выделить выращивание *Nicotiana tabacum* в биореакторах объемом 20000 л для производства биомассы и никотина [54], *Rauwolfia serpentina* (75000 л) для получения индольных алкалоидов [55] и биомассы клеток *Panax ginseng* в биореакторах объемом 20000–25000 л [56]. Однако анализ современного состояния отрасли показал, что большинство этих проектов были закрыты по разным причинам, среди которых упоминается нерентабельность, а компании либо перестали существовать, либо переключились на другие продукты [57]. К настоящему времени известны лишь единичные примеры действующих производств БАВ на основе культур клеток высших растений. Это, например, компания Phytocatalytic с производственными мощностями в Германии и Канаде, производящая паклитаксел (растительный дитерпеноид, обладающий выраженной противоопухолевой активностью) на основе клеток *Taxus spp.* (<https://phytonbiotech.com>). Южнокорейская компания Samyang Biopharmaceuticals Corp. также является производителем паклитаксела из культуры клеток тиса [58], препарат уже прошел клинические испытания [59]. Культура клеток лекарственного растения *Polyscias filicifolia* является основным компонентом ряда россий-

ских препаратов с подтвержденным общеукрепляющим и антирадикальным действием (<https://www.vitagmal.ru/>).

Более широкое применение клеточные биотехнологии получили в современной косметологии и для производства пищевых добавок: согласно анализу [60], за последние 10 лет более 12 европейских и американских компаний представили на этих рынках продукцию, полученную из культур клеток высших растений. Это согласуется с современными тенденциями к здоровому питанию, с одной стороны, и, с другой стороны, — с возросшим интересом к новым источникам питания, произведенным высокотехнологичным способом с использованием экологических технологий, отвечающих критериям устойчивого развития [61, 62]. В косметологии, как и следовало ожидать, наибольшей популярностью пользуются лекарственные растения, такие как *Rhodiola rosea*, *Aloe barbadensis*, *Ajuga reptans*, *Echinacea spp.*, *Calendula spp.* и другие [60]. Однако все чаще используются культуры клеток сельскохозяйственных и декоративных растений и видов, ранее считавшихся исключительно модельными объектами: *Nicotiana sylvestris*, *Malus domestica*, *Rubus idaeus*, *Vitis vinifera*, *Daucus carota*, *Oryza sativa*, *Coffea bengalensis*, *Syringa vulgaris*, *Rhododendron hirsutum*, *Camellia sinensis*. Показано, что экстракты культур клеток и/или различные препараты на основе их биомассы ряда видов влияют на экспрессию генов, отвечающих за синтез коллагена, обладают противовоспалительной, антиоксидантной и УФ-протекторной активностью, активируют процессы регенерации кожных покровов [63]. Отмечается, что высокий потенциал для промышленного использования имеют культуры с высоким содержанием полифенольных соединений [64]; некоторые авторы [65] связывают возросший интерес к культурам клеток именно с косметической индустрией.

Причиной сложившейся ситуации является, по-видимому, целый ряд факторов. Во-первых, это высокая стоимость биотехнологических производств. Во-вторых, для вывода любого нового лекарственного препарата на фармацевтический рынок необходимы многолетние и дорогие клинические испытания [62], осуществить которые под силу далеко не каждой биотехнологической компании. Однако самым существенным фактором можно назвать низкую продуктивность культур клеток по целевым вторичным соединениям по сравнению с исходным растением. Используя традиционные методы — селекцию продуктивных штаммов, оптимизацию сред, элиситацию, добавление химических предшественников синтеза [45, 66], можно повысить продуктивность культур клеток растений на один-два порядка. Безусловно, свою лепту в решение проблемы внесут подходы метаболической инженерии [67], поскольку генно-инженерная настройка экспрессии генов,

определяющих синтез целевого продукта, может существенно изменить биосинтетические способности клеток *in vitro*. Однако зачастую именно низкое содержание, либо отсутствие целевых соединений является сдерживающим фактором при переходе от получения и первичного скрининга культур клеток к пилотным производствам на их основе и затем к полномасштабной промышленной технологии. Это обусловлено спецификой культуры клеток как биологической системы.

### ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Растения синтезируют сотни тысяч сложных органических соединений — продуктов вторичного метаболизма, среди которых выделяют несколько основных групп: алкалоиды, изопреноиды и фенольные производные [68]. При этом в конкретном растении каждая группа вторичных метаболитов, как правило, представлена в виде сложных смесей соединений, близких по химической структуре, но отличающихся в тонких структурных “нюансах”. К последним можно отнести различные типы изомерии, характер и взаимное расположение заместителей (гидроксильрование, метилирование, метоксилирование, пренилирование и т. д.), образование конъюгатов и их модификация (ацилирование и т. д.) [69]. Так, например, в растениях *Tribulus terrestris* L. (*Zygophyllaceae*) к настоящему времени обнаружено более 100 индивидуальных стероидных гликозидов фураностанолового и спиростанолового ряда [70], а для растений рода *Panax* L. известно более полутора тысяч индивидуальных гинзенозидов (тритерпеновых гликозидов) [71].

Считается, что в культурах клеток высших растений *in vitro* процессы вторичного метаболизма и его регуляции отличаются от таковых в интактных растениях [30]. Это связано с особенностями культуры клеток как уникальной системы, где отсутствуют механизмы организменного контроля, характерные для целого растения, и на первый план выходит процесс “автоселекции” — постоянного отбора клеток по интенсивности роста, скорости пролиферации и адаптивности [68, 69]. Более чем полувековой опыт изучения вторичного метаболизма в культурах растительных клеток позволил предположить, что в таких системах сохраняется и поддерживается прежде всего синтез соединений, способствующих пролиферации клеток. Например, некоторые изопреноиды могут стимулировать рост клеток, а также проявляют антиоксидантную и осмопротекторную активности [72]. Также возможно, что многие вторичные соединения, кроме участия в системе защиты растений, обладают гораздо более широким спектром функций,

**Таблица 3.** Основные факторы, влияющие на синтез и накопление вторичных метаболитов в культивируемых *in vitro* растительных клетках по сравнению с целым растением (по [69] с изменениями)

Факторы, влияющие на синтез и накопление вторичных метаболитов	Культура недифференцированных клеток <i>in vitro</i>	Интактные растения
Дифференциация и пролиферация клеток	Вторичные метаболиты синтезируются в непрерывно растущей культуре недифференцированных клеток	Вторичные метаболиты синтезируются в дифференцированных непролиферирующих клетках
Клеточная ультраструктура	Пластиды редки или рудиментированы, популяция состоит из меристемоподобных и/или паренхимоподобных гетеротрофных клеток	Высокая степень внутриклеточной компартиментации, многочисленные пластиды участвуют в процессах пластид-ассоциированного биосинтеза и хранения вторичных метаболитов
Специализация по типу ткани	Биосинтез и накопление вторичных соединений ограничены либо одиночной клеткой, либо агрегатами из 10–30 клеток, или вторичные соединения выделяются в питательную среду	Биосинтез вторичных метаболитов тканеспецифичен, соединения могут транспортироваться, синтезироваться и храниться в разных органах

чем это было принято считать. Например, стероидные гликозиды диоскореи могут играть роль резерва углеводов, а алкалоиды – принимать участие в азотном обмене [69]. В табл. 3 приведены некоторые факторы, влияющие на синтез вторичных метаболитов в культуре клеток *in vitro* по сравнению с интактным растением. Логично, что качественный и количественный состав вторичных соединений в интактном растении и в полученной из него культуре клеток может существенно отличаться. Например, в растениях, продуцирующих стероидные гликозиды, как правило, присутствуют фураностаноловые и спиростаноловые формы этих соединений, тогда как в культурах клеток *in vitro* стероидные гликозиды накапливаются в основном в фураностаноловой форме [69].

В настоящее время большинство исследований по получению БАВ в культуре клеток высших растений строится по сходному принципу: получение стабильно растущих культур клеток, их скрининг на наличие целевых соединений, направленное увеличение содержания целевого метаболита (или группы метаболитов) с помощью изменения условий культивирования, методов элиситации, стрессовых воздействий, генно-инженерных подходов или мутагенеза [73]. Такая стратегия оказывается успешной, благодаря уникальным свойствам культур клеток: быстрому росту, пластичности (адаптивности) и чувствительности ко внешним воздействиям [30]. Это дает возможность воздействовать на качественный и количественный состав синтезируемых соединений целым арсеналом методов. Показано, например, что изменение состава гормонов в среде выращивания приводит к изменению состава и количественного содержания тритерпеновых гликозидов в культуре

клеток женьшеня настоящего [74, 75] и стероидных гликозидов в культуре клеток *T. terrestris* [76]. В Отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН методом индуцированного мутагенеза из культуры клеток диоскореи дельтовидной было получено несколько мутантных линий, отличающихся как по ростовым характеристикам, так и по содержанию целевых метаболитов – стероидных гликозидов [77] (табл. 4). Причем одна из полученных линий оказалась суперпродукентом с содержанием фураностаноловых гликозидов до 10% от сухого веса, что превышает их содержание в интактном растении [77].

Приведенные выше работы можно считать удачными примерами применения “классической” стратегии, где культура клеток рассматривается с целью получения “мажорных” (основных в количественном отношении) и/или наиболее характерных для конкретного вида растений специализированных метаболитов [73]. Приходится признать, что такие методы получения БАВ не всегда приводят к желаемому результату, то есть высокому содержанию целевых БАВ в биомассе клеток *in vitro*. Это не только сдерживает применение культуры клеток в биотехнологии, как было показано выше, но и приводит к распространению представления об ограниченности специализированного метаболизма в культивируемых *in vitro* клетках по сравнению с интактными растениями [69]. Однако развитие структурной и аналитической фитохимии, в частности использование различных видов хромато-масс-спектрометрии для качественного и количественного анализа вторичных метаболитов в интактных растениях, позволяет надеяться на возможность другого подхода. В наиболее универсальном варианте этот экспериментальный подход основан

**Таблица 4.** Ростовые характеристики и содержание гликозидов в различных линиях культивируемых клеток *Dioscorea deltoidea*, полученных в результате мутагенеза по сравнению с исходным штаммом D-1, данные по [69, 77].

Линия	Удельная скорость роста, сут <sup>-1</sup>	Максимальное накопление биомассы, г/л	Индекс роста	Содержание гликозидов (% сухого веса)	
				фуростаноловые	спиростаноловые
D-1 (исходный)	0.18	11.2	8.4	2.0	0.04
DM-0.5	0.20	11.9	8.4	9.3	0.07
DM-1	0.17	11.7	7.2	3.2	0.06
DM-8	0.16	10.9	6.8	2.1	<0.06

на совместном применении жидкостной хроматографии (высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) или ультраэффективная жидкостная хроматография (UPLC)) и квадрупольной-времяпролетной масс-спектрометрии при ионизации электрораспылением (ESI-Q-TOF-MS) [78]. В качестве примера в одной из пионерских работ этого направления показано, что LC-ESI-Q-TOF-MS позволяет обнаружить и структурно описать в различных образцах видов женьшеня (*Panax spp.*) более 600 тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов) разной структуры [79].

Применение такого подхода для изучения структурного разнообразия вторичных соединений в культурах клеток растений имеет большой потенциал, поскольку позволяет получить более полное представление об их химическом составе, в том числе – о присутствии нехарактерных и/или “минорных” (редко встречающиеся или присутствующие в исчезающе малых количествах) для интактных растений метаболитов, которые также могут обладать биологической активностью. В этом смысле, уже имеющиеся коллекции культур клеток растений представляют прекрасное поле для фитохимических исследований и, по аналогии с коллекциями ценных сельскохозяйственных культур, обладают качеством “потенциальной ценности” (option value), полный потенциал которой может быть проявлен в недалеком будущем. На примере некоторых линий, которые поддерживаются в активно растущем состоянии в ВККК ВР показана эффективность комбинированного использования “классических” (выделение индивидуальных соединений и описание их структуры с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии высокого разрешения) и “новых” (в основном основаны на хромато-масс-спектрометрии) фитохимических приемов при биохимическом описании культур клеток высших растений. Так, впервые было показано, что в клетках *Panax japonicus in vitro* кроме семи так называемых “мажорных” гликозидов женьшеня (гинзенозиды Rg1, Re, Rf, Rb1, Rb2, Rb3, Rd) также образуются малонилированные производные гинзенозидов (например, малонил-Rg1,

-Rb1, -Rb2 и др.) [80, 81] и неполярные (так называемые “редкие” (“rare”)) гинзенозиды (например, гипенозид XVII и гинзенозид F2) [82, 83]. Подробный фитохимический скрининг биомассы культур клеток разных видов тиса позволил выявить некоторые закономерности изменения (по сравнению с интактными растениями) в них вторичного метаболизма. А именно, было показано, что для клеток *Taxus spp.* характерно преимущественное образование 14-гидроксигированных таксоидов [34]. Эта закономерность, вероятно, имеет фундаментальное значение, поскольку полиацилированные 14-гидроксигированные таксоиды были выявлены даже в клетках *Taxus canadensis in vitro* (в интактных растениях этого вида тиса неполярные полиацилированные 14-гидроксигированные таксоиды ранее не были обнаружены) [84]. Таким образом, химический анализ с применением новейших методов исследований открывает новые перспективы для использования культур клеток не только как источника целевых БАВ, но и как продуцентов уникального набора биологически активных компонентов, не характерных для интактных растений.

#### МЕТОДЫ ПОДДЕРЖАНИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ И СТАБИЛЬНОСТЬ КУЛЬТУР КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Для биологических объектов в коллекциях, будь то растения или культуры клеток, ключевым понятием является понятие стабильности. В идеальном варианте, любой запрошенный из коллекции образец должен обладать всеми ключевыми свойствами первичного образца, заложенного на хранение. Однако в случае живых систем, для которых характерны постоянные изменения и адаптация к внешним условиям, стабильность является скорее нежелательным качеством. Неудивительно, что одним из “столпов” биобанкирования всегда являлся поиск и разработка методов хранения, которые позволяли бы достичь баланса между наиболее эффективным и стабильным поддержанием основных свойств образцов, с одной стороны, и сохране-

нием их высокой жизнеспособности, с другой, в течение наиболее длительного периода времени и с минимальными затратами [8]. Этот принцип хорошо согласуется с требованиями биотехнологических производств, где должно быть обеспечено стабильно высокое качество конечного продукта при заданных технологических параметрах [73]. При масштабах многотонных биореакторов, потеря или непредвиденная мутация штамма продуцента, влияющая на его ростовые и биосинтетические свойства, грозит полной или частичной остановкой производства, а значит и серьезными экономическими потерями.

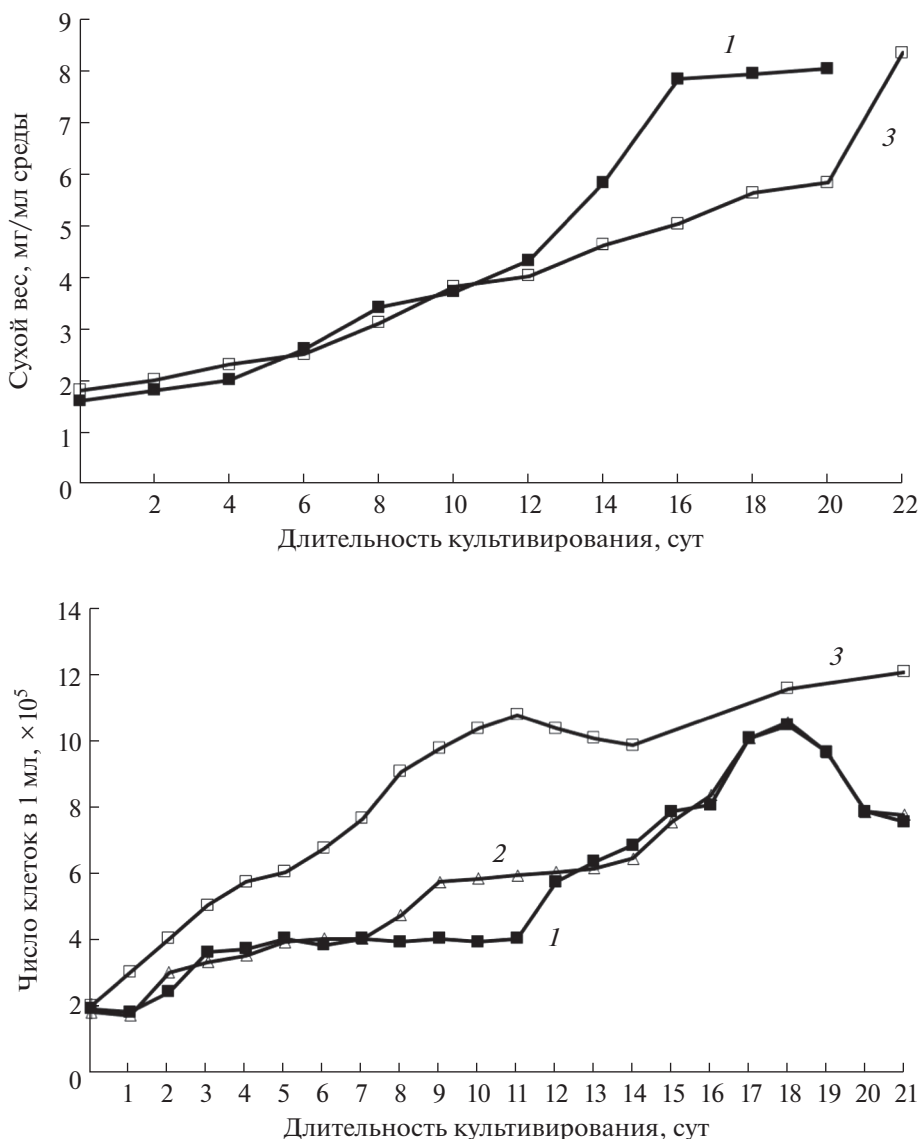
В литературе имеются данные об исследовании влияния процесса культивирования *in vitro* и криосохранения на морфологические, цитологические и генетические характеристики высших растений [8]. Однако для изолированных культур клеток такие сведения достаточно скудны. Считается, что культуры изолированных клеток являются нестабильными и гетерогенными по своей природе. Например, было показано, что культура клеток ВУ-2, полученная из проростков *Nicotiana tabacum* L. "BrightYellow 2" в 1970-х гг. в Японии и являющаяся широко используемым модельным объектом для целого ряда фундаментальных исследований в биологии растений, значительно отличается от клеток исходного растения по числу хромосом и имеет существенные модификации в геноме [85]. Изменения в геномном аппарате и эпигенетические вариации были зафиксированы и для клеточных линий многих других видов [86]. В этом смысле ВККК ВР представляет уникальную платформу для исследований, так как содержит штаммы культур, полученные более 45 лет назад. К сожалению, паспортные данные штаммов, полученных до 1990-х гг. содержат очень лимитированный набор сведений, таких как данные о плоидности и об индексе роста. В данный момент в ВККК ВР ведется работа по актуализации основных параметров поддерживаемых культур как в ходе экспериментальной работы, так и путем сравнения литературных данных. Например, показано, что культура клеток *Panax japonicus*, поддерживаемая методом пересева с циклом субкультивирования 21 сут в течение 15 лет осталась стабильной по основным ростовым параметрам: числу клеток, накоплению сухой биомассы (рис. 3). При этом в культуре сохраняется способность к накоплению достаточно широкого спектра гинзенозидов разных структурных групп [80, 81, 87, 88].

По сравнению с культивированием *in vitro*, криосохранение растительного материала в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) считается более надежным методом, позволяющим поддерживать образцы в состоянии анабиоза без значительных изменений в течение длительного времени. В ряде исследований криосохранение приводится в качестве единственного надежного способа длительного

хранения вегетативно размножаемых культур [6, 8, 12]. Методология криосохранения для культур изолированных клеток приведена в более ранних обзорах [11, 89], поэтому в данной статье будут рассмотрены только примеры криосохранения клеточных культур, используемых для промышленных или полупромышленных производств БАВ. В большинстве исследований для криосохранения культур клеток использовали программное (или медленное) замораживание с предварительным выдерживанием концентрированных суспензий клеток в растворах криопротекторов, представляющих собой комбинации ДМСО, сахарозы, этиленгликоля и глицерина в низких концентрациях (до 20%). Например, Kim с соавт. [90] добились 40% выживаемости и сохранения биосинтеза паклитаксела для культуры клеток *Taxus chinensis* после замораживания в смеси 0.5 М ДМСО и 0.5 М глицерина.

Успешную криоконсервацию культур клеток *Panax ginseng* и *P. quinquefolius* проводили методом как программного, так и прямого замораживания [91–94]. При этом для культур после криосохранения продуктивность по сырой и сухой биомассе увеличивалась по сравнению с контрольной культурой [92], а содержание основных гинзенозидов после криосохранения оставалось неизменным [93, 94]. Содержание диосгенина, ситостерина и стигмастерина в клетках *Dioscorea deltoidea* после предварительного культивирования на среде с аспарагином и аланином и криоконсервации методом программного замораживания также сохранялось на уровне контроля [95].

В более поздних исследованиях была продемонстрирована высокая эффективность современных методов: двухэтапного замораживания, витрификации и инкапсуляции – для криоконсервации культур клеток *Gentiana tibetica* [96], *Catharanthus roseus* [97] и некоторых других [89]. Важные данные были получены в исследованиях Отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН на культуре *Polyscias filicifolia*, восстановленной после замораживания в соломинах [98] и хранения в криобанке в течение пяти лет. Было показано, что при культивировании в колбах и в биореакторах с использованием различных режимов ростовые характеристики (удельная скорость роста, продуктивность) и жизнеспособность восстановленной культуры не отличались от характеристик исходной культуры и той же культуры, поддерживаемой в активной коллекции методом пересадок в течение 5 лет [99]. Что касается длительности хранения, уникальным экспериментом можно считать восстановление культуры *Medicago sativa* после 27 лет хранения в криобанке [100]. Восстановленная культура полностью сохранила свои цитогенетические характеристики и высокую пероксидазную активность. Данная работа считается одним из немногих примеров длительного (более



**Рис. 3.** Сравнение некоторых ростовых характеристик культуры клеток *Panax japonicus* из ВККК ВР, культивируемой в течение 15 лет методом пересева с циклом субкультивирования 21 сут (данные по [87, 88]). 1 – 1998 г, 2 – 2005 г, 3 – 2013 г.

20 лет) хранения растительного материала в криобанке, известным в настоящий момент [8]. Полный список коллекционных культур, сохраняющихся в криобанке ИФР РАН, представлен в табл. 5.

Приведенные выше исследования демонстрируют высокую эффективность криосохранения как надежного метода длительного хранения культур клеток, обеспечивающего полное восстановление их ростовых и биосинтетических характеристик, а также полное восстановление способности к масштабированию в биореакторах разного объема для получения БАВ. Показано также, что по крайней мере некоторые культуры демонстрируют стабильные ростовые характеристики в процессе культивирования *in vitro*. Таким образом, метод пересева может использоваться для поддержания

коллекций средней длительности хранения. Для наиболее перспективных и часто используемых штаммов целесообразно поддержание их в активно растущей коллекции с сохранением дубликатов в криобанке.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллекции культур клеток растений представляют собой уникальный тип генетического банка, материалы которого служат нескольким целям. Наличие штаммов одного вида, выращиваемых в различных условиях на разных средах, позволяет изучать механизмы клеточного роста, а также синтеза и накопления вторичных метаболитов в клеточных культурах по сравнению с интактным растением.

**Таблица 5.** Культуры клеток из ВККК ВР, находящиеся на хранении в криобанке ИФР РАН.

Вид	Число штаммов	Год замораживания
<i>Daucus carota</i>	1	1977
<i>Dioscorea balcanica</i>	1	1995
<i>Dioscorea caucasica</i>	1	1995
<i>Dioscorea deltoidea</i>	4	1984–1998
<i>Medicago sativa</i>	1	1985–1989
<i>Nicotiana sylvestris</i>	1	1984
<i>Panax ginseng</i>	5	1983–1992
<i>Panax japonicus</i>	1	1999
<i>Panax quinquefolius</i>	1	1985–1987
<i>Polyscias filicifolia</i>	1	1998
<i>Rhaponticum carthamoides</i>	3	1992–1999
<i>Solanum tuberosum</i> , cv. <i>Tawa</i>	1	1991
<i>Thalictrum minus</i>	1	1998–1999
<i>Triticum aestivum</i>	1	1994
<i>Triticum timopheevii</i>	1	1994

Очевидно, что коллекции культур клеток растений *in vitro* будут в такой же степени востребованы в фундаментальных исследованиях вторичного метаболизма, в какой они сейчас незаменимы в исследованиях биологии клетки растений. Получение новых культур и изучение содержания в них БАВ, а также получение штаммов-суперпродуцентов и усовершенствование методов химического анализа позволяет надеяться на скорый период “ренессанса” для культур клеток как возобновляемого сырья лекарственных растений и продуктов на его основе, что отвечает современным тенденциям – развитию фитомедицины и здорового образа жизни. Комбинированное использование “классического” анализа индивидуальных соединений и описания их структуры с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии высокого разрешения и биохимического скрининга с помощью хромато-масс-спектрометрии позволит составлять биохимические паспорта культур и, вероятно, откроет новые перспективы для использования коллекционных штаммов культур клеток не только как источника целевых БАВ, но и как продуцентов уникального набора биологически активных компонентов, не характерных для интактных растений. Данные о стабильности ростовых и биосинтетических характеристик культур клеток, поддерживаемых методом пересева в течение длительного времени, а также разработка методов криосохранения позволят выбирать наиболее эффективные методы сохранения культур в коллекциях, что еще больше укрепит их позиции как неотъемлемой части меж-

дународной сети по сохранению, изучению и обмену генетическими ресурсами растений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта “Экспансия” № 19-116-50163.

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. FAO. The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome: FAO, 2010. 399 p.
2. Pritchard H.W. Cryopreservation of desiccation-tolerant seeds // Cryopreservation and freeze-drying protocols / Eds. Day J.G., Stacey G.N. Totowa: Humana Press Inc., 2007. P. 185.
3. Asdal A., Guarino L. The Svalbard Global Seed Vault: 10 Years – 1 Million Samples // Biopreserv. Biobanking. 2018. P. 391. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0025>
4. Benson E.E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Mafla G., Panis B., Panta A., Tay D., Van den Houwe I., Roux N. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops-Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop *in vitro* conservation technologies. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, 2011. 86 p.
5. Pence V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species // Seed Sci. Technol. 1991. V. 19. P. 235.



6. *Reed B.M.* Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security // *In Vitro Cell. Dev. Biol.*: Plant. 2017. V. 53. P. 285.
7. *Pritchard H.W., Nadarajan J., Ballesteros D., Thammasiri K., Prasongsom S., Malik S.K., Chaudhury R., Kim H.-H., Lin L., Li W.-Q., Yang X.-Y., Popova E.* Cryobiotechnology of tropical seeds – scale, scope and hope // *Acta Hort.* 2017. V. 1167. P. 37. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1167.6>
8. *Acker J.P., Adkins S., Alves A., Horna D., Toll J.* Feasibility study for a safety back-up crop preservation facility. Independent expert report: July 2017. Rome: Bioversity International, 2017. 100 p.
9. BGCI (2020) <https://www.bgci.org/resources/bgci-databases/gardensearch/> Cited 20 Aug 2020.
10. *Fu Y.B.* The vulnerability of plant genetic resources conserved ex situ // *Crop Sci.* 2017. V. 57. P. 2314.
11. *Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V., Vysotskaya O.N.* Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // *Int. J. Refrig.* 2006. V. 29. P. 403. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2005.07.011>
12. *Popova E.V., Shukla M., Kim H.H., Saxena P.K.* Plant cryopreservation for biotechnology and breeding // *Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools* / Eds. Al-Khairi J.M., Jain M., Johnson D.V. Springer, 2015. P. 63.
13. *Thorpe T.A.* History of Plant Tissue Culture // *Methods in Molecular Biology. Plant Cell Culture Protocols, Second Edition* / Eds. Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F., Totowa N.J. USA: Humana Press Inc., 2006. P. 9.
14. *Vasil I.K.* A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops // *Plant Cell Rep.* 2008. V. 27. P. 1423.
15. *Sussex I.M.* The scientific roots of modern plant biotechnology // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 1189.
16. *Vöchting H.* Über organbildung im pflanzenreich. Physiologische untersuchungen über wachstumsursachen und lebensheiten. Bd. 1. Bonn: Verlag von Max Cohen und sohn, 1878. 258 p.
17. *Vöchting H.* Über die Regeneration der Marchantien // *Jahrb. Wiss. Bot.* 1885. V. 16. P. 367.
18. *Haberlandt G.* Experiments on the culture of isolated plant cells // *Bot. Rev.* 1969. V. 35. P. 68.
19. *Gautheret R.J.* Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte // *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 1939. V. 208. P. 118.
20. *Nobécourt P.* Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux // *C. R. Séances Soc. Biol. Fil.* 1939. V. 130. P. 1270.
21. *White P.R.* Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient // *Am. J. Bot.* 1939. V. 26. P. 59.
22. *Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M.* Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 1392.
23. *Gautheret R.J.* La Culture des Tissus Végétaux. Techniques et réalisations. Paris: Masson et Cie, 1959. 868 p.
24. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. 272 с.
25. *Бутенко Р.Г.* Культура тканей лекарственных растений и перспективы ее использования в фармации // *Труды ЛХФИ. Вопросы фармакогнозии.* 1967. Т. 21. С. 184.
26. *Butenko R.G.* Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis. Jerusalem: Israel Program for Scientific Translations, 1968. 291 p.
27. *Слепян Л.И., Грушвицкий И.В., Бутенко Р.Г.* Женьшень как объект для введения в культуру тканей in vitro // *Труды Ленинградского химико-фармацевтического института. Вопросы фармакогнозии.* 1967. Т. 21. С. 198.
28. *Бутенко Р.Г., Грушвицкий И.В., Слепян Л.И.* Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре тканей женьшеня и других представителей рода *Panax* L. // *Ботанический журнал.* 1968. Т. 53. С. 906.
29. *Пинаев Г.П., Полянская Г.Г.* Создание и развитие Российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений // *Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Вып. 26.* / Под ред. М.С. Богдановой. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. Т. 61 С. 3.
30. *Носов А.М.* Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // *Физиология растений.* 1999. Т. 46. С. 837.
31. *Zenk M.H.* The impact of plant cell culture on industry // *Frontiers of Plant Tissue Culture* / Ed. Thorpe T.A. Calgary, Canada: Intl. Assoc. Plant Tissue Culture, Univ. of Calgary Printing Services, 1978. P. 1.
32. *Titova M.V., Khandy M.T., Konstantinova S.V., Kulichenko I.E., Sukhanova E.S., Kochkin D.V., Nosov A.M.* Effect of inhibitors of two isoprenoid biosynthetic pathways on physiological and biosynthetic characteristics of *Dioscorea deltoidea* cell suspension culture // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 894.
33. *Кочкин Д.В., Ханды М.Т., Зайцев Г.П., Толкачева Н.В., Шашков А.С., Титова М.В., Чирва В.Я., Носов А.М.* Протодиосцин в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* // *Химия природных соединений.* 2016. Т. 4. С. 572.
34. *Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Galishev B.A., Kolotyrkina N.G., Kuznetsov V.I., Nosov A.M.* Occurrence of 14-hydroxylated taxoids in the plant in vitro cell cultures of different yew species (*Taxus* spp.) // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 476. P. 337.
35. *Khandy M.T., Kochkin D.V., Tomilova S.V., Galishev B.A., Sukhanova E.S., Klyushin A.G., Ivanov I.M., Nosov A.M.* Obtaining and Study of Callus and Suspension Plant Cell Cultures of *Tribulus terrestris* L., a Producer of Steroidal Glycosides // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. P. 800.
36. *Kreis W.* Exploiting plant cell culture for natural product formation // *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2019. V. 92. P. 216.
37. *Máthé C., Demeter Z., Resetár A., Gonda S., Balázs A., Szőke É., Kiss Z., Simon Á., Székely V., Riba M., Garda T., Gere B., Noszály Z., Molnár A.V., Vasas G.* The plant

- tissue culture collection at the department of botany, University of Debrecen // *Acta Biol. (Szeged)*. 2012. V. 56. P. 179.
38. Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants // *Int. Rev. Cytol.* 1992. V. 132. P. 1.
  39. Takahashi S., Kojo K.H., Kutsuna N., Endo M., Toki S., Isoda H., Hasezawa S. Differential responses to high- and low-dose ultraviolet-B stress in tobacco Bright Yellow-2 cells // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6: 254. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00254>
  40. Novikova G.V., Mur L.A.J., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Mironov K.S., Mamaeva A.S., Shilov E.S., Rakitin. V.Y., Hall M.A. Nitric oxide has a concentration-dependent effect on the cell cycle acting via EIN2 in *Arabidopsis thaliana* cultured cells // *Front. Phys.* 2017. V. 8: 142.
  41. Zlobin I.E., Pashkovskiy P.P., Kartashov A.V., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Kuznetsov V.I. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 176. 104104. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104104>
  42. Xu J., Zhang N. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect // *Pharm. Bioprocess.* 2014. V. 2. P. 499.
  43. Davoodi A., Khoshvishkaie E., Azadbakht M. Plant cells technology as an effective biotechnological approach for high scale production of pharmaceutical natural compounds; A meta-analysis study // *Pharm. Biomed. Res.* 2019. V. 5. P. 1.
  44. Ochoa-Villarreal M., Howat S., Hong S., Jang M.O., Jin Y.-W., Lee E.-K., Loake G.J. Plant cell culture strategies for the production of natural products // *BMB Rep.* 2016. V. 49. P. 149.
  45. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 609.
  46. Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds // *Bio-tech. Rep.* 2020. V. 26: e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
  47. Ulbrich B., Wiesner W., Arens H. Large-Scale Production of Rosmarinic Acid from Plant Cell Cultures of *Coleus blume* Benth // *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures* / Eds. Neumann K.-H., Barz W., Reinhard E. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg Publisher, 1985. P. 293.
  48. Kobayashi Y., Akita M., Sakamoto K., Liu H., Shigeoka T., Koyano T., Kawamura M., Furuya T. Large-scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures // *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993. V. 40. P. 215. <https://doi.org/10.1007/BF00170369>
  49. Smart N. J., Fowler M. W. An airlift column bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions // *J. Exp. Bot.* 1984. V. 35. P. 531. <https://doi.org/10.1093/jxb/35.4.531>
  50. Goodman J., Walsh V. The story of taxol: nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. 286 p.
  51. Sato F., Yamada Y. High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells // *Phytochem.* 1984. V. 23. P. 281. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80318-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80318-0)
  52. Tabata M., Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures // *Biotechnology in Plant Science* / Eds. Zaitlin M., Day P., Hollaender A. Orlando, 1985. P. 207.
  53. Sasson A. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects // *Biotechnology: economic and social aspects. Issues for developing countries* / Cambridge: Cambridge University Press., 1992. P. 81.
  54. Azechi S., Hashimoto T., Yuyama T., Nagatsuma S., Nakashizuka M., Nishiyama T., Murata A. Continuous cultivation of tobacco plant cells in an industrial scale plant // *Hakko Kagaku Kaishi.* 1983. V. 61. P. 117.
  55. Rittershaus E., Ulrich J., Weiss A., Westphal K. Large scale industrial fermentation of plant cells: experiences in cultivation of plant cells in a fermentation cascade up to a volume of 75 000 L // *BioEngineering.* 1989. V. 5. P. 28.
  56. Hibino K., Ushiyama K. Commercial Production of Ginseng by Plant Tissue Culture Technology // *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients* / Eds. Fu T.J., Singh G., Curtis W.R. Boston: Springer, 1999. P. 215.
  57. Yazaki K. *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects // *Plant Biotechnol. (Tokyo, Jpn.)*. 2017. V. 34. P. 131. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.0823a>
  58. Choi H.-K., Son J.-S., Na G.-H., Hong S.-S., Park Y.-S., Song J.-Y. Mass production of paclitaxel by plant cell culture // *J. Plant Biotechnol.* 2002. V. 29. P. 59.
  59. Park I.H., Sohn J.H., Kim S.B., Lee K. S., Chung J.S., Lee S.H., Kim T.Y., Jung K.H., Cho E.K., Kim Y.S., Song H.S., Seo J.H., Ryoo H.M., Lee S.A., Yoon S.Y. et al. An Open-label, randomized, parallel, phase III trial evaluating the efficacy and safety of polymeric micelle-formulated paclitaxel compared to conventional cremophor EL-based paclitaxel for recurrent or metastatic HER2-negative breast cancer // *Cancer Res. Treat.* 2017. V. 49. P. 569.
  60. Eibl R., Meier P., Stutz I., Schildberger D., Hühn T., Eibl D. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 8661.
  61. Nordlund E., Lille M., Silventoinen P., Nygren H., Sepänen-Laakso T., Mikkelsen A., Aura A.M., Heiniö R.L., Nohynek L., Puupponen-Pimiä R., Rischer H. Plant cells as food – a concept taking shape // *Food Res. Int.* 2018. V. 107. P. 297.
  62. Schäfer C., Bosshart D., Frick K., Müller C. European Food Trends Report 2019. Hacking Food: Redefining What We Eat // GDI-Study No. 47. Zurich: GDI Gottlieb Duttweiler Institute, 2019.
  63. Barbulova A., Apone F., Colucci G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients // *Cosmetics.* 2014. V. 1. P. 94.

64. Suvanto J., Nohynek L., Seppänen-Laakso T., Rischer H., Salminen J.-P., Puupponen-Pimiä R. Variability in the production of tannins and other polyphenols in cell cultures of 12 Nordic plant species // *Planta*. 2017. V. 246. P. 227.
65. Trehan S., Michniak-Kohn B., Beri K. Plant stem cells in cosmetics: current trends and future directions // *Future Sci OA*. 2017. V. 3: FSO226.
66. Yue W., Ming Q.L., Lin B., Rahman K., Zheng C.J., Han T., Qin L.P. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. V. 36. P. 215.
67. Nielsen E., Temporiti M.E.E., Cella R. Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering // *Plant Cell. Rep.* 2019. V. 38. P. 1199.
68. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов in vivo и in vitro // *Физиология растений*. 1994. Т. 41. С. 873.
69. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid Production via Plant Cell Cultures: Biosynthesis, Accumulation and Scaling-Up to Bioreactors // *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* / Eds. Paek K.-Y. Murthy H.N., Zhong J.-J. Netherlands: Springer, 2014. P. 563.
70. Kostova I., Dinchev D. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity // *Phytochem. Rev.* 2005. V. 4. P. 111.
71. Christensen L.P. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects // *Adv. Food Nutr. Res.* 2008. V. 55. P. 1.
72. Tetali S.D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use // *Planta*. 2019. V. 249. P. 1.
73. Murthy H.N., Dandin V.S., Zhong J.-J., Paek K.-Y. Strategies for Enhanced Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures // *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology* / Eds. Paek K.-Y. Murthy H.N., Zhong J.-J. Netherlands: Springer, 2014. P. 471.
74. Smolenskaya I.N., Reshetnyak O.V., Smirnova Y.N., Chernyak N.D., Globa E.B., Nosov A.M., Nosov A.V. Opposite effects of synthetic auxins, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1-naphthalene acetic acid on growth of true ginseng cell culture and synthesis of ginsenosides // *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. V. 54. P. 215.
75. Smirnova Y.N., Reshetnyak O.V., Smolenskaya I.N., Voevudskaya S.Y., Nosov A.M. Effect of growth regulators on ginsenoside production in the cell culture of two ginseng species // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V. 57. P. 430.
76. Томилова С.В., Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Ключин А.Г., Носов А.М. Влияние синтетических аналогов ауксинов – 2,4-Д и  $\alpha$ -НУК – на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. // *Физиология растений*. 2020. Т. 67. С. 389.
77. Бутенко Р.Г., Воробьев А.С., Носов А. М. Синтез, накопление и локализация стероидных гликозидов в клетках разных штаммов *Dioscorea deltoidea* Wall // *Физиология растений*. 1992. Т. 39 С. 1146.
78. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics // *Mass Spectrom. Rev.* 2007. V. 26. P. 51.
79. Yang W.Z., Ye M., Qiao X., Liu C.F., Miao W.J., Bo T., Tao H.Y., Guo D.A. A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides // *Anal. Chim. Acta*. 2012. V. 739. P. 56.
80. Kochkin D.V., Kachala V.V., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Chirva V.Y., Nosov A.M. Malonyl-ginsenoside content of a cell-suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // *Phytochemistry*. 2013. V. 93. P. 18.
81. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 649.
82. Kochkin D.V., Zaitsev G.P., Kachala V.V., Chizhov A.O., Demidova E.V., Titova M.V., Chirva V.Y., Nosov A.M., Kuznetsov V.V. The occurrence of gypenoside XVII in suspension cell culture of ginseng *Panax japonicus* var. *repens* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2012. V. 442. P. 42.
83. Глаголева Е.С., Кочкин Д.В. Изменение состава тритерпеновых гликозидов на стадии деградации культуры клеток женьшеня // *Acta Naturae*. Т. 2 из Спецвыпуск. / Москва: Издательство Перо, 2019. С. 267.
84. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Kuznetsov V.V., Nosov A.M. Detection of taxuyunnanin C in suspension cell culture of *Taxus canadensis* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 485. P. 129.
85. Kovařík A., Lim K.Y., Soucková-Skalická K., Matyasek R., Leitch A.R. A plant culture (BY-2) widely used in molecular and cell studies is genetically unstable and highly heterogeneous // *Bot. J. Linn. Soc.* 2012. V. 170. P. 459.
86. Betekhtin A., Rojek M., Jaskowiak J., Milewska-Hendel A., Kwasniewska J., Kostyukova Y., Kurczynska E., Rumyantseva N., Hasterok R. Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. // *PLoS One*. 2017. V. 12: e0173537.
87. Смоленская И.Н., Зориняц С.Э., Смирнова Ю.Н., Носов А.В., Чайко А.Л., Носов А.М. Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* var. *repens* 1. Параметры роста и цитогенетические характеристики // *Биотехнология*. 2005. Т. 5. С. 20.
88. Решетняк О.В., Смоленская И.Н., Смирнова Ю.Н., Чайко А.Л., Носов А.В., Носов А.М. Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* var. *repens* 2. Качественный и количественный состав гинзенозидов в клетках при культивировании in vitro // *Биотехнология*. 2005. Т. 6. С. 20.
89. Heine-Dobbernack E., Kiesecker H., Schumacher H.M. Cryopreservation of dedifferentiated cell cultures // *Plant cryopreservation: a practical guide* / Ed. Reed V.M. New York: Springer, 2008. P. 141.
90. Kim S.I., Choi H.K., Son J.S., Yun J.H., Jang M.S., Kim H.R., Song J.Y., Kim J.H., Choi H.J., Hong S.S.

- Cryopreservation of *Taxus chinensis* suspension cell cultures // CryoLetters. 2001. V. 22. P. 43.
91. Fedorovskii D.N., Chernyak N.D., Popov A.S. The disturbing effects of cryopreservation on the plasma membranes of ginseng cells // Sov. Plant Physiol. 1993. V. 40. P. 94.
92. Joshi A., Teng W.L. Cryopreservation of *Panax ginseng* cells // Plant Cell Rep. 2000. V. 19. P. 971.
93. Mannonen L., Toivonen L., Kauppinen V. Effects of long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures // Plant Cell Rep. 1990. V. 9. P. 173.
94. Seitz U., Reinhard E. Growth and ginsenoside patterns of cryopreserved *Panax ginseng* cell cultures // J. Plant Physiol. 1987. V. 131. P. 215.
95. Butenko R.G., Popov A.S., Volkova L.A., Chernyak N.D., Nosov A.M. Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of *Dioscorea deltoidea* and *Panax ginseng* cells in liquid nitrogen // Plant Sci. Lett. 1984. V. 33. P. 285.
96. Mikula A. Comparison of three techniques for cryopreservation and reestablishment of long-term *Gentiana tibetica* suspension culture // CryoLetters. 2006. V. 27. P. 269.
97. Samar F., Mujib A., Nasim S.A., Siddiqui Z.H. Cryopreservation of embryogenic cell suspension of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2009. V. 98. P. 1.
98. Krivokharchenko A.S., Chernyak N.D., Nosov A.M. Cryopreservation of suspension cultures of plant cells by the freezing technique elaborated for mammalian embryos. Rus. J. Plant Physiol. 1999. V. 46. P. 831.
99. Титова М.В., Шумило Н.А., Черняк Н.Д., Кривохарченко А.С., Орешников А.В., Носов А.М. Использование криосохранения для поддержания стабильности штамма при аппаратном культивировании суспензии клеток *Polyscias filicifolia* Bailey: 1. Оценка ростовых характеристик возобновленной культуры // Биотехнология. 2007. V. 5. С. 60.
100. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Popova E.V., Nosov A.M. Physiological, cytological and biochemical stability of *Medicago sativa* L. cell culture after 27 years of cryogenic storage // CryoLetters. 2015. V. 36. P. 252.

УДК 581.1

## НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА В ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ: ОСНОВНЫЕ ЭФФЕКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

© 2021 г. Ю. В. Венжик<sup>а, \*</sup>, И. Е. Мошков<sup>а</sup>, Л. А. Дыкман<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений  
и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

\*email: jul.venzhik@gmail.com

Поступила в редакцию 31.07.2020 г.

После доработки 03.08.2020 г.

Принята к публикации 03.08.2020 г.

В обзоре представлены данные о воздействии наночастиц золота на физиологические процессы (реакции) высших растений. Золотые наночастицы могут влиять на многие процессы в растительном организме, в том числе на интенсивность роста, показатели водного обмена, активность фотосинтетического аппарата и антиоксидантной системы, а также на уровень экспрессии некоторых генов, важных для функционирования растений как в оптимальных, так и в неблагоприятных условиях, что показано при использовании в качестве объектов растений разных систематических групп. Анализ данных литературы позволяет заключить, что наночастицы золота могут быть рекомендованы для использования не только как стимуляторы роста и развития, но и в качестве адаптогенов, увеличивающих устойчивость растений к различным неблагоприятным воздействиям.

**Ключевые слова:** золотые наночастицы, получение, биологические эффекты, перспективы использования

**DOI:** 10.31857/S0015330321020202

### ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы – мельчайшие структуры размером 1–100 нм [1–3], которые в природе появляются естественным путем, например, при извержении вулканов, в случае масштабных лесных пожаров или при выветривании горных пород [4, 5]. Изучение искусственных наночастиц, положившее начало нанотехнологии, привело к широкому их использованию практически во всех сферах человеческой деятельности, а особенно эффективно – в нефтехимической промышленности, электронике, катализе, косметологии, фармацевтике и биомедицине [6–10]. Целенаправленное получение и использование нанообъектов в последние годы приобрело поистине глобальные масштабы. Так, в 2015 г. более 15% всех продуктов на мировом рынке были получены с использованием нанотехнологий, тем или иным образом включенных в процесс производства [7]. Мировой оборот рынка нанотехнологий в этом же году достиг триллиона долларов [11]. Сейчас известно уже более 1300 коммерческих нанопродуктов, применяемых в различных областях человеческой деятельности [3].

Наряду с этим многие наночастицы, например, металлические, обладающие высокой физико-химической активностью, способны проникать из окружающей среды в биологические объекты, аккумулироваться внутри них [4, 5, 12], а в дальнейшем распространяться по пищевым цепям [13–15]. Так, наночастицы золота были обнаружены не только в листьях обработанных ими растений табака, но и в тканях табачного бражника, который питался этими листьями [16]. Широкое распространение наноматериалов, их активное внедрение в жизнь людей и природу вызывает оправданное беспокойство экологов. Последствия возможных взаимодействий между наночастицами и живыми организмами, к сожалению, до сих пор не очевидны. Особенно это касается растений, ведущих прикрепленный образ жизни и наиболее уязвимых к любым неблагоприятным воздействиям. Именно поэтому научные исследования, раскрывающие сущность и последствия взаимодействий между растениями и наночастицами, сегодня приобретают особую актуальность.

Влияние наночастиц на растения зависит от целого ряда факторов: типа, размеров, концентраций наночастиц, вида растений и условий по-

**Сокращения:** АОС – антиоксидантная система, ЗНЧ – золотые наночастицы, ФСА – фотосинтетический аппарат

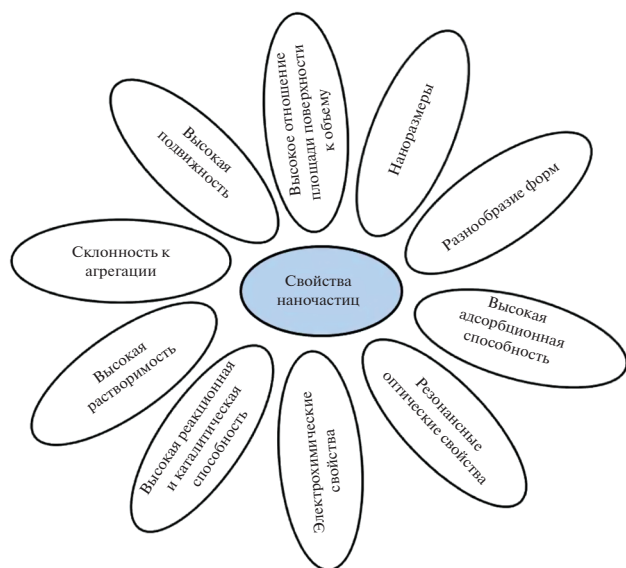


Рис. 1. Основные свойства золотых наночастиц.

становки экспериментов [4, 5, 17]. В данном обзорном исследовании мы рассматриваем влияние на высшие растения наночастиц только одного типа – золотых, наиболее активно применяемых в биомедицинской практике. В последние годы в литературе накопилось много экспериментального материала о влиянии золотых наночастиц (ЗНЧ) на растения [18–22], тогда как обзорные исследования в этой области, суммирующие и систематизирующие экспериментальные данные, немногочисленны [15, 23–25]. Учитывая сказанное, мы обобщили данные литературы об особенностях ЗНЧ, методах их получения, обратив особое внимание на возможные пути поступления ЗНЧ в растительный организм, основные эффекты и перспективы использования в физиологии растений.

### ОСОБЕННОСТИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

Подобно другим нанообъектам, ЗНЧ обладают целым рядом уникальных свойств (рис. 1). Кроме мельчайших размеров и большой площади поверхности, они также характеризуются высокой физической и химической активностью. В зависимости от заряда и покрытия ЗНЧ могут иметь разное сродство к воде и, соответственно, быть гидрофильными, гидрофобными и даже амфифильными, и это дает им возможность проникать через разнообразные барьеры, в том числе биомембраны. Высокая адсорбционная способность усиливает их каталитические свойства. Наночастицы могут аккумулироваться внутри организма и вызывать токсические эффекты [5, 12, 26, 27].

В экспериментальной биологии ЗНЧ, как правило, используют в виде коллоидных растворов,

которые имеют различную окраску – от слабых оттенков розового до интенсивного красного, а иногда – голубого и зеленого. Цвет растворов определяется размерами и формой наночастиц, а также возможностями взаимодействия электронов на их поверхности с электрическим полем падающего света [28, 29]. Именно наличие уникальных оптических свойств, связанных с возбуждением локализованных плазмонных резонансов при взаимодействии со светом, обуславливает интерес к исследованию самих ЗНЧ и их использованию в биомедицине [26, 28]. Поверхностными плазмонами в физике называются коллективные колебания электронов на поверхности металла. Возбуждение поверхностных плазмонов светом называется поверхностным плазмонным резонансом [28]. Другими словами, высокая активность электронов на поверхности наночастиц многократно увеличивается за счет способности к коллективным колебаниям под влиянием света определенной длины волны. У ЗНЧ этот эффект наблюдается в видимом и инфракрасном свете [26, 30]. Например, плазмонный резонанс ЗНЧ со средним диаметром  $\sim 20$  нм локализован в зеленой части видимого спектра (около 520 нм), что и объясняет красный цвет их растворов [26, 28].

С точки зрения физиологии растений, эффект плазмонного резонанса особо интересен, поскольку, благодаря ему ЗНЧ могут влиять на фотосинтетический аппарат (ФСА). В опытах на изолированных хлоропластах, в искусственных фотосистемах и с интактными растениями показано, что ЗНЧ способны увеличивать активность ФСА [20, 31–33]. Предполагают, что активные электроны на поверхности наночастиц могут “улавливать” фотоны света и облегчать передачу энергии в светособирающем комплексе, вызывая внутри него плазмонное усиление фотонов. При этом более чем в 10 раз увеличивается количество возбужденных электронов [20] и многократно усиливается абсорбция света [32, 33]. Кроме того, разделение зарядов в реакционном центре происходит быстрее и эффективнее, чем в отсутствие обработки ЗНЧ [20]. Считается, что именно вследствие этих изменений увеличиваются скорости электронного транспорта, фотофосфорилирования и выхода кислорода под влиянием ЗНЧ [20, 32–34].

С другой стороны, ЗНЧ способны забирать на себя “лишнюю” энергию возбужденных электронов и, тем самым, “гасить” избыточное возбуждение хлорофилла [31, 35]. При этом наблюдается усиление фотохимического тушения и снижение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла [32]. Фактически наночастицы выступают в качестве протекторов окислительного стресса и фотоингибирования.

Таким образом, ЗНЧ обладают особыми свойствами, в том числе большой площадью поверх-

ности, высокой стабильностью и, в отличие от массивного металла, химической активностью. Кроме того, благодаря особым оптическим свойствам, ЗНЧ способны изменять активность ФСА и снижать риски развития окислительного стресса у растений. Уникальные свойства ЗНЧ позволяют предполагать, что они могут существенно изменять метаболизм растений. Однако для того, чтобы рекомендовать их к дальнейшим исследованиям, необходимо остановиться на вопросах о способах их получения.

### ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

В целом, методы синтеза металлических коллоидов, в том числе золотых, можно условно разделить на две большие группы в зависимости от способа их получения. Первая группа включает дисперсионные методы, основанные на диспергировании металлов, например, при их обработке плазмой, лазером, электрическим током [5, 36, 37]. Вторая группа методов – конденсационных – наиболее распространена. Конденсация – это восстановление металла из ионов соответствующих солей. В свою очередь, конденсационные методы можно классифицировать в зависимости от характера восстановителя на химический, фото- и радиохимический синтез [5, 36, 37]. Во всех случаях в процессе восстановления атомы и ионы образуют отдельные частицы, которые сливаются в кластеры все более крупных размеров, причем постепенно происходит переход от атомно-молекулярных свойств к свойствам частиц компактного металла. Этот процесс и его особенности при различных способах получения ЗНЧ подробно описаны в научной литературе [36, 37].

На сегодняшний день для химического получения различных по форме и размерам частиц нанозолота существует целый ряд доступных протоколов [36–38]. Например, широко распространенным методом получения ЗНЧ с размерами в пределах 8–70 нм для медико-биологических исследований является цитратное восстановление золотохлористоводородной кислоты. Суть метода заключается в том, что к кипящему 0.01% водному раствору золотохлористоводородной кислоты добавляют 1% водный раствор цитрата натрия в количестве, варьируемом в зависимости от требуемого размера частиц [36–39].

В последнее время появилось множество методов “зеленой” химии, использующих растения для целенаправленного получения наночастиц [40–42]. Так, при выращивании растений горчицы и *Arabidopsis* на солях золота в их клетках были обнаружены ЗНЧ [43, 44]. Наночастицы аккумулировались преимущественно в хлоропластах. Механизм этого явления не известен, однако предполагают, что в восстановлении ионов золо-

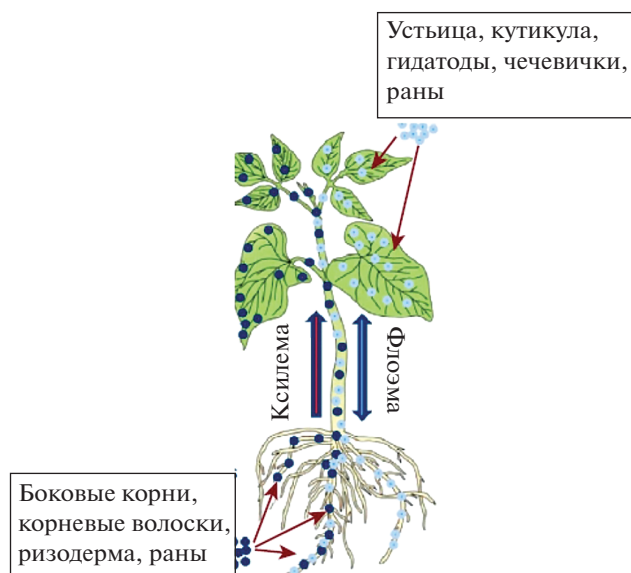
та до наночастиц могут участвовать моносахара [43], а растительные флавоноиды и другие полифенолы способствуют аккумуляции и стабилизации наноконплексов [45, 46]. Для целенаправленного синтеза ЗНЧ используют также растительные экстракты [47]. Например, частицы золота размером 10–30 нм были синтезированы в ризосомальном растворе альпинии [48]. Для синтеза нанозолота использовали экстракты из листьев кофе, чая, табака и многих других растительных объектов [49]. Однако обычно для стабилизации таких наноконплексов требуется длительное время, а приемы выделения наночастиц из экстрактов и растений еще не до конца отработаны. Кроме того, получаемые “зеленым” методом ЗНЧ зачастую полидисперсны и полиморфны.

Итак, самыми распространенными и востребованными в научных кругах остаются методы химического восстановления ЗНЧ из его солей [38]. Доступность этих методов позволяет широко использовать ЗНЧ в экспериментальных исследованиях.

### ПУТИ ПОСТУПЛЕНИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ В РАСТЕНИЯ

Вопрос о возможных способах проникновения наночастиц в растительный организм, а также механизмах их дальнейшего перемещения по тканям и клеткам растений является на сегодняшний день наиболее спорным, поэтому мы провели краткий обзор литературных источников, освещающих основные гипотезы и результаты экспериментальных исследований по данному вопросу.

Первые работы, посвященные проникновению ЗНЧ в растения, появились в 70-е годы прошлого века [50]. Недавно опубликовано несколько обзоров, в которых рассмотрены вопросы взаимодействия металлических наночастиц с высшими растениями [51–54]. Подчеркнем, что к настоящему времени способность ЗНЧ проникать в растительные ткани, а также перемещаться и накапливаться в клетках растений, уже многократно экспериментально доказана. В частности, на проростках пшеницы с использованием методов люминесценции и масс-спектрометрии показано, что ЗНЧ различного размера (3, 5 и 10 нм), проникая через поверхность листьев, за 7 сут распространяются по всему организму, аккумулируются в корнях и даже частично выводятся в почву [21]. В исследованиях на проростках арбуза методом масс-спектрометрии установлено, что уже через 48 ч после опрыскивания листьев растворами, содержащими ЗНЧ разных размеров и форм, их обнаруживали как в листьях, так и в корнях [55]. В сосудах корней табака, выдержанного на растворах ЗНЧ размером 3.5 и 18 нм, они были выявлены спустя 3 сут при помощи рентгеновского микроскопа [56]. С использованием электронной микроскопии ЗНЧ обнаружены в клет-



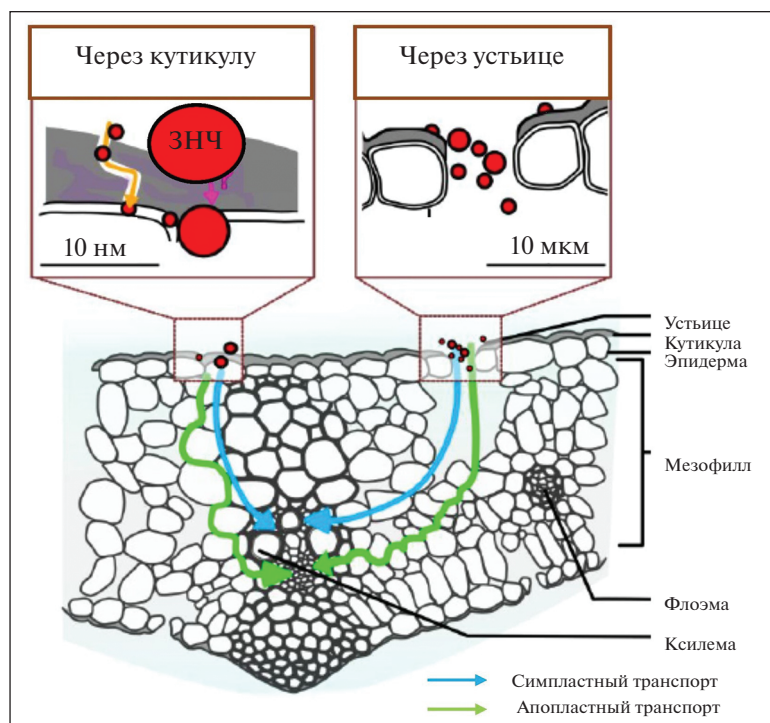
**Рис. 2.** Гипотетические пути проникновения наночастиц в растения и их транспорта в растении [58].

ках корней горчицы и арбуза, выращиваемых на растворах наночастиц [18, 57].

Следовательно, ЗНЧ способны попадать в ткани растений как через корневую систему, так и через листья. Однако механизмы этого феномена до сих пор не до конца ясны и обсуждаются, по большей части, гипотетически (рис. 2, 3).

Скорее всего, в корневую систему наночастицы попадают вместе с поглощаемой водой – через боковые корни, корневые волоски и клетки ризодермы [58, 59]. Основным способом проникновения наночастиц через листья считают устьица [21, 55, 60]. Представленные в цитируемых работах результаты можно использовать для идентификации транспортного пути наночастиц из ксилемы во флоэму. Также предполагается, что благодаря своей амфифильности наночастицы могут “просачиваться” через липофильный кутикулярный слой [21, 55] или разрушать восковый слой кутикулы и попадать таким образом в лист [21, 58]. Кроме того, наночастицы могут проникать в надземные части растений через гидатоды, трихомы и чечевички [58].

В экспериментальных исследованиях широко используется такой способ обработки растений наночастицами, как замачивание семян в их растворах. Вероятнее всего, в этом случае наночастицы проникают внутрь семян пассивно с водой, а также через разрушенные участки семенной кожуры [61]. Однако механизм дальнейшей “работы” наночастиц при таком их способе попадания в растительный организм не изучен, хотя экспериментально доказано, что растения, выращенные из семян, обработанных ЗНЧ, отличаются от контрольных (необработанных) по целому ряду показателей [20, 45, 48].



**Рис. 3.** Гипотетическая модель поступления наночастиц в клетки и ткани листа [21].



Главным барьером на пути наночастиц считается клеточная стенка [4, 58]. Как предполагают, небольшие наночастицы (до 20 нм) способны проходить через поры клеточной стенки, размеры которых варьируют в пределах от 5 до 20 нм [4, 58]. Известно, что в клетки попадают наночастицы и больших размеров, которые, по всей вероятности, разрушают клеточные филаменты, образуя для себя проходы внутрь клеток [4, 58]. Затем они могут передвигаться между клетками по апопласту или же, преодолев плазмалемму, двигаться по симпласту [21, 58, 59].

Казалось бы, именно межклеточный симпластный транспорт теоретически возможен даже для довольно крупных наночастиц, способных преодолеть барьер в виде плазмодесм, достигающих размеров 50 нм [58]. Однако самым “узким” местом в дискуссии о передвижении наночастиц по растительному организму является именно вопрос об их проникновении в клетку через плазмалемму. Наиболее очевидной представляется возможность преодоления этого барьера путем эндоцитоза [62, 63]. В работе Moscatelli с соавт. [64] были использованы отрицательно и положительно заряженные ЗНЧ для исследования процессов эндоцитоза в прорастающих пыльцевых трубках табака. При помощи электронной микроскопии продемонстрировано, что ЗНЧ быстро захватываются путем эндоцитоза и оказываются в мембранных везикулах. Некоторые авторы полагают, что амфифильные наночастицы могут попадать в клетки непосредственно через липидный слой мембраны [4].

По сути, основными ограничивающими факторами на пути наночастиц по растительному организму являются их размеры, химические свойства (гидрофильность или липофильность) и заряд, который может способствовать успешному эндоцитозу в клетки [21]. При этом эффективность проникновения ЗНЧ в ткани растения зависит от размера и поверхностного заряда наночастиц. Эксперименты показывают, что положительно заряженные ЗНЧ активно поглощаются только корнями растений, в то время как отрицательно заряженные ЗНЧ способны эффективно перемещаться от корней в стебли и листья [63]. Считается, что внутри организма наночастицы способны вступать в контакты с белками, липидами и углеводами, формируя вокруг себя “органическую корону”, которая способствует дальнейшему преодолению биологических барьеров [26]. Двигаясь далее по растительному организму, наночастицы могут вызывать спектр разнообразных изменений у растений (табл. 1).

## ОСНОВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА РАСТЕНИЯ

Анализ литературных источников наглядно демонстрирует, что влияние ЗНЧ на высшие растения зависит от многих факторов [76]. Более того, единой схемы проведения опытов в этом направлении пока не существует, и эксперименты проводятся на достаточно широком ряде объектов с использованием наночастиц разных размеров и концентраций коллоидных растворов (табл. 1). Кроме того, наночастицами обрабатывают как корни [18, 67, 69], так и листья [21, 32, 45, 48]. Длительность экспозиции с ЗНЧ может колебаться от нескольких часов до месяца (табл. 1). Диапазон размеров наночастиц, как правило, варьирует в пределах от 3 до 60 нм, хотя чаще всего применяются частицы со средним диаметром 10–20 нм (табл. 1). Стоит признать, что такое разнообразие подходов к проблеме значительно затрудняет анализ имеющихся экспериментальных данных. Мы проанализировали сведения об ответных реакциях растений на ЗНЧ, учитывая только зависимость от концентрации используемых коллоидных растворов.

Подчеркнем, что эффекты растворов нанозолота в концентрациях до 200 мкг/мл носят преимущественно стимулирующий характер на растения, влияя при этом на многие процессы в нем. Наиболее часто отмечают эффекты нанозолота на интенсивность ростовых процессов. В частности, повышение скорости прорастания семян и интенсивности роста под влиянием ЗНЧ в концентрации до 200 мкг/мл показаны на примере пшеницы и овса [45], кукурузы [48], ячменя [70], *Arabidopsis* [68], маша [20], горчицы [18, 66], табака [16], гладиолуса [72], рукколы [74], лаванды [75], моркови [77], арбуза [57]. Кроме того, обработка ЗНЧ в концентрации до 80 мкг/мл стимулировала устьичную проводимость у пшеницы [21] и увеличение содержания воды в листьях *Arabidopsis* [68]. На моделях хризантемы, герберы и стрептокарпуса показана стимуляция ЗНЧ ризогенеза [78].

Заметное влияние ЗНЧ оказывают на ФСА растений [79]. Исследователи отмечают усиление интенсивности фотосинтеза [21], скорости электронного транспорта [20], выхода кислорода и реакции Хилла [20, 32], изменение параметров флюоресценции [21, 32], увеличение содержания фотосинтетических пигментов [20, 48, 66] и числа тилакоидов в гранах хлоропластов [48] под влиянием нанозолота в концентрации до 100 мкг/мл.

Кроме того, ЗНЧ способны уменьшать риски окислительного стресса. Так, снижение содержания МДА и пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в листьях растений отмечены под влиянием небольших (10 и 25 мкг/мл) концентраций нанозолота [66]. При этом ЗНЧ в концентрации до 100 мкг/мл стимулировали накопление пролина в листьях горчи-

Таблица 1. Основные эффекты наночастиц золота на высшие растения.

Размеры наночастиц, концентрации растворов	Объект	Способ внесения золота	Длительность экспозиции	Наблюдаемые эффекты	Ссылки
10 нм 62, 100 и 116 мкг/мл	<i>Cucumis sativus</i> <i>Lactuca sativa</i>	Через семена	7 сут	Нет эффекта на прорастание семян и рост корней	[65]
10–20 нм 10, 25, 50, 100 мкг/мл	<i>Brassica juncea</i>	Через семена и листья	30 сут	Усиление темпов прорастания семян, интенсивности роста растений, увеличение диаметра стебля, числа листьев и побегов, снижение содержания МДА в листьях, увеличение содержания хлорофиллов, увеличение количества стручков и семян. Концентрации 50 и 100 мкг/мл – увеличение содержания МДА в листьях	[66]
250, 750 мкг/мл	<i>Cucurbita pepo</i>	Через корни	6 сут	Нет эффектов на рост растений и транспирацию	[67]
24 нм 10 и 80 мкг/мл	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Через семена	15 сут	Усиление темпов прорастания семян, интенсивности роста растений, увеличение содержания воды в листьях, активности ферментов АОС, изменение уровня экспрессии ряда микроРНК, увеличение количества семян.	[68]
50 нм 100–400 мкг/мл	<i>Brassica juncea</i>	Через корни	10 сут	Усиление роста, накопление в листьях пролина, увеличение активности ферментов АОС. Концентрация 400 мкг/мл – увеличение содержания $H_2O_2$ в листьях	[18]
15 × 62 наностержни 5, 10 и 20 мкг/мл	<i>Citrullus lanatus</i>	Через семена и корни	3 сут	Усиление темпов прорастания семян, интенсивности роста растений, увеличение содержания МДА в листьях, увеличение активности ферментов АОС.	[57]
2–21 нм 1, 3, 5, 8 и 10 мкг/мл	<i>Hordeum vulgare</i>	Через корни	14 сут	Снижение темпов роста растений	[69]
10–30 нм 5, 10 и 15 мкг/мл	<i>Zea mays</i>	Через семена	10 сут	Усиление темпов прорастания семян, интенсивности роста растений, увеличение содержания хлорофиллов, общего количества протеинов и растворимых сахаров в листьях, увеличение числа тилакоидов в хлоропластах.	[48]
3, 10 и 50 нм 10 мкг/мл	<i>Triticum aestivum</i>	Через листья	7 сут	Усиление интенсивности роста, устьичной проводимости, фотосинтеза, увеличение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла.	[21]

Таблица 1. Окончание

Размеры наночастиц, концентрации растворов	Объект	Способ внесения золота	Длительность экспозиции	Наблюдаемые эффекты	Ссылки
15–20 нм 1, 100 и 1000 мкг/мл	<i>Vigna radiata</i>	Через семена, корни и листья	30 сут	Усиление интенсивности роста, скорости транспорта электронов, увеличение содержания фотосинтетических пигментов, липидов, общего количества белка и растворимых сахаров в листьях	[20]
20 нм 20 и 50 мкг/мл	<i>Pennisetum glaucum</i>	Через семена	5 сут	Усиление темпов прорастания семян, интенсивности роста растений	[61]
15 и 50 нм 50, 10 и 1 мкг/мл	<i>Hordeum vulgare</i>	Через семена	3 сут	Усиление темпов прорастания семян, стимуляции роста coleoptилей и корней	[70]
12, 20, 60 нм 10, 100, 500 и 1000 мкг/мл	<i>Oryza sativa</i>	Через семена	7 сут	Нет эффектов на темпы роста, содержание $H_2O_2$ и МДА в листьях.	[71]
30–40 нм 100 и 200 мкг/мл	<i>Triticum aestivum</i> <i>Avena sativa</i>	Через семена	10 сут	Увеличение прорастания семян, длины корней и массы листьев	[45]
10–14 нм	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Через листья	5–86 ч	Увеличение скорости реакции Хилла, выхода кислоты, усиление фотохимического и снижение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла.	[32]
5, 10, 15 нм 30, 100 мг/л	<i>Nicotiana tabacum</i>	Через семена	3–7 сут	Усиление роста	[16]
25 нм 500–1000 мкМ	<i>Gloriosa superba</i>	Через семена	40 сут	Повышение скорости прорастания семян, вегетативного роста	[72]
20 нм 50 мг/л	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Через корни	5 сут	Отсутствие эффекта	[73]
20 нм 30 мг/л	<i>Eruca sativa</i>	Через семена	6 нед.	Увеличение всхожести, увеличение длины корней и побегов	[74]
24 нм 1, 2, 5, 10, 20, 50 мг/л	<i>Lavandula angustifolia</i>	Через листья	4 нед.	Стимуляция образования побегов, увеличение длины корней и массы растений	[75]

цы [18], а также активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) у *Arabidopsis* [68], горчицы [18] и арбуза [57].

Интересные данные получены Kumar с соавт. [68] на 2-недельных проростках *A. thaliana*, семена которого замачивали в растворах нанозолота (24 нм; 10 и 80 мкг/мл). Авторами отмечено усиление темпов роста, увеличение числа боковых корней, содержания воды в листьях, активности антиоксидантных ферментов и даже увеличение числа семян под влиянием ЗНЧ [68]. Параллельно показано изменение уровня экспрессии ряда микроРНК (miR398, miR408, miR164, miR167 и miR169), задействованных в регуляции развития растений *A. thaliana*. Известно, например, что miR398 участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих супероксиддисмутазу, а также генов, регулирующих прорастание семян и рост растений. Изменение экспрессии miR167 и miR169 может влиять на размер проростков, быть причиной их раннего цветения и созревания семян. К этому стоит добавить, что отмеченные изменения могли быть результатом влияния ЗНЧ на работу путей передачи сигнала ауксина, поскольку одна из мишеней miR167 — факторы ответа на ауксин, в частности, ARF8 [68].

Увеличение концентрации используемых растворов нанозолота может приводить к токсическим эффектам. Например, в опытах на растениях горчицы показано, что 10-суточная экспозиция на растворах ЗНЧ в концентрациях 50 и 100 мкг/мл не вызывала накопления  $H_2O_2$  в листьях, но оно наблюдалось при обработке нанозолотом в концентрации 400 мкг/мл [18]. Низкие концентрации ЗНЧ также могут оказывать негативное действие на растительный организм, но при увеличении экспозиции с ЗНЧ. Например, в экспериментах на горчице установлено, что даже обработка ЗНЧ в концентрациях 50 и 100 мкг/мл приводила к повышению содержания МДА и  $H_2O_2$  в листьях, то есть усиливала окислительный стресс растений при увеличении продолжительности экспозиции с ЗНЧ до 30 сут [66].

Имеют значение и видовые особенности объектов. В опытах на сое показано, что концентрации нанозолота до 1000 мкг/мл стимулировали рост и увеличение содержания фотосинтетических пигментов [20], в то время как у ячменя даже концентрация 50 мкг/мл вызывала угнетение роста [69]. В ряде работ отмечено отсутствие эффекта ЗНЧ на растения риса, латука, перца, цуккини, фасоли и огурца [65, 67, 71, 73]. И всего лишь у некоторых видов отмечается ингибирующее действие ЗНЧ на рост и развитие растений, в частности табака, полыни, ячменя, [56, 80, 81], увеличение хромосомных aberrаций и снижение митотического индекса у лука [82, 83].

Резюмируя вышесказанное, отметим, что ЗНЧ влияют на многие процессы в высших растениях, причем чаще всего, в низких концентрациях оказывают стимулирующее действие на них. Данные литературы свидетельствуют, что при постановке опытов и анализе экспериментальных данных важно учитывать все возможные факторы влияния наночастиц на растения.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ В ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Итак, в целом ряде исследований показано, что ЗНЧ способны проникать в растительный организм и влиять на многие процессы в нем, а именно: на рост, водный обмен, фотосинтез и активность антиоксидантных ферментов. Эти данные позволяют, на наш взгляд, рекомендовать ЗНЧ для дальнейшего использования в физиологии растений в качестве стимуляторов роста и развития.

Известны исследования, в которых проведены тесты с целью выявления концентраций коллоидных растворов ЗНЧ, оказывающих наиболее выраженные стимулирующие эффекты на растения. Например, в опытах на кукурузе показано, что из семян, обработанных нанозолотом в концентрациях 5, 10 и 15 мкг/мл, выростали растения, отличающиеся от контрольных (необработанных) большими показателями интенсивности роста и фотосинтеза. Кроме того, у обработанных растений было увеличено содержание белков, сахаров и хлорофиллов в листьях, а также число тилакоидов в хлоропластах [48]. Опираясь на данные концентрационного теста, авторы исследования рекомендуют прайминг семян ЗНЧ в концентрации 10 мкг/мл как доступный метод стимуляции роста и развития растений [48]. В опытах на горчице с использованием концентраций ЗНЧ 10, 25, 50 и 100 мкг/мл показано, что именно нанозолото в концентрации 10 мкг/мл максимально снижает содержание МДА и  $H_2O_2$  в листьях, то есть уменьшает риски окислительного стресса [66]. В экспериментах, проведенных на горчице и *Arabidopsis*, установлено, что ЗНЧ в концентрации 10 мкг/мл вызывали не только максимально выраженные физиологические эффекты, но и значительное (до трех раз) увеличение урожая семян у растений [66, 68]. В других работах были рекомендованы более высокие (50 мкг/мл) или низкие концентрации (1 мкг/мл) нанозолота как максимально стимулирующие рост растений [61, 69]. Безусловно, исследования в этом направлении представляются перспективными для современной науки и сельского хозяйства и должны быть продолжены.

Еще одним важным направлением в современной физиологии растений является поиск адаптогенов, увеличивающих стрессоустойчивость. Основной задачей ученых, работающих в данном направ-

лении, является поиск адаптогенов, не только позволяющих растениям противостоять неблагоприятным условиям среды, но и способствующих более полной реализации генетического потенциала без особых для сельского хозяйства потерь. В этом плане использование ЗНЧ видится достаточно актуальным.

С одной стороны, ЗНЧ способны изменять интенсивность таких важных процессов в растительном организме, как рост и фотосинтез. Как известно, именно баланс между ростом и фотосинтезом обеспечивает выживаемость и устойчивость растений в неблагоприятных условиях среды. С другой стороны, важнейшим неспецифическим механизмом защиты растений от стрессоров разной природы является активность АОС, на которую также влияют ЗНЧ. Кроме того, ЗНЧ могут снижать риски окислительного стресса, выступая в качестве фотопротекторов. Важным фактом являются данные о влиянии ЗНЧ на изменения экспрессии генов, необходимых для функционирования растений как в оптимальных, так и в неблагоприятных условиях. Отметим, что такого рода данные получены и с использованием наночастиц других металлов. Например, наночастицы серебра изменяют экспрессию генов, кодирующих ферменты АОС [84, 85], а наночастицы оксида титана усиливают экспрессию ряда генов, кодирующих белки и ферменты ФСА [86].

Приведенные в настоящем обзоре данные литературы позволяют надеяться, что ЗНЧ могут использоваться как адаптогены, усиливающие устойчивость растений к стрессам. Так, при использовании наночастиц других металлов показано, что у растений нута, выращенных из семян, обработанных наночастицами оксида титана, в условиях закалывания при 4°C был снижен уровень пероксида водорода в листьях (по сравнению с необработанными растениями), повышена активность ферментов рибулозобисфосфаткарбоксилазы и фосфоенолпируваткарбоксикиназы, а также увеличены уровни экспрессии генов, кодирующих эти ферменты и белки светособирающего комплекса [86–89]. Авторы считают, что наночастицы оксида титана в концентрации 5 мкг/мл защищают растения от окислительного стресса в условиях действия низкой температуры и рекомендуют их для повышения холодоустойчивости растений. В опытах на томате показано, что наночастицы оксида титана поддерживают работу ФСА в условиях высокотемпературного стресса [90]. Негативные эффекты низкой и высокой температуры на растения томата нивелировали наночастицы селена [91], а применение наночастиц оксида цинка увеличивали солеустойчивость люпина [92]. В экспериментах на пшенице и томате показано, что обработка наночастицами серебра повышает солеустойчивость растений [93] и изменяет

экспрессию генов стрессового ответа на солевой стресс [94].

Таким образом, уже ведутся исследования возможного участия наночастиц разных металлов в моделировании стрессоустойчивости растений, и, на наш взгляд, ЗНЧ необходимо подробно изучать в этом направлении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наночастицы золота относятся к уникальным структурам, дальнейшее изучение которых может иметь большое значение для физиологии растений и сельского хозяйства. Во-первых, благодаря особым физическим и химическим свойствам, ЗНЧ способны проникать в растительный организм через семена, корневую систему или листья. Кроме того, ЗНЧ достаточно легко передвигаются внутри растений и накапливаются в их клетках и тканях. В отличие от наночастиц других металлов, ЗНЧ чаще всего (если речь идет о невысоких концентрациях) стимулируют рост и развитие растений. Доступность методов химического синтеза ЗНЧ, а также влияние ЗНЧ на ряд физиологических процессов растений позволяют предложить их для дальнейших исследований в качестве стимуляторов роста и развития. При проведении исследований в этом направлении необходимо принимать во внимание все возможные факторы, определяющие ответные реакции растений, а именно: размеры частиц, их форму, химические свойства, концентрации используемых коллоидов, способ внесения частиц, длительность экспозиции, особенности объекта.

Учитывая неблагоприятные природные условия на большей части нашей страны, а также темпы роста антропогенной нагрузки в XXI веке, особую роль приобретает проблема поиска адаптогенов, усиливающих устойчивость растений к стрессам. Опираясь на данные литературы о влиянии нанозолота и других металлических наночастиц на растения, логично апробировать ЗНЧ в исследованиях, где будет выявлена их роль как адаптогенов. Такого рода исследования существенно расширят представления об адаптационном потенциале растений, феномене устойчивости и возможностях использования нанотехнологий в современной науке, в частности в физиологии растений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-04-00469.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Niemeyer C.M., Mirkin C.A.* Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives. Weinheim: Wiley, 2004. 491 p.
2. *Hossain Z., Mustafa G., Komatsu S.* Plant responses to nanoparticle stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 26644. <https://doi.org/10.3390/ijms161125980>
3. *Saranya S., Aswani R., Remakanthan A., Radhakrishnan E.K.* Nanotechnology in Agriculture // *Nanotechnology for Agriculture: Advances for Sustainable Agriculture* / Eds. Panpatte D.G., Jhala Y.K. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2019. P. 1.
4. *Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.-J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L.* Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 372. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
5. *Андрусихина И.Н.* Наночастицы металлов: способы получения, физико-химические свойства, методы исследования и оценка токсичности // *Украинский журнал современных проблем токсикологии*. 2011. № 3. С. 5.
6. *Dykman L., Khlebtsov N.* Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // *Chem. Soc. Rev.* 2012. V. 41. P. 2256.
7. *Husen A., Siddiqi K.S.* Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application // *Nanoscale Res. Lett.* 2014. V. 9: 229. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-229>
8. *Diita A., Arshad M., Ibrahim M.* Nanoparticles in sustainable agricultural crop production: applications and perspectives // *Nanotechnology and plant sciences: Nanoparticles and their impact on plants* / Eds. Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Mohammad F. N.Y.: Springer, 2015. P. 55.
9. *Thul S.T., Sarangi B.K.* Implications of nanotechnology on plant productivity and its rhizospheric environment // *Nanotechnology and plant sciences: Nanoparticles and their impact on plants* / Eds. Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Mohammad F. N.Y.: Springer, 2015. P. 37.
10. *Rai P.K., Kumar V., Lee S., Raza N., Kim K.-H., Ok Y.S., Tsang D.C.W.* Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture // *Environ. Int.* 2018. V. 119. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.012>
11. *Elemike E., Uzoh I.M., Onwudiwe D.C., Babalola O.O.* The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. 499. <https://doi.org/10.3390/app9030499>
12. *Masarovičová E., Kráľová K.* Metal nanoparticles and plants // *Ecol. Chem. Eng. S.* 2013. V. 20. P. 9. <https://doi.org/10.2478/eces-2013-0001>
13. *Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L.* Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 3485. <https://doi.org/10.1021/jf104517j>
14. *Unrine J.M., Shoults-Wilson W.A., Zhurbich O., Bertsch P.M., Tsyusko O.V.* Trophic transfer of Au nanoparticles from soil along a simulated terrestrial food chain // *Environ. Sci. Technol.* 2012. V. 46. P. 9753. <https://doi.org/10.1021/es3025325>
15. *Siddiqi Kh.S., Husen A.* Engineered gold nanoparticles and plant adaptation potential // *Nanoscale Res. Lett.* 2016. V. 11: 400. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1607-2>
16. *Judy J.D., Unrine J.M., Bertsch P.M.* Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. P. 776. <https://doi.org/10.1021/es103031a>
17. *Rizwan M., Ali Sh., Qayyum M.F., Ok Y.S., Adrees M., Ibrahim M., Zia-ur-Rehman M., Farid M., Abbas F.* Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review // *J. Hazard. Mater.* 2016. V. 322. P. 2. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.061>
18. *Gunjan B., Zaidi M.G.H., Sandeep A.* Impact of gold nanoparticles on physiological and biochemical characteristics of *Brassica juncea* // *J. Plant Biochem. Physiol.* 2014. V. 2. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000133>
19. *Mura S., Greppi G., Irudayaraj J.* Latest developments of nanotoxicology in plants // *Nanotechnology and plant sciences: Nanoparticles and their impact on plants* / Eds. Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Mohammad F. N.Y.: Springer, 2015. P. 125.
20. *Das S., Debnath N., Pradhan S., Goswami A.* Enhancement of photon absorption in the light-harvesting complex of isolated chloroplast in the presence of plasmonic gold nanosol – a nanobionic approach towards photosynthesis and plant primary growth augmentation // *Gold Bull.* 2017. V. 50. P. 247. <https://doi.org/10.1007/s13404-017-0214-z>
21. *Avellan A., Yun J., Zhang Y., Spielman-Sun E., Unrine J.M., Thieme J., Li J., Lombi E., Bland G., Lowry G.V.* Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation and leaf-to-rhizosphere transport in wheat // *ACS Nano.* 2019. V. 13. P. 5291. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09781>
22. *Jampiek J., Kralová K.* Beneficial effects of metal- and metalloid-based nanoparticles on crop production // *Nanotechnology for Agriculture: Advances for Sustainable Agriculture* / Eds. Panpatte D.G., Jhala Y.K. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2019. P. 161.
23. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Соколов О.И., Плотников В.К., Репко Н.В., Салфетников А.А.* Взаимодействие наночастиц золота, серебра и магния с растительными объектами // *Научный журнал КубГАУ*. 2016. № 6. С. 675.
24. *Дыкман Л.А., Щеголев С.Ю.* Взаимодействие растений с наночастицами благородных металлов // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Т. 52. С. 13. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.1.13rus>
25. *Dykman L.A., Shchyogolev S.Y.* The effect of gold and silver nanoparticles on plant growth and development // *Metal Nanoparticles: Properties, synthesis and applications* / Eds. Saylor Y., Irby V. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2018. P. 263.

26. *Alkilany A.M., Murphy C.J.* Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? // *J. Nanopart. Res.* 2010. V. 12. P. 2313. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
27. *Khlebtsov N.G., Dykman L.A.* Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of *in vitro* and *in vivo* studies // *Chem. Soc. Rev.* 2011. V. 40. P. 1647. <https://doi.org/10.1039/c0cs00018c>
28. *Хлебцов Н.Г.* Оптика и биофотоника частиц с плазмонным резонансом // *Квантовая электроника.* 2008. № 6. С. 504.
29. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г.* Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. Москва: Наука, 2008. 319 с.
30. *Kelly K.L., Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C.* The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V. 107. P. 668. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>
31. *Falco W.F., Botero E.R., Falczo E.A., Santiago E.F., Bagnato V.S., Caires A.R.L.* *In vivo* observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2011. V. 225. P. 65. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.09.027>
32. *Torres R., Diz V., Lagorio M.G.* Effects of gold nanoparticles on the photophysical and photosynthetic parameters of leaves and chloroplasts // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018. V. 17. P. 505. <https://doi.org/10.1039/C8PP00067K>
33. *Mezqacasa A.V., Queiroz A.M., Graciano D.E., Pontes M.S., Santiago E.F., Oliveira I.P., Lopez A.J., Casagrande G.A., Scherer M.D., dos Reis D.D., Oliveira S.L., Caires A.R.L.* Effects of gold nanoparticles on photophysical behaviour of chlorophyll and pheophytin // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2020. V. 389: 112252. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.112252>
34. *Li X., Sun H., Mao X., Lao Y., Chen F.* Enhanced photosynthesis of carotenoids in microalgae driven by light-harvesting gold nanoparticles // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020. V. 8. P. 7600. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00315>
35. *Barazzouk S., Bekalé L., Kamat P.V., Hotchandani S.* Enhanced photostability of chlorophyll-*a* using gold nanoparticles as an efficient photoprotector // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. P. 25316. <https://doi.org/10.1039/C2JM33681B>
36. *Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г.* Методы синтеза наночастиц с плазмонным резонансом. Саратов: СГУ им. Н.Г. Чернышевского, 2009. 35 с.
37. *Дыкман Л., Khlebtsov N.* Gold nanoparticles in biomedical applications. Boca Raton: CRC Press, 2017. 332 p.
38. *Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г.* Методы химического синтеза коллоидного золота // *Успехи химии.* 2019. Т. 88. С. 229. <https://doi.org/10.1070/RCR4843>
39. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci.* 1973. V. 241: 035012. P. 20.
40. *Mittal A.K., Chisti Y., Banerjee U.C.* Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 346. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
41. *Makarov V.V., Love A.J., Sinitsyna O.V., Makarova S.S., Yaminsky I.V., Taliansky M.E., Kalinina I.N.O.* “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 35.
42. *Чумаков Д.С., Соколов А.О., Богатырев В.А., Соколов О.И., Селиванов Н.Ю., Дыкман Л.А.* “Зеленый” синтез наночастиц золота с использованием культур клеток *Arabidopsis thaliana* и *Dunaliella salina* // *Российские нанотехнологии.* 2018. Т. 13. С. 85.
43. *Beattie I.R., Haverkamp R.G.* Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal // *Metalomics.* 2011. V. 3. P. 628. <https://doi.org/10.1039/c1mt00044f>
44. *Taylor A.F., Rylott E.L., Anderson Ch.W.N., Bruce N.C.* Investigating the toxicity, uptake, nanoparticle formation and genetic response of plants to gold // *PLoS One.* 2014. V. 9: e93793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093793>
45. *Joshi A., Nayyar A., Dharamvir K., Verma G.* Detection of gold nanoparticles signal inside wheat (*Triticum aestivum* L.) and oats (*Avena sativa*) seedlings // *AIP Conference Proceedings.* 2018. V. 1953: 030058. <https://doi.org/10.1063/1.5032393>
46. *Liu H., Zhang X., Xu Z., Wang Y., Ke Y., Jiang Z., Yuan Z., Li H.* Role of polyphenols in plant-mediated synthesis of gold nanoparticles: identification of active components and their functional mechanism // *Nanotechnology.* 2020. V. 31: 415601. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab9e25>
47. *Ghosh K., Satapathy S.S., Ghosh S., Jauhari S., Kundu C.N., Si S.* Green chemistry approach for gold nanoparticles synthesis using plant extracts: a potential material towards catalysis and biology // *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 2020. V. 11: 115. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/ab9f2b>
48. *Mahakham W., Theerakulpisut P., Maensiri S., Phumying S., Sarmah A.K.* Environmentally benign synthesis of phytochemicals-capped gold nanoparticles as nanopriming agent for promoting maize seed germination // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 573. P. 1089. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.120>
49. *Горелкин П., Калинина Н., Лав А., Макаров В., Тальянский М., Яминский И.* Синтез наночастиц с использованием растений // *Наноиндустрия.* 2012. № 7. С. 16.
50. *Shacklette H.T., Lakin H.W., Hubert A.E., Curtin G.C.* Absorption of gold by plants. Washington: United States Government Printing Office, 1970. 28 p.
51. *Chen H.* Metal based nanoparticles in agricultural system: behavior, transport, and interaction with plants // *Chem. Spec. Bioavailab.* 2018. V. 30. P. 123. <https://doi.org/10.1080/09542299.2018.1520050>
52. *Khan M.R., Adam V., Rizvi T.F., Zhang B., Ahamad F., Josko I., Zhu Y., Yang M., Mao C.* Nanoparticle-plant interactions: two-way traffic // *Small.* 2019. V. 15: e1901794. <https://doi.org/10.1002/sml.201901794>

53. Banerjee K., Pramanik P., Maity A., Joshi D.C., Wani S.H., Krishnan P. Methods of using nanomaterials to plant systems and their delivery to plants (mode of entry, uptake, translocation, accumulation, biotransformation and barriers) // *Advances in Phytonanotechnology. From Synthesis to Application* / Eds. Ghorbanpour M., Wani S.H. Cambridge: Academic Press, 2019. P. 123.
54. Lv J., Christie P., Zhang S. Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges // *Environ. Sci.: Nano*. 2019. V. 6. P. 41. <https://doi.org/10.1039/C8EN00645H>
55. Raliya R., Franke Ch., Chavalmane S., Nair R., Reed N., Pratim B. Quantitative understanding of nanoparticle uptake in watermelon plants // *Front. Plant Sci*. 2016. V. 7: 1288. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01288>
56. Sabo-Attwood T., Unrane J.M., Stone J.W., Murphy C.J., Ghoshroy S., Blom D., Bertsch P.M., Newman L.A. Uptake, distribution and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings // *Nanotoxicology*. 2012. V. 6. P. 353. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.579631>
57. Wan Y., Li J., Ren H., Huang J., Yuan H. Physiological investigation of gold nanorods toward watermelon // *J. Nanosci. Nanotechnol*. 2014. V. 14. P. 6089. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8853>
58. Wang P., Lombi E., Zhao F.-J., Kopittke P.M. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences // *Trends Plant Sci*. 2016. V. 21. P. 699. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
59. Tripathi D.K., Gaur S., Singh S., Singh S., Pandey R., Singh V.P., Sharma N.C., Prasad S.M., Dubey N.K., Chauhan D.K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity // *Plant Physiol. Biochem*. 2017. V. 110. P. 2. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>
60. Larue C., Castillo-Michel H., Sobanska S., Cécillon L., Bureau S., Barthés V., Ouerdane L., Carrière M., Sarret G. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation // *J. Hazard. Mater*. 2014. V. 264. P. 98. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>
61. Parveen A., Mazhari B.B.Z., Rao S. Impact of bio-nanogold on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum* // *Enzyme Microb. Technol*. 2016. V. 95. P. 107. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.005>
62. Onelli E., Prescianotto-Baschong C., Caccianiga M., Moscatelli A. Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold // *J. Exp. Bot*. 2008. V. 59. P. 3051. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern154>
63. Li H., Ye X., Guo X., Geng Zh., Wang G. Effects of surface ligands on the uptake and transport of gold nanoparticles in rice and tomato // *J. Hazard. Mater*. 2016. V. 314. P. 188. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.043>
64. Moscatelli A., Ciampolini F., Rodighiero S., Onelli E., Cresti M., Santo N., Idilli A. Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold // *J. Cell Sci*. 2007. V. 120. P. 3804. <https://doi.org/10.1242/jcs.012138>
65. Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sánchez A., Puntès V. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles // *Chemosphere*. 2009. V.75. P. 850. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.078>
66. Arora S., Sharma P., Kumar S., Nayan R., Khanna P.K., Zaidi M.G.H. Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea* // *Plant Growth Regul*. 2012. V. 66. P. 303. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9649-z>
67. Hawthorne J., Musante C., Sinha S.K., White J.C. Accumulation and phytotoxicity of engineered nanoparticles to *Cucurbita pepo* // *Int. J. Phytoremediation*. 2012. V. 14. P. 429. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.620903>
68. Kumar V., Guleria P., Kumar V., Yadav S.K. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana* // *Sci. Total Environ*. 2013. V. 461–462. P. 462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.018>
69. Feichtmeier N.S., Walther P., Leopold K. Uptake, effects, and regeneration of barley plants exposed to gold nanoparticles // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2015. V. 22. P. 8549. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4015-0>
70. Плотников В.К., Салфетников А.А., Голубев А.А., Дыкман Л.А. Влияние наночастиц золота на прорастание семян озимого ячменя // *Научный журнал КубГАУ*. 2017. № 127. С. 295. <http://ej.kubagro.ru/2017/03/pdf/18.pdf>
71. Ndeh N.T., Maensiri S., Maensiri D. The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots // *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol*. 2017. V. 8: 035008. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa724a>
72. Gopinath K., Gowri S., Karthika V., Arumugam A. Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba* // *J. Nanostruc. Chem*. 2014. V. 4. <https://doi.org/10.1007/s40097-014-0115-0>
73. Ma X., Quah B. Effects of surface charge on the fate and phytotoxicity of gold nanoparticles to *Phaseolus vulgaris* // *J. Food Chem. Nanotechnol*. 2016. V. 2. P. 57. <https://doi.org/10.17756/jfcn.2016-011>
74. Zaka M., Abbasi B.H., Rahman L.U., Shah A., Zia M. Synthesis and characterisation of metal nanoparticles and their effects on seed germination and seedling growth in commercially important *Eruca sativa* // *IET Nanobiotechnol*. 2016. V. 10. P. 134. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0039>
75. Jadczyk P., Kulpa D., Bihun M., Przewodowski W. Positive effect of AgNPs and AuNPs in *in vitro* cultures of *Lavandula angustifolia* Mill. // *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 2019. V. 139. P. 191. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01656-w>
76. Fincheira P., Tortella G., Duran N., Seabra A.B., Rubilar O. Current applications of nanotechnology to develop



- plant growth inducer agents as an innovation strategy // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. P. 15.  
https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1681931
77. *Bodale I., Teliban G., Ursu E., Stoleru V., Cazacu A.* The influence of gold nanoparticles on germination of carrot seeds // Proc. 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019. Sofia, 2019. V. 19. P. 451.  
https://doi.org/10.5593/sgem2019/6.1/S24.059
78. *Tymoszyk A., Miler N.* Silver and gold nanoparticles impact on *in vitro* adventitious organogenesis in chrysanthemum, gerbera and Cape Primrose // Sci. Hortic. 2019. V. 257: 108766.  
https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108766
79. *Venzhik Yu.V., Shchyogolev S.Yu., Dykman L.A.* Ultrastructural reorganization of chloroplasts during plant adaptation to abiotic stress factors // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 850.  
https://doi.org/10.1134/S102144371906013X
80. *Hussain M., Raja N.I., Mashwani Z.-U.-R., Iqbal M., Sabir S., Yasmeen F.* *In vitro* seed germination and biochemical profiling of *Artemisia absinthium* exposed to various metallic nanoparticles // 3 Biotech. 2017. V. 7: 101.  
https://doi.org/10.1007/s13205-017-0741-6
81. *Milewska-Hendel A., Witek W., Rypień A., Zubko M., Baranski R., Stróż D., Kurczyńska E.U.* The development of a hairless phenotype in barley roots treated with gold nanoparticles is accompanied by changes in the symplasmic communication // Sci. Rep. 2019. V. 9: 4724.  
https://doi.org/10.1038/s41598-019-41164-7
82. *Rajeshwari A., Suresh S., Chandrasekaran N., Mukherjee A.* Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 24000.  
https://doi.org/10.1039/c6ra04712b
83. *Debnath P., Mondal A., Hajra A., Das C., Mondal N.K.* Cytogenetic effects of silver and gold nanoparticles on *Allium cepa* roots // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2018. V. 16. P. 519.  
https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.007
84. *Qian H., Peng X., Han X., Ren J., Sun L., Fu Zh.* Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana* // J. Environ. Sci. 2013. V. 25. P. 1947.  
https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5
85. *Gupta S.D., Agarwal A., Pradhan S.* Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: An insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns // Ecotox. Environ. Saf. 2018. V. 161. P. 624.  
https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.023
86. *Hasanpour H., Maali-Amiri R., Zeinali H.* Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on metabolic limitations to photosynthesis under cold in chickpea // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 779.  
https://doi.org/10.1134/S1021443715060096
87. *Mohammadi R., Maali-Amiri R., Abbasi A.* Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on chickpea response to cold stress // Biol. Trace Elem. Res. 2013. V. 152. P. 403.  
https://doi.org/10.1007/s12011-013-9631-x
88. *Mohammadi R., Maali-Amiri R., Mantri N.* Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 768.  
https://doi.org/10.1134/S1021443714050124
89. *Jalil S.U., Ansari M.I.* Nanoparticles and abiotic stress tolerance in plants: synthesis, action, and signaling mechanisms // Plant signaling molecule: role and regulation under stressful environments / Eds. Khan M.I.R., Reddy P.S., Ferrante A., Khan N.A. Chennai: Elsevier, 2019. P. 549.
90. *Qi M., Liu Yu., Li T.* Nano-TiO<sub>2</sub> improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress // Biol. Trace Elem. Res. 2013. V. 156. P. 323.  
https://doi.org/10.1007/s12011-013-9833-2
91. *Haghighi M., Abolghasemi R., Teixeira da Silva J.A.* Low and high temperature stress affect the growth characteristics of tomato in hydroponic culture with Se and nano-Se amendment // Sci. Hortic. 2014. V. 178. P. 231.  
https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.006
92. *Latef A.A., Alhmad M.F., Abdelfattah K.E.* The possible roles of priming with ZnO nanoparticles in mitigation of salinity stress in lupine (*Lupinus termis*) plants // J. Plant Growth Regul. 2017. V. 36. P. 60.  
https://doi.org/10.1007/s00344-016-9618-x
93. *Mohamed A.K.S.H., Qayyum M.F., Abdel-Hadi Ah.M., Rehman R.A., Ali Sh., Rizwan M.* Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat // Arch. Agron. Soil Sci. 2017. V. 63. P. 1736.  
https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1300256
94. *Almutairi Z.M.* Influence of silver nano-particles on the salt resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) during germination // Int. J. Agric. Biol. 2016. V. 18. P. 449.  
https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0114

УДК 581.1

## ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ У ДВУХ ФОРМ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

© 2021 г. Ю. Л. Мощенская<sup>а</sup>, Н. А. Галибина<sup>а</sup>, \*, Т. В. Тарелкина<sup>а</sup>,  
К. М. Никерова<sup>а</sup>, О. В. Чирва<sup>а</sup>, Л. Л. Новицкая<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт леса — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра  
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: galibina@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 28.07.2020 г.

После доработки 06.08.2020 г.

Принята к публикации 06.08.2020 г.

Изучили пригодность пяти генов — *GAPDH1*, *Actin1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*, *18SpPНК* для нормирования данных экспрессии целевых генов методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. С целью обнаружения стабильно экспрессирующихся референсных генов использовали листья и ткани ствола у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Стабильность экспрессии потенциальных референсных генов оценивали с помощью двух пакетов программ NormFinder и BestKeeper. С использованием как стабильно, так и менее стабильно экспрессирующихся референсных генов сравнили экспрессию гена, кодирующего инвертазу клеточной стенки в тканях ствола деревьев *Betula pendula* Roth в период активного камбиального роста. Показано, что лучшие результаты получают при использовании комбинация двух генов *GAPDH1* и *Ef1a(1)*.

**Ключевые слова:** *Betula pendula* Roth, количественный анализ экспрессии, 18S рНК, актин, фактор элонгации 1а, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

**DOI:** 10.31857/S0015330321020111

### ВВЕДЕНИЕ

Береза повислая (*Betula pendula* Roth), как пионерная порода бореальных лесов Евразии, представляет собой важный источник древесного сырья в Северной Европе [1]. Ценность березы — в ее незаменимости для производства натуральных отделочных материалов (фанера), технологичности производства из нее целлюлозы и гораздо большей, чем у сосны и ели, скорости наращивания древесной массы. Помимо практической значимости, данный вид представляет собой уникальный объект для познания механизмов ксилогенеза и флоэмогенеза, поскольку включает формы, существенно отличающиеся по текстуре древесины. У обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) образуется типичная для вида прямослойная древесина, у карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) в результате нарушения дифференцировки камбиальных инициалей локально формируется anomальная (узорчатая) древесина [2]. Публикация полного генома *B. pendula* [1] открыла широкие возможности для изучения профиля экспрессии генов в различных органах и тканях и установления их функции [3–7].

По сравнению с другими методами анализа экспрессии генов, метод обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) является предпочтительным в связи с его высокой чувствительностью, специфичностью и меньшим временем, затрачиваемым на эксперимент [8]. Для объективной оценки уровней экспрессии целевых генов необходимо нормирование результатов qRT-PCR по отношению к референсным генам. Пригодный для нормализации референсный ген должен иметь стабильную экспрессию в различных тканях и в различных экспериментальных условиях [9–13]. В качестве референсных, как правило, выбирают гены, участвующие в поддержании клеток, регулирующие основные метаболические функции/пути, такие как синтез компонентов цитоскелета, гликолитический путь, синтез субъединиц рибосом, синтез факторов элонгации, свертывание белков и деградация белков [13]. Вариабельность экспрессии любых референсных генов не является постоянной и в различных экспериментальных условиях может сильно изменяться, поэтому выбор генов для нормализации данных является необходимым этапом эксперимента, и даже применение широ-

ко используемых в современных исследованиях референсных генов требует предварительной оценки их стабильности [8, 13–16]. Подбор подходящих референсных генов для изучения экспрессии генов-интереса на растениях разных форм березы повислой (*B. pendula* var. *pendula* и var. *carelica*) ранее не проводился.

С целью выявления референсных генов, пригодных для нормирования уровня транскриптов, мы проанализировали стабильность экспрессии генов *ACT1*, *18S pPHK*, *GAPDH1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)* в разных тканях (лист, флоэма, ксилема) у двух форм березы повислой, различающихся по структуре образующейся древесины.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал и отбор образцов.** Объектами исследования были 13–14-летние деревья *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Деревья *B. pendula* var. *pendula* (“обычная” береза) имели типичную для вида прямослойную древесину со слабо выраженной текстурой. Поскольку при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве карельской березы появляются особи, как с узорчатой, так и безузорчатой текстурой древесины, среди деревьев карельской березы подбирали экземпляры (1) с высокой степенью узорчатости древесины (узорчатые растения) и (2) растения, у которых признаки аномального строения древесины отсутствовали (безузорчатые растения). Растения выращены из семян, полученных от контролируемого опыления плюсовых деревьев (Forelia OY, Финляндия). Число растений в каждой группе составило 3 штуки. Все растения произрастали на Агробиологической станции КарНЦ РАН в 2 км от Петрозаводска (61°45′ с.ш., 34°20′ в.д.).

Для анализа отбирали листья с удлиненных побегов, ткани ствола (флоэма и ксилема). Образцы флоэмы и ксилемы отбирали на высоте 1.3 м от поверхности земли. У карельской березы выбирали участки с наибольшей степенью проявления структурных аномалий проводящих тканей. Для отбора образцов на стволе вырезали окошки 2 × 6 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины бритвенным лезвием соскабливали тонкий слой, куда входили дифференцирующиеся клетки ксилемы и наружные слои прироста ксилемы текущего года. С внутренней поверхности коры препарировали комплекс тканей, включающий камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. В дальнейшем эти ткани обозначены как “флоэма”. Весь растительный материал замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при –80°C. Отбор образцов тканей ствола контролировали под световым микроскопом. Анализ срезов показал, что для всех исследу-

емых растений был характерен активный камбиальный рост.

**Выделение и очистка суммарной РНК, синтез кДНК.** Для выделения суммарной РНК навеску растительной ткани (50–100 мг) растирали в жидком азоте. Процедуру выделения проводили с использованием двух лизирующих буферов (на основе цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) и додецилсульфата натрия (ДДС)) и хлороформ-изоамиловой смеси (24 : 1) по методике, описанной М. Су с соавт. [18], дополнительно лизат ткани обрабатывали ингибитором РНКаз для предотвращения возможной деградации проб и ДНКазой (“Синтол”, Россия) для избавления от примеси геномной ДНК. Соотношение ткань/буфер составило 1 : 10. Состав экстракционного ЦТАБ буфера: 100 мМ Tris–HCl (pH 8.0); 25 мМ ЭДТА, 2 М NaCl, 2% СТАВ, 2% PVP, 2% меркаптэтанол (добавляют перед использованием); экстракционного ДДС буфера: 10 мМ Tris–HCl, 1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, 0.5% ДДС.

Осаждение РНК проводили 100% изопропанолом. Осадок РНК растворяли в необходимом объеме свободной от РНКаз воды. Целостность полученной РНК анализировали при помощи метода электрофореза в 1% агарозном геле. Определение концентрации РНК проводили спектрофотометрически (планшетный спектрофотометр SPECTROstar NANO, “BMG Labtech”, Германия) по поглощению на длине волны 260 нм. Чистоту полученного препарата оценивали по соотношению оптических плотностей, измеренных при 230, 260 и 280 нм (A260/A280 и A260/A230). Отсутствие примесей геномной ДНК подтверждали с помощью постановки ПЦР с использованием в качестве матрицы полученного препарата РНК.

кДНК синтезировали согласно протоколу производителя, используя набор реактивов для обратной транскрипции MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 6 мкл РНК-матрицы (1 мкг), 1 мкл Oligo(dT) праймера и 1 мкл случайного праймера (Randoom (dN)10-primer) (20 мкМ), 1 мкл обратной транскриптазы (MMLV ревертазы) (100 ед.), 4 мкл 5x буфера для синтеза первой цепи кДНК (280 мМ Tris–HCl, pH 8.7; 37.5 мМ KCl; 30 мМ MgCl<sub>2</sub>), 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл DDT (20 мМ), 3 мкл стерильной, свободной от РНКаз воды. Реакцию обратной транскрипции проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (“Thermo scientific”, США).

**Поиск генов в геноме березы повислой методами биоинформатики.** В качестве референсных генов были выбраны гены рибосомной РНК 18S (*18S pPHK*), актина (*ACT1*), фактора элонгации 1a (*Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH1*) – как наиболее часто используемые для этой цели [18–20 и др.].

Поиск генов проводили в геноме березы повислой (*Betula pendula* Roth), опубликованном на портале CoGe [1]. С этой целью были получены нуклеотидные последовательности CDS и соответствующие им белковые последовательности генов *Arabidopsis thaliana* и *Populus trichocarpa* из баз данных The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (release 13, <https://www.arabidopsis.org>) и Phytozome (release 3.0, <http://www.phytozome.net/poplar>). Указанные последовательности использовали в качестве поискового запроса BLAST по геному *B. pendula* (release 1.2, <https://genomevolution.org/coge>) для выявления гомологичных последовательностей.

Предсказание структуры белков березы повислой выполняли с использованием ресурса National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA X [21]. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью алгоритма ClustalW. Филогенетическое древо было построено с использованием метода присоединения ближайшего соседа (Neighbor-Joining method), оценку достоверности кластеризации проводили методом bootstrap с 1000 повторами [22, 23]. Определение процента идентичности/сходства последовательностей выполняли с помощью ресурса EMBOSS Needle ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)).

**Подбор праймеров для qRT-PCR и их проверка.** Специфические праймеры (“Синтол”, Россия) для амплификации участков исследуемых референсных генов конструировали с помощью программного обеспечения Beacon Designer 8.21 (PREMIER Biosoft). С целью подтвердить, что получен единственный продукт реакции, проводили анализ кривой плавления, а также электрофорез продуктов количественной ПЦР в 8% акриламидном геле с окраской бромистым этидием.

**Условия количественной ПЦР в режиме реального времени.** Амплификацию образцов проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (“Thermo scientific”, США), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green – qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия). ПЦР-РВ проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 5 мкл qPCRmix-HS SYBR, по 1 мкл прямого и обратного праймера (0.4 мкМ) (“Синтол”, Россия), 2 мкл матрицы кДНК, 16 мкл деионизированной, свободной от нуклеаз воды. Конечное содержание кДНК в реакционной среде для всех образцов составляло 100 нг, согласно рекомендации протокола производителя. ПЦР проводили при следующих условиях: 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов по 95°C в течение 15 с для денатурации, 55°C в течение 30 с для отжига и 72°C в течение 30 с для элон-

гации. Для каждой пары праймеров применяли отрицательный контроль – постановка ПЦР в отсутствие матрицы кДНК.

**Анализ стабильности экспрессии генов.** Специфичность полученных продуктов ПЦР оценивали с помощью анализа кривых плавления. Для определения эффективности (E) ПЦР проводили с каждой парой праймеров на серии 10-кратных разведений ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$ ) кДНК. Для определения значений  $C_t$  строили калибровочные кривые, используя программное обеспечение Excel, в соответствии с коэффициентами корреляции R и значениями наклона кривой (slope, k), которые можно рассчитать по калибровочным кривым значений  $C_t$  для каждого гена. Эффективность ПЦР-амплификации (E) рассчитывали по формуле  $E = (10^{(-1/k)} - 1) \times 100$ .

Поиск подходящего референсного гена проводили с помощью двух пакетов программ NormFinder и BestKeeper, анализируя стабильность экспрессии каждого претендента на эту роль. Исходные значения  $C_t$  переводили в формат, необходимый для анализа в NormFinder. Максимальный уровень экспрессии (наименьшее значение  $C_t$ ) принимали равным 1. Относительные уровни экспрессии рассчитывали, используя формулу:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , в которой  $\Delta\Delta C_t$  – это наименьшее значение  $C_t$ , вычтенное из соответствующего значения  $C_t$  для каждого гена и каждого образца. Отобранные NormFinder гены анализировали с помощью BestKeeper с учетом непретерженных значений  $C_t$  и эффективности амплификации.

**Проверка референсных генов.** С использованием потенциальных референсных генов сравнили относительную экспрессию гена *SWINI*, кодирующего изоформу апопластной инвертазы (АпИнв), в тканях ствола растений обычной березы и узорчатых растений карельской березы. Ранее было показано, что возрастные узорчатости древесины у карельской березы коррелирует с увеличением активности АпИнв [4]. Относительный уровень транскриптов генов *SWINI* (RQ) вычисляли по формуле:

$$RQ = E^{-\Delta C_t}, \text{ где } E - \text{эффективность ПЦР,} \\ \Delta C_t = C_t(\text{целевого гена}) - (\text{референсного гена}).$$

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel и PAST. На диаграммах приведены средние значения с учетом трехкратной биологической и трехкратной аналитической повторностей и их стандартные отклонения. Выборки проверялись на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни (обозначение на графиках латинскими буквами). Статистически значимыми считали различия при  $P < 0.05$ .

**Таблица 1.** Спектрофотометрические показатели качества суммарной РНК, полученной из растений двух форм *Betula pendula* Roth.

Объект	Ткань/орган	A260/A280	A260/A230
<i>Betula pendula</i> var. <i>pendula</i>	Лист	1.980 ± 0.002	2.033 ± 0.020
	Флоэма	1.968 ± 0.005	2.036 ± 0.011
	Ксилема	1.985 ± 0.006	2.022 ± 0.001
<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>	Лист	1.986 ± 0.002	2.069 ± 0.020
	Флоэма	1.972 ± 0.002	2.070 ± 0.021
	Ксилема	1.979 ± 0.003	2.057 ± 0.019

**Таблица 2.** Результаты попарного выравнивания аминокислотных последовательностей белков *B. pendula* и *A. thaliana*

ID гена, кодирующего белок <i>B. pendula</i>	Ближайший гомологичный белок <i>A. thaliana</i> (номер локуса в TAIR)	Процент идентичности аминокислотных последовательностей белков <i>B. pendula</i> и <i>A. thaliana</i>
Vpev01.c0427.g0027.m0001	Actin 1 (AT2G37620)	93.8
Vpev01.c1225.g0009.m0001	Actin 7 (AT5G09810)	98.7
Vpev01.c0556.g0017.m0001	Actin 7 (AT5G09810)	97.6
Vpev01.c0029.g0002.m0001	Actin 11 (AT3G12110)	97.1
Vpev01.c0564.g0031.m0001	Actin 11 (AT3G12110)	96.8
Vpev01.c0365.g0049.m0001	Actin 12 (AT3G46520)	97.1
Vpev01.c0052.g0178.m0001	Cytosolic GAPDH 1 (AT3G04120)	89.1
Vpev01.c1040.g0016.m0001	Cytosolic GAPDH 1 (AT3G04120)	89.4
Vpev01.c1513.g0002.m0001	Cytosolic GAPDH 1 (AT3G04120)	87.9
Vpev01.c0288.g0008.m0001	EF1a (AT1G07940)	95.3
Vpev01.c0437.g0013.m0001	EF1a (AT1G07940)	94.2
Vpev01.c0437.g0013.m0002	EF1a (AT1G07940)	94.0
Vpev01.c0437.g0018.m0001	EF1a (AT1G07940)	94.2

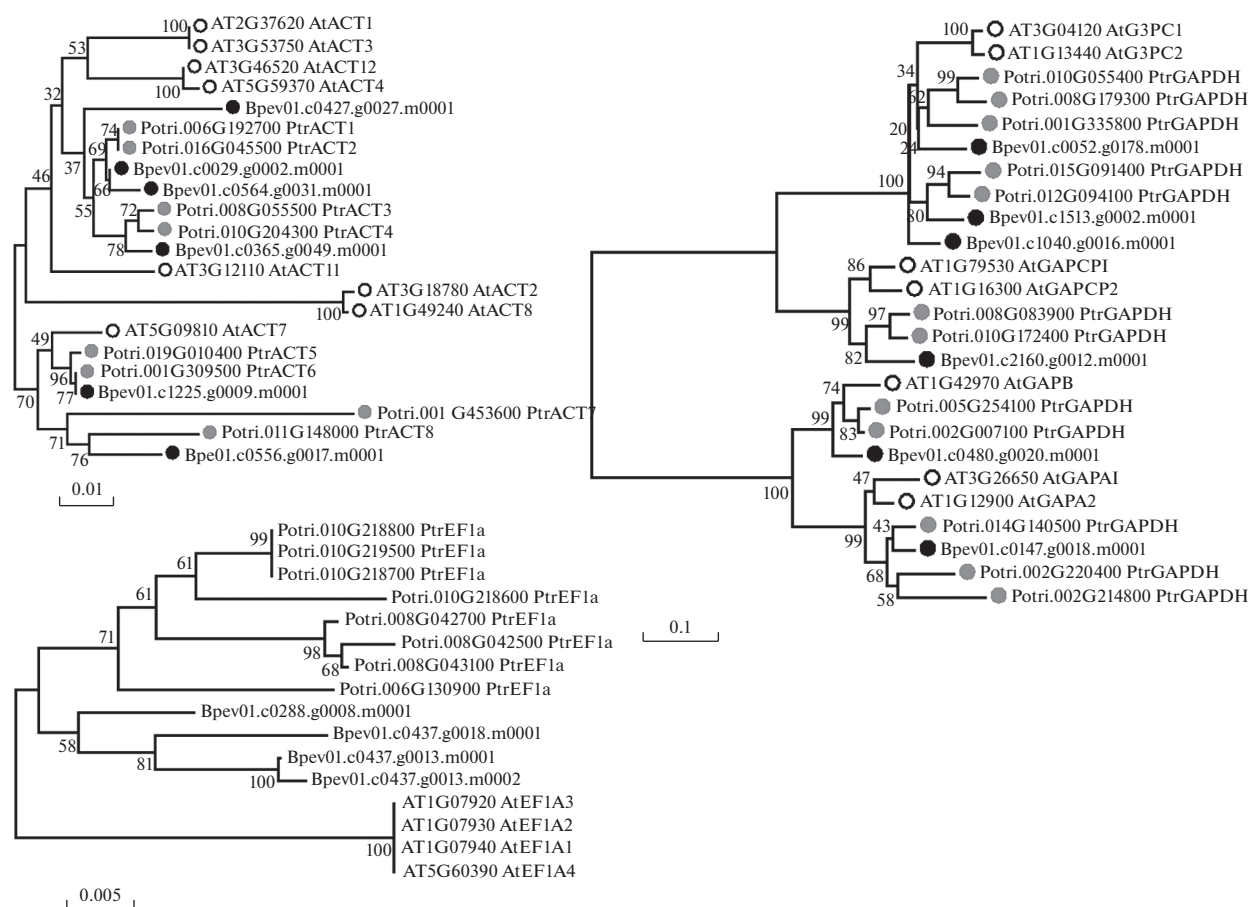
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка качества РНК. Оценка качества полученной РНК при помощи электрофореза в 1% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием позволила выявить отчетливое разделение полос 18S и 28S рРНК, что свидетельствует о хорошем качестве суммарной РНК. Отношение оптических плотностей, измеренные на длинах волн 260 и 230 нм (A260/A230), показывает уровень загрязнения препарата РНК полисахаридами и полифенолами, а их отношение при 260 и 280 нм (A260/A280) – загрязнение образца белками. Полученные нами для всех органов и тканей значения A260/A230 были выше 2, а значения A260/A280 составляли 1.97–2.0 (табл. 1), что говорит об отсутствии загрязнения препарата РНК полифенолами, полисахаридами и белками. Отсутствие примеси геномной ДНК в полученных препаратах подтверждали также постановкой ПЦР-РВ с использованием в качестве матрицы

полученной суммарной РНК, при этом не было зафиксировано появление ПЦР продукта после 40 циклов реакции.

Поиск последовательностей потенциальных референсных генов и подбор праймеров для количественной ПЦР в режиме реального времени. В геноме березы повислой нам не удалось идентифицировать последовательности, обладающие достаточно высоким уровнем сходства с последовательностями 18S рРНК других видов. В базе данных NCBI была найдена частичная последовательность 18S рРНК березы повислой (номер доступа в базе данных NCBI GU476453.1) длиной 1493 п.н., которая была использована для конструирования праймеров для количественной ПЦР [24]. На основе последовательности GU476453.1 нами были сконструированы праймеры для ПЦР-РВ, используемые в данной работе (табл. 3).

В геноме березы повислой было идентифицировано по 6 генов, кодирующих белки, гомоло-



**Рис. 1.** Филогенетические деревья, построенные на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей известных белков *Arabidopsis thaliana* (светлые точки) и *Populus trichocarpa* (серые точки) и потенциальных белков *Betula pendula* (черные точки). а – актин, б – *GAPDH*, в – *Efla*. Длина ветвей пропорциональна генетической дистанции (число замещений на сайт). Существенные значения bootstrap (процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны кластеризуются вместе) для 1000 выборок показаны в основании ветви. Рядом с названиями белков *A. thaliana* и *P. trichocarpa* указаны коды доступа в базах данных TAIR и Phytozome.

гичные актину и *GAPDH*, и 4 гена, кодирующих белки, гомологичные *Efla A. thaliana* и *P. trichocarpa* (рис. 1). Аминокислотные последовательности предсказанных белков *B. pendula* продемонстрировали высокий процент идентичности с последовательностями гомологичных белков *A. thaliana* (табл. 2). Для дальнейшего анализа были отобраны гены из каждого семейства и сконструированы специфичные пары праймеров (табл. 3). Размер продуктов количественной ПЦР для всех исследуемых генов находился в диапазоне 94–188 п.н., а температура отжига праймеров имела диапазон от 52 до 60°C.

Определение эффективности и специфичности амплификации ПЦР. Прежде чем оценивать стабильность экспрессии изучаемых референсных генов, мы установили эффективность амплификации в ходе ПЦР. Полученные значения эффективности (E) находились в диапазоне от 98.5 до 100% для всех рассмотренных генов (табл. 3). В ходе оценки специфичности ПЦР при помощи

гель-электрофореза в 8% акриламидном геле были обнаружены ампликоны ожидаемой длины и показано отсутствие димеров праймеров. При анализе кривых плавления продуктов ПЦР с каждой парой праймеров был выявлен один пик и не обнаружено неспецифических продуктов реакции (рис. 2).

Анализ стабильности экспрессии потенциальных референсных генов. Значения пороговых циклов (Ct), полученные для различных образцов, позволили выявить существенные различия в уровне транскрипции исследуемых генов (рис. 3а). Полученные для 5 генов значения Ct находились в диапазоне от 8 до 35 циклов. Ген *18S pPHK* имел самые низкие значения Ct (9.9), что говорит о наиболее высоком уровне транскрипции. Самый низкий уровень экспрессии был показан для гена *GAPDH1* (27.7).

Анализ стабильности экспрессии потенциальных референсных генов при помощи программы

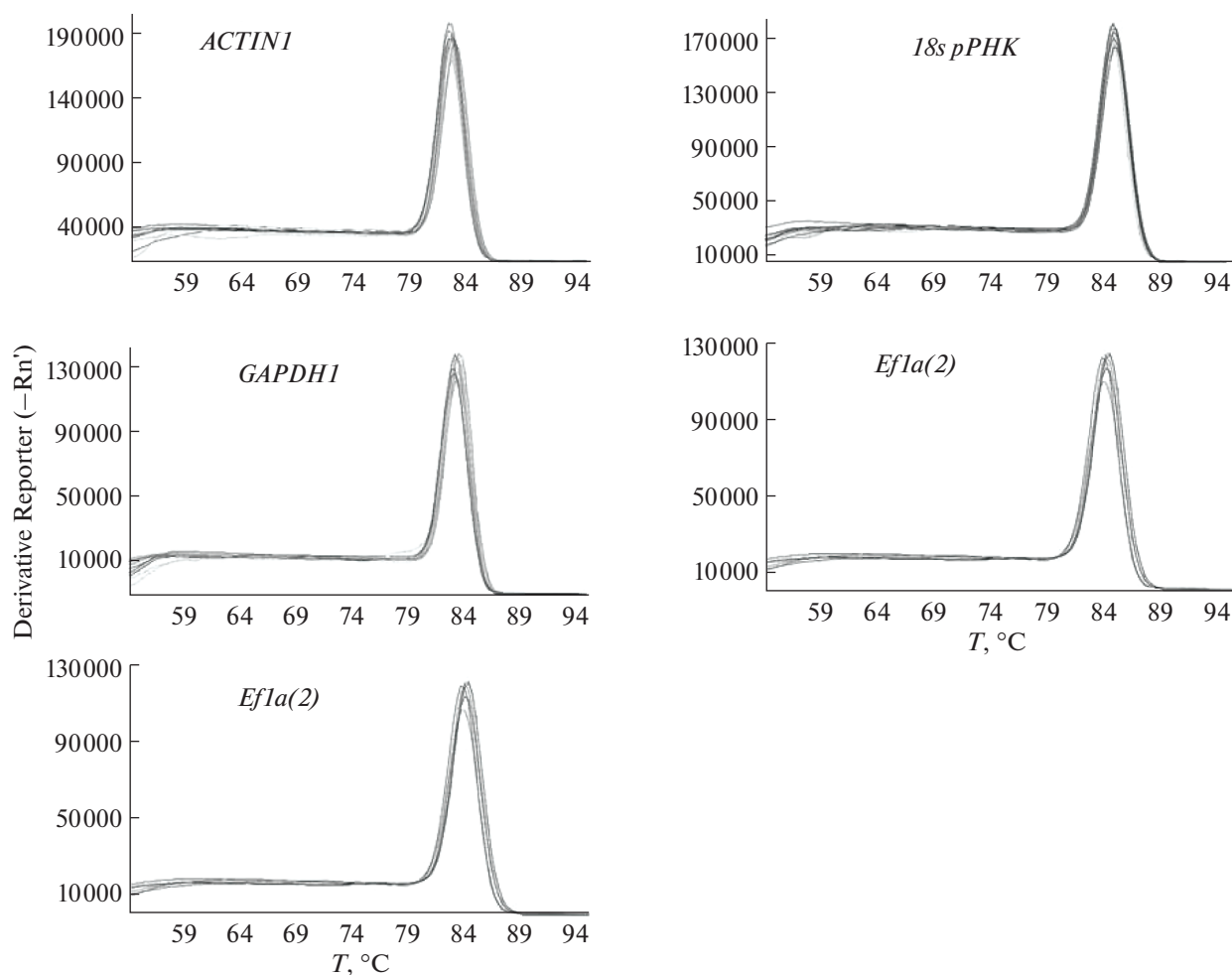
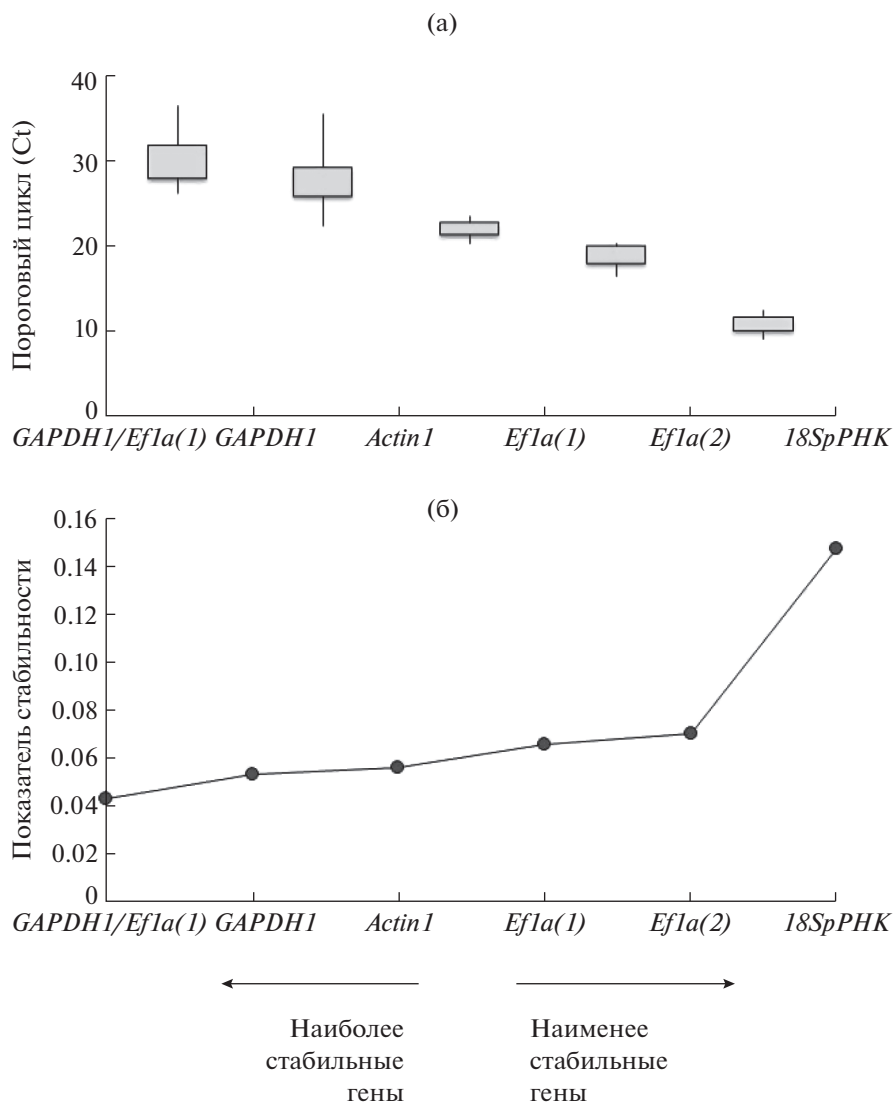


Рис. 2. Специфичность амплификации и кривые плавления продуктов ПЦР потенциальных референсных генов.

Таблица 3. Описание референсных (*18S pPHK*, *Actin1*, *Efla(1)*, *Efla(2)*, *GapDH1*) и целевого (*CWIN1*) генов.  $T_m$  – температуры плавления;  $R^2$  – коэффициент корреляции порогового цикла и логарифма концентрации ДНК матрицы

Ген	Локус/номер доступа (NCBI)	Праймер (5' → 3') (прямой / обратный)	Длина продукта (п.н.)	$T_m$ , °C	Эффективность амплификации, %	$R^2$
<i>18S pPHK</i>	GU476453.1	CTACTATGGTGGTGACGGGTGAC CGCCTGCTGCCCTTCCTTGG	94	60	98.8	0.993
<i>Actin1</i>	Bpev01.c0427.g0027	GGTGGTGAATGAGTAGCC TTCTTCCCTTATGCC	167	54	100.7	0.998
<i>Efla(1)</i>	Bpev01.c0437.g0013.m0001	TGTGCTGTTCTTATCATTGACTCC TTCTCGTACCTTGCCTTGG	145	54	98.7	0.989
<i>Efla(2)</i>	Bpev01.c0437.g0018.m0001	GCCACACCTGCCACATTGC AGCGAAAGTCTCCACCACCATAG	188	52	98.5	0.999
<i>GapDH1</i>	Bpev01.c1040.g0016.m0001	AGAATACAAGCCAGAАСТСААС CTCTACCACCTCTCCAATCC	188	54	98.7	0.984
<i>CWIN1</i>	Bpev01.c0333.g0031.m0001	AGTGCCCCGATTTCTTCCCTG GTCCACCTGCCCTTGTCCG	181	55	99.0	0.990



**Рис. 3.** Значения Ct референсных генов (а) и стабильность их экспрессии, определенная с помощью программы NormFinder (б).

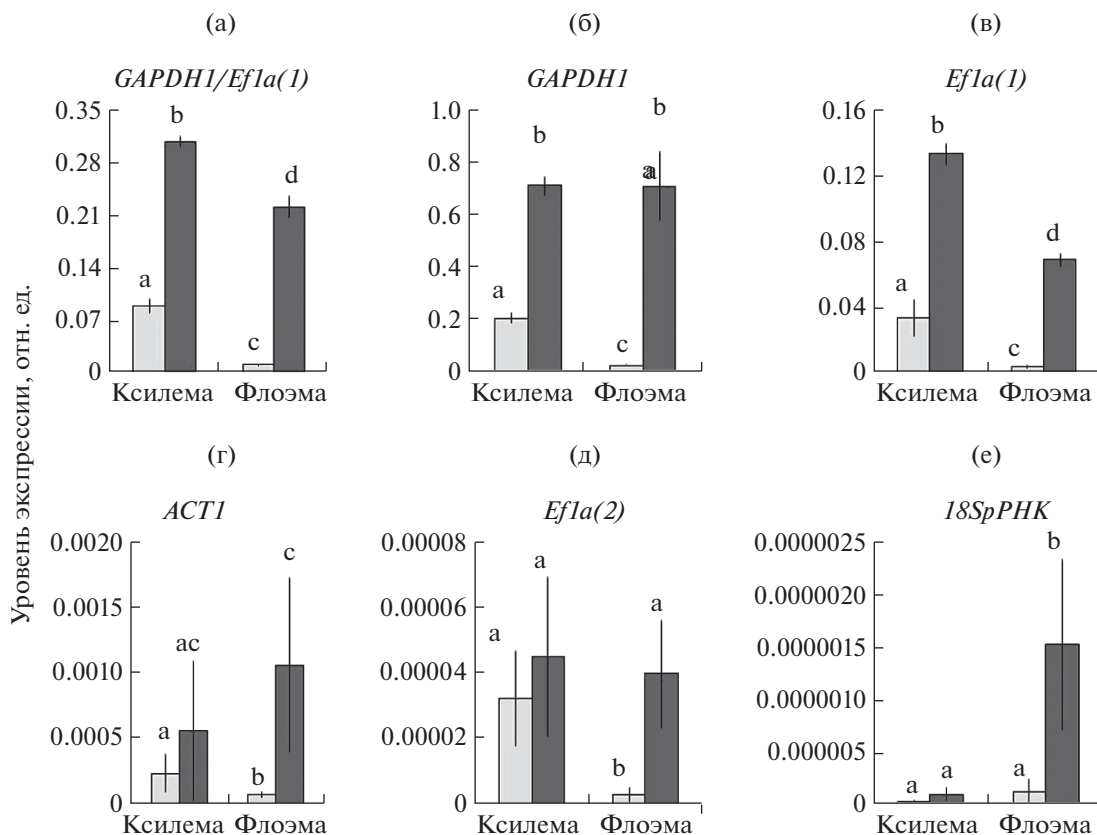
NormFinder позволил выявить, что наилучшими референсными генами для проведения ПЦР на различных образцах *B. pendula* Roth являются *GAPDH1* и *Actin1*, имеющие сходные значения показателя стабильности (0.054 и 0.056, соответственно), затем располагались *Ef1a(1)* и *Ef1a(2)* (0.067 и 0.071, соответственно) и *18SpPHK* (0.148) (рис. 3б).

Используемая нами программа NormFinder оценивает стабильность экспрессии на основе математической модели [25]. Данная программа выстраивает исследуемые гены на основе их минимальной меж- и внутригрупповой вариации. Поскольку в данной работе по оценке пригодности референсных генов мы использовали образцы разных форм березы повислой, то выборка образцов ( $n = 30$ ) была разделена на две группы ( $n = 15$ ) –

образцы *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. В результате оценки стабильности экспрессии потенциальных референсных генов и их внутри- и межгрупповой вариации, референсные гены *GAPDH1* и *Ef1a(1)* были предложены программой NormFinder как лучшая комбинация двух генов. Показатель стабильности данных генов составил при этом 0.044.

Оценка референсных генов при помощи программы BestKeeper основана на анализе пороговых значений Ct, по которым рассчитывается коэффициент вариации (CV), стандартное отклонение (SD) и коэффициент корреляции (r) для каждого гена в ряду данных [26]. Наименьшие значения SD и наиболее близкий к 1 показатель r имеют наиболее стабильно экспрессирующиеся гены. По результатам анализа NormFinder исключили наиме-





**Рис. 4.** Относительные уровни экспрессии (отн. ед) целевого гена (*CWINI.1*), рассчитанные посредством нормализации на различные референсные гены в ксилеме деревьев *Betula pendula* Roth. var. *pendula* (светлые столбики) и var. *carelica* (темные столбики). Бары – стандартные отклонения, рассчитанные на основании трех биологических и трех аналитических повторностей.

нее стабильно экспрессирующийся ген *18SpPHK*, остальные гены ранжировали в соответствии со значениями CV ± SD в образцах. Анализ исследуемых генов при помощи программы BestKeeper показал, что наиболее стабильными генами с наименьшим показателем SD являются гены *Actin1*, *GAPDH1*, *Ef1a(1)*, наименее стабильным оказался ген *Ef1a(2)*.

Таким образом, анализ стабильности экспрессии референсных генов при помощи двух пакетов программ показал сходные результаты.

Экспрессия гена, кодирующего апопластную инвертазу, в тканях ствола двух форм березы повислой относительно потенциальных референсных генов. В результате экспериментальной проверки потенциальных референсных генов было показано, что использование для расчета относительного уровня транскрипции референсных генов с разной стабильностью экспрессии может приводить к значительному искажению результатов. При использовании стабильных референсных генов (*GAPDH1/Ef1a(1)*; *GAPDH1* и *Ef1a(1)*) закономерности в распределении экспрессии *CWINI* у двух форм березы повислой были схожи. Так, у карельской березы, по сравнению с “обыч-

ной” березой, относительный уровень транскриптов *CWINI* был в 3.5–4 и 20–30 раз больше в тканях ксилемы и флоэмы, соответственно (рис. 4а, б, в), что согласуется с нашими предыдущими данными [4].

При использовании в качестве внутреннего контроля *ACT1* и наименее стабильного гена *Ef1a(2)* достоверных отличий в экспрессии *CWINI* в ксилеме между растениями карельской и “обычной” березой не наблюдали (рис. 4г, д)

Относительный уровень транскрипции гена *CWINI* при использовании в качестве референсного гена *18SpPHK* был близок к нулю, что значительно усложняет оценку различий в экспрессии целевого гена. Кроме того, как и в случае с *ACT1* и *Ef1a(2)*, не наблюдали отличий между узорчатой древесиной *B. pendula* var. *carelica* и прямоствольной древесиной *B. pendula* var. *pendula* (рис. 4е).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Универсального референсного гена, имеющего стабильную экспрессию у разных видов растений, не существует. Ранее для растений *B. pendula*

при нормализации данных количественной ПЦР-РВ использовали гены *Actin* [4, 6, 29], *Tubulin* [5, 28], *GAPDH* [27] и *18SpPHK* [7, 30]. В проведенном исследовании у двух форм березы повислой была впервые оценена пригодность пяти генов – *GAPDH1*, *Actin1*, *Ef1a(1)*, *Ef1a(2)*, *18SpPHK* для использования в качестве референсных при постановке qRT-PCR, основываясь на стабильности их экспрессии.

Результаты исследования уровня экспрессии потенциальных референсных генов были проанализированы при помощи программ NormFinder и BestKeeper. Данные программы используют различные алгоритмы оценки стабильности референсных генов, в связи с чем возможны некоторые различия в результатах. В нашем исследовании данные, полученные при помощи данных программ, различались незначительно. Было показано, что из числа изученных генов наиболее стабильно экспрессируемые в образцах *B. pendula* являются *Actin1*, *GAPDH1*, *Ef1a(1)*, при этом гены *GAPDH1* и *Ef1a(1)* были предложены программой NormFinder как лучшая комбинация двух референсных генов и имели наиболее низкое значение показателя стабильности.

Согласно результатам нашего исследования, наименее стабильно экспрессирующимся оказался ген *18SpPHK*. Несмотря на частое использование этого гена в качестве референсного, встречаются и противоположные данные, согласно которым *18SpPHK* не может служить в качестве внутреннего контроля, поскольку он транскрибируется РНК-полимеразой I, тогда как мРНК синтезируются РНК-полимеразой II [8]. Согласно полученным данным, *18SpPHK* имеет самые низкие значения Ct, что при расчетах приводит к очень низким значениям относительного уровня экспрессии целевого гена и искажению результатов. На основании вышеперечисленных данных ген *18SpPHK* был исключен из числа возможных референсных генов для проведения ПЦР-РВ на образцах *B. pendula*.

Помимо проверки стабильности экспрессии референсных генов нами была проверена надежность и целесообразность использования описанных генов в качестве референсных. Показано, что использование различных генов в качестве референсных без предварительной оценки стабильности их экспрессии может приводить к значительному искажению данных об уровне транскрипции целевого гена.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00622\_a).

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. Salojärvi J., Smolander O.-P., Nieminen K., Rajaraman S., Safronov O., Safdari P., Lamminmäki A., Immanen J., Lan T., Tanskanen J., Rastas P., Amiryousefi A., Jayaprakash B., Kammonen J.I., Haggvist R. et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of silver birch // Nat. Genet. 2017. V. 49. P. 904. <https://doi.org/10.1038/ng.3862>
2. Novitskaya L.L., Kushnir F.V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // Plant Growth Regul. 2006. V. 25. P. 18. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0419-2>
3. Moshchenskaya Y.L., Galibina N.A., Topchieva L.V., Novitskaya L.L. Expression of genes encoding sucrose synthase isoforms during anomalous xylogenesis in Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 616. <https://doi.org/10.1134/S1021443717030104>
4. Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M., Moshchenskaya Y.L., Borodina M.N., Sofronova I.N. Apoplastic invertase activity regulation in the cambial zone of Karelian birch // Russ. J. Dev. Biol. 2019. V. 50. P. 20. <https://doi.org/10.1134/S1062360419010028>
5. Alonso Serra J., Safronov O., Lim K.J., Fraser Miller S.J., Blokhina O.B., Campilho A., Chong S.L., Fagerstedt K., Haavikko R., Helariutta Y., Immanen J., Kangasjärvi J., Kauppila T.J., Lehtonen M., Ragni L. et al. Tissue specific study across the stem reveals the chemistry and transcriptome dynamics of birch bark // New Phytol. 2019. V. 222. P. 1816. <https://doi.org/10.1111/nph.15725>
6. Novitskaya L.L., Tarelkina T.V., Galibina N.A., Moshchenskaya Y.L., Nikolaeva N.N., Nikerova K.M., Podgornaya M.N., Sofronova I.N., Semenova L.I. The formation of structural abnormalities in Karelian birch wood is associated with auxin inactivation and disrupted basipetal auxin transport // Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 378. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09989-8>
7. Qu C., Bian X., Han R., Jiang J., Yu Q., Liu G. Expression of BpPIN is associated with IAA levels and the formation of lobed leaves in *Betula pendula* 'Dalecartica' // J. For. Res. 2020. V. 31. P. 87. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0865-5>
8. Zhou L.N., Yao W.F., Liu J., Shang J., Shan M.Q., Zhang L., Ding A.W. Protective effect of different solvent extracts from platycladi cacumen carbonisatum on LPS-induced human umbilical vein endothelial cells damage // China journal of Chinese materia medica. 2013. V. 38. P. 3933.
9. 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>

10. *Exposito-Rodriguez M., Borges A.A., Perez A.B., Perez J.A.* Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process // *BMC Plant Biol.* 2008. V. 8: e131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
11. *Paolacci A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M.* Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat // *BMC Molecular Biol.* 2009. V. 10: e11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>
12. *Li M.Y., Wang F., Jiang Q., Wang G.L., Tian C., Xiong A.-S.* Validation and Comparison of Reference Genes for qPCR Normalization of Celery (*Apium graveolens*) at Different Development Stages // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: e313. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00313>
13. *Jaiswal P.S., Kaur N., Randhawa G.* Identification of reference genes for real-time PCR gene expression studies during seed development and under abiotic stresses in *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. // *bioRxiv.* 2018: e313437. <https://doi.org/10.1101/313437>
14. *Chandna R., Augustine R., Bisht N.C.* Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e36918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036918>
15. *Manoli A., Sturaro A., Trevisan S., Quaggiotti S., Nonis A.* Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 807. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.019>
16. *Reddy P.S., Rao T.S.R.B., Sharma K.K., Vadez V.* Genomewide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.) // *Plant Gene.* 2015. V. 1. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2014.12.002>
17. *Су М., Цзан В., Яо Н., Хуан М.* Выделение высококачественной РНК из различных тканей *Populus* // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. С. 791.
18. *Han X., Lu M., Chen Y., Zhan Z., Cui Q., Wang Y.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e43084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043084>
19. *Yang M., Wu S., You W., Jaisi A., Xiao Y.* Selection of Reference Genes for Expression Analysis in Chinese Medicinal Herb *Huperzia serrata* // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00044>
20. *Zhou J., Yuan J., Long H., Tan X.* Expression profiles of a tung tree phosphate transporter cDNA and structural characteristics of the encoded protein // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. P. 162. <https://doi.org/10.3103/S0095452719020105>
21. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
22. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
23. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4 P. 406. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
24. *Zhang W., Wei R., Chen S., Jiang J., Li H., Huang H., Yang G., Wang S., Wei H., Liu G.* Functional characterization of CCR in birch (*Betula platyphylla* × *Betula pendula*) through overexpression and suppression analysis // *Physiol. Plant.* 2015. V. 154. P. 283. <https://doi.org/10.1111/ppl.12306>
25. *Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F.* Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 5245. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
26. *Кулакова Н.В., Болотова Т.А., Ханаев И.В., Черногор Л.И., Беликов С.И.* Выбор референсных генов для количественной ПЦР в режиме реального времени в губке *Lubomirskia baicalensis* // *Internetion journal of applied and fundamental research.* 2016. V. 1. P. 360.
27. *Гродецкая Т.А., Евлаков П.М., Исаков И.Ю.* Анализ экспрессии генов стрессоустойчивости в условиях воздействия засухи на растения березы в центрально-черноземном регионе // *Лесотехнический журнал.* 2020. № 2. С. 23. <https://doi.org/10.34220/issn.2222-7962/2020.2/3>
28. *Keinanen S.I., Hassinen V.H., Karenlampi S.O., Tervahauta A.I.* Isolation of genes up-regulated by copper in a copper-tolerant birch (*Betula pendula*) clone // *Tree Physiol.* 2007. V. 27. P. 1243. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.9.1243>
29. *Morales L.O., Tegelberg R., Brosche M., Keinanen M., Lindfors A., Aphalo P.J.* Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves // *Tree Physiol.* 2010. V. 30. P. 923. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq051>
30. *Kosonen M., Lännenpää M., Ratilainen M., Kontunen-Soppela S., Julkunen-Tiitto R.* Decreased anthocyanidin reductase expression strongly decreases silver birch (*Betula pendula*) growth and alters accumulation of phenolics // *Physiol. Plantarum.* 2015. V. 155. P. 384. <https://doi.org/10.1111/ppl.12324>

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ ЛАКТОН- И КЕТОНСОДЕРЖАЩИХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ ЯЧМЕНЯ ПРИ СТАРЕНИИ

© 2021 г. И. С. Ковтун<sup>а</sup>, \*, Н. Е. Кухаренко<sup>а</sup>, В. В. Кузнецов<sup>б</sup>, В. А. Хрипач<sup>с</sup>, М. В. Ефимова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>с</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

\*e-mail: kovtunirina2@gmail.com

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 17.09.2020 г.

Принята к публикации 20.09.2020 г.

Проведено сравнение физиологической активности brassinosteroidов (БС) разного химического строения – лактонсодержащего 24-эпибрасинолида (ЭБЛ) и кетонсодержащего brassinosteroidа 24-эпикастастерона (ЭПК), при темновом старении отсеченных листьев ячменя. Оценивали функциональное состояние фотосинтетического аппарата, количество фотосинтетических пигментов, содержание продуктов перекисного окисления липидов, а также экспрессию гена *HvS40* – маркера старения. Отделенные листья ячменя инкубировали на растворах ЭБЛ и ЭПК в диапазоне концентраций 0.01–1 мкМ в чашках Петри на фильтровальной бумаге. В качестве положительного контроля использовали синтетический цитокинин – 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 10 мкМ, в качестве отрицательного – дистиллированную воду. Чашки Петри с листьями выдерживали в течение пяти суток в темноте. Измерения анализируемых показателей проводили на 1, 3 и 5 сутки с начала инкубации, преимущественно в средней части листовой пластинки. ЭПК в концентрации 1 мкМ снижал окислительный стресс к пятым суткам инкубации в большей степени, чем ЭБЛ в аналогичной концентрации. В отношении поддержания уровня хлорофилла *a* (Хл *a*) 24-эпикастастерон (1 мкМ) был более эффективен, чем 24-эпибрасинолид. Показано, что экзогенные brassinosteroidы проявляли протекторный эффект на основные фотохимические процессы второй фотосистемы при старении листьев ячменя. Причем при оценке коэффициента нефотохимического тушения ( $q_N$ ), показателей регулируемого ( $Y(NPQ)$ ) и нерегулируемого ( $Y(NO)$ ) рассеивания тепловой энергии ЭПК демонстрировал более выраженное защитное действие для второй фотосистемы по сравнению с ЭБЛ. Установлено, что обработка brassinosteroidами снижала уровень экспрессии гена *HvS40* – маркера старения на пять суток инкубации, что было особенно характерно для кетонсодержащего brassinosteroidа. Таким образом, можно заключить, что кетонсодержащий brassinosteroid не только проявляет высокую биологическую активность, но и, по ряду параметров, является более эффективным по сравнению с лактонсодержащим brassinosteroidом для уменьшения повреждений, вызванных старением.

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare*, brassinosteroidы, старение, фотосинтетические пигменты, фотосистема II, 24-эпибрасинолид, 24-эпикастастерон

DOI: 10.31857/S0015330321030088

### ВВЕДЕНИЕ

Старение растений представляет собой сложный физиологический процесс, реализация которого значительно влияет на жизнедеятельность растений, приводя к угнетению функционирующего

аппарата, снижению продуктивности растений и их естественной гибели [1]. С одной стороны, благодаря искусственной регуляции процессов старения можно добиться сокращения жизненного цикла растений для ускоренного получения плодов и семян, что представляет значительный интерес в регионах с коротким летним периодом в условиях быстрого сокращения длины светового дня. С другой стороны, управляемое ингибирование процесса ста-

**Сокращения:** БЛ – брасинолид, БС – brassinosteroidы, ТБК-активные вещества – вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, Хл – хлорофилл, ФлХ – флуоресценция хлорофилла, ЭБЛ – 24-эпибрасинолид, ЭПК – 24-эпикастастерон.

рения позволит дольше поддерживать активное физиологическое состояние растения, что представляет особый интерес при транспортировке и хранении срезанных цветов, фруктов и овощей. Исследование влияния различных факторов на замедление или ускорение старения растений имеет большое практическое значение [2].

Старение является четко контролируемым процессом, который регулируется и реализуется в определенном порядке. В ходе старения наблюдаются значительные морфологические, физиологические, молекулярные и цитологические преобразования, что выражается в изменении экспрессии определенных генов, колебании уровня и соотношения фитогормонов, а также в запуске процессов разрушения клетки. В листьях одним из начальных признаков старения является деградация хлоропластов, что, в свою очередь, приводит к угнетению фотосинтеза. Кроме того, существуют сведения, что старение может запускаться хлоропластами, а механизмы его развития могут зависеть как от факторов окружающей среды, так и от вида растения [3].

Значительную роль в регуляции старения играют фитогормоны. Известно, что этилен, жасмоновая и абсцизовая кислоты могут способствовать старению, тогда как цитокинины, напротив, замедляют его. Среди всех гормонов особое место занимают brassinosteroids (БС), представляющие собой полигидроксильрованные производные стероидов, близкие по строению стероидным гормонам млекопитающих [4]. Они выполняют решающую роль в реализации жизненного цикла растений: от прорастания семян до естественной смерти. БС на протяжении всего онтогенеза растений способны влиять на процессы деления и растяжения клеток, сосудистую дифференцировку, процесс этиоляции, фотоморфогенез, иммунитет, репродуктивное развитие, а также могут оказывать протекторный эффект в ответ на действие различных стрессоров [5]. В настоящее время выделено около 70 природных brassinosteroidов. На основании различий в структуре циклической части молекулы их можно отнести к В-лактонам, 6-кетонам и 6-дезоксопроизводным [6].

Для некоторых представителей brassinosteroidов, таких как brassinolid (БЛ), 24-эпибрассинолид и 28-гомобрассинолид, показана высокая биологическая активность, которая обусловлена такими структурными особенностями молекул, как присутствие 6-кето- или 7-окса-6-оксо структурного фрагмента в кольце В, наличие 2 $\alpha$ - , 3 $\alpha$ -диольной группировки в кольце А, существование диольной системы в положениях 22 и 23 с R-конфигурацией гидроксильных групп, наличие метильной или этильной группы в положении 24 (боковая цепь), *транс*-сочленение циклов А/В [7].

Лактонсодержащие brassinosteroids являются продуктом ключевой стадии биосинтеза brassinosteroidов из их кетонсодержащих предшественников. 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) относится к лактонсодержащим БС, тогда как 24-эпикастастерон (ЭПК) – к кетонсодержащим. Предполагается, что наличие *цис*-диольной группировки в цикле А, а также присутствие гидроксильных групп в положениях 22 и 23 боковой цепи необходимы для проявления высокой биологической активности БС в растениях [7], что характерно для молекул ЭБЛ и ЭПК. Важно отметить, что физиологическое действие ЭБЛ, как лактонсодержащего brassinosteroidа, исследовано более детально, в отличие от его кетонсодержащего предшественника.

Исследование влияния brassinosteroidов на старение растений представляет значительный интерес, однако до сих пор остается невыясненной их роль в этом процессе. Ряд исследований свидетельствует о том, что brassinosteroids способны ускорять старение [8–11], однако существуют доказательства, указывающие на их способность ингибировать эти процессы [12, 13]. На примере мутантного растения *Arabidopsis thaliana*, у которого инактивирован ген, кодирующий один из ключевых ферментов биосинтеза brassinosteroidов, было показано, что недостаток гормонов приводит к замедлению старения и формированию карликовых растений с продолжительным жизненным циклом [14]. С другой стороны, экзогенные лактонсодержащие brassinosteroids способствуют мобилизации фотосинтетических процессов, повышению уровня пигментов и активности транскрипции хлоропластных генов у растений исходного родительского фенотипа [15]. Показано, что у растений картофеля баланс кетон- и лактонсодержащих БС характеризуется органоспецифичностью, а также зависит от возраста растений. Так, например, в корнях преобладали представители лактонового ряда, в побегах – кетонового, при этом по мере роста растений содержание лактонов снижалось, а кетонов возрастало [16]. Тем не менее, данные о динамике и балансе brassinosteroidов разного химического строения в растениях представлены недостаточно, а влияние экзогенных фитогормонов на уровень эндогенных brassinosteroidов слабо изучено.

Можно предположить, что в зависимости от химического строения (лактон- или кетонсодержащие) и действующей концентрации brassinosteroids могут оказывать различное по направленности и степени выраженности влияние на процесс старения. Кроме того, до сих пор остается открытым вопрос об эффективности действия лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащих (ЭПК) brassinosteroidов на состояние фотосинтетической системы, как одного из основных маркеров оптимального физиологического состояния растений при темновом старении срезанных листьев ячменя. Для исследова-

дования специфичности действия ЭБЛ и ЭПК не только на физиологическом, но и на молекулярном уровне изучена активность экспрессии гена *HvS40*, продукт которого участвует в регуляции старения и может быть использован в качестве молекулярного маркера.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на растениях ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.) сорта “Луч”. Это однодольное травянистое растение семейства Злаковые (*Poaceae*), которое широко используется во многих странах мира как одна из основных сельскохозяйственных культур. Удобство экспериментального использования ячменя для оценки активности и эффективности действия веществ гормональной природы обусловлено доступностью семенного материала, неприхотливостью растений, возможностью их выращивания в лабораторных условиях с быстрым получением большого количества растений.

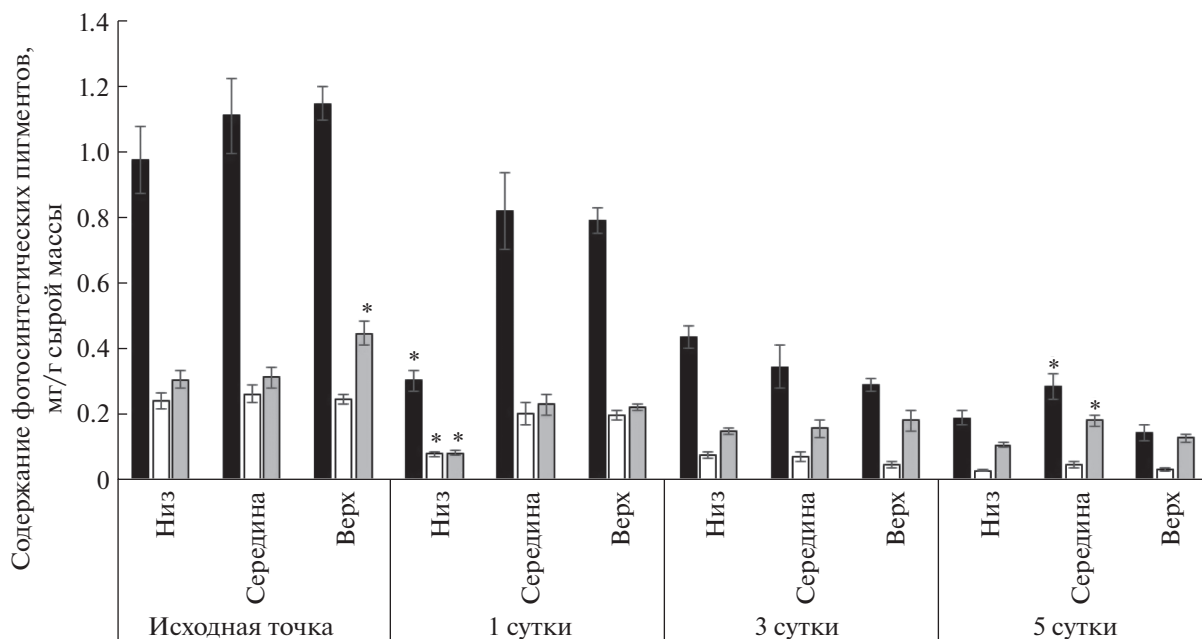
Семена ячменя проращивали в почве в климатической камере при температуре  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , с фото-периодом 16/8 ч (день/ночь), при 150 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>с под люминесцентными лампами (“OSRAM”, Германия) в течение 5 суток. Перед началом эксперимента часть растительного материала фиксировали для определения содержания фотосинтетических пигментов, показателей активности ФС II и оценки уровня транскриптов гена *HvS40* – исходная точка (ИТ). Отделенные листья *H. vulgare* инкубировали на растворах 24-эпикастастерона и 24-эпикастинолида в концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мкМ в чашках Петри на фильтровальной бумаге. В качестве положительного контроля использовали синтетический аналог природного цитокинина – 6-бензиламинопурина в концентрации 10 мкМ, в качестве отрицательного – дистиллированную воду. Важно отметить, что именно БАП используется в качестве положительного контроля, поскольку ранее были получены данные о его ингибирующем влиянии на старение [17]. Чашки Петри со срезанными листьями выдерживали в течение пяти суток без света. Измерения анализируемых показателей проводили на 1, 3 и 5 сутки после начала инкубации, фиксацию растительного материала осуществляли на зеленом свете низкой интенсивности (0.25 мкмоль/м<sup>2</sup> с). Каждый лист условно разделяли на три части – низ (2 см от основания листа), верх (2 см от верхушки листа), середина (часть листа между верхом и низом, около 2–3 см).

О возникновении окислительного стресса при старении отделенных листьев ячменя судили по накоплению веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные вещества). Зафиксированную в жидком азоте пробу листьев

(около 100 мг) растирали в 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Перемешивали на вортексе, центрифугировали 15 мин, при 12000 g при 4°C. 500 мкл супернатанта отбирали и добавляли в стеклянные пробирки, содержащие 1.5 мл тиобарбитуровой кислоты. В контрольные образцы вместо супернатанта добавляли равный объем ТХУ. Реакцию с образованием окрашенного комплекса проводили в течение 30 мин при 98°C на водяной бане [18]. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “ThermoScientific”, США) при длине волны 532 и 600 нм.

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях рассчитывали на сырую массу. Навеску растительного материала (около 10 мг), зафиксированную в 96% спирте, растирали и центрифугировали (MiniSpin, “Eppendorf”, Германия) в течение 8 мин при 8000 g. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку типа Эппендорф и доводили объем до 1.5 мл 96% спиртом. Оптическую плотность растворов промеряли при длине волн: 470, 664, 648, 720 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “ThermoScientific”, США). В качестве контрольного образца использовали 96% этанол. Количество фотосинтетических пигментов в спиртовой вытяжке рассчитывали по формулам согласно Lichtenthaler [19].

Исследование фотохимической активности ассимиляционного аппарата растений проводили при помощи модулирующего импульсного флуориметра Junior-PAM (“Heinz-Walz”, Germany) [20]. Параметры флуоресценции регистрировали при наведении светодиода флуориметра на пробы листьев после 20 минут темновой адаптации. Хлорофиллы фотосистемы II (ФС II) возбуждали светодиодом при длине волны 450 нм. Детекция флуоресценции хлорофилла (ФлХ) осуществлялась PIN-фотодиодом, защищенным фильтром (длина волны при 50% пропускании – 645 нм). Максимальная плотность светового потока составляла 10000 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>с), продолжительность светового импульса – 0.6 с. Параметры флуоресценции рассчитывали в программе WinControl. Параметры флуоресценции хлорофиллов:  $F_0$  – базовый уровень ФлХ при низкой интенсивности света, не вызывающей фотохимических реакций;  $F_m$  – максимальный уровень ФлХ, вызванный импульсом света после адаптации тканей к темноте;  $F'_m$  – максимальный уровень ФлХ, вызванный импульсом света после адаптации тканей к свету;  $F_v$  – “вариабельность” ФлХ, рассчитывается как разность  $F_0$  и  $F_m$ ;  $F'_v$  – “вариабельность” ФлХ, рассчитывается как разность  $F_0$  и  $F'_m$ ;  $F_v/F_m$  – максимальный фотохимический квантовый выход ФС II после адаптации тканей к темноте;  $Y(II)$ , или  $F'_v/F'_m$  – эффективный фотохимический



**Рис. 1.** Содержание фотосинтетических пигментов в разных частях листовой пластины ячменя при темновой инкубации. Столбики черного цвета – хлорофилл *a*, белого цвета – хлорофилл *b*, серого цвета – каротиноиды. Достоверные различия в пределах одних суток на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены звездочкой (\*).

квантовый выход ФС II после адаптации тканей к свету;  $qP$ , или  $(F'_m - F_t)/(F'_m - F_o)$  – коэффициент фотохимического тушения ФЛХ;  $qN$ , или  $(F_m - F'_m)/(F_m - F_o)$  – коэффициент нефотохимического тушения ФЛХ; доля открытых центров второй фотосистемы –  $qL$ ;  $Y(NPQ)$  – регулируемое рассеяние тепловой энергии;  $Y(NO)$  – нерегулируемое рассеяние тепловой энергии;  $ETR$  – плотность транспорта электронов по электрон-транспортной цепи тилакоидных мембран.

Нуклеотидную последовательность гена *HvS40* (маркера старения) брали из биоинформатической базы данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA – FI496079.1). Специфические праймеры подбирали с использованием программ Primer-BLAST и Vector NTI 11 [21]. Выделение ДНК, для проверки специфичности отжига праймеров, проводили с помощью коммерческого набора Сорб-ГМО-А (“Синтол”, Россия). РНК выделяли с использованием коммерческого набора RNeasy miniKit (“Qiagen”, Германия). Для синтеза кДНК использовали набор MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Оценку уровня экспрессии целевого гена проводили методом ПЦР в режиме реального времени в амплификаторе LightCycler96 (“Roche”, Швейцария) с применением красителя SybrGreen I (“Евроген”, Россия). Амплификацию проводили с использованием специфических праймеров для референсных генов (*Ef1* (KP293845.1), прямой: GAAGATGATTCCCAAGC, обратный: TGACACCAACAGCCACAGTT; *TubB* (AM502854),

прямой: TCCAAGGTTTCCAGGTGTG, обратный: AGACGGAGAAGGTGAGCATC [22], при температуре отжига  $60^\circ\text{C}$ ) и целевого гена – маркера старения – *HvS40* (прямой: GGAGACATCGC-CAAGGTGTC, обратный: TGCAGTCGTCGTTGCACT, при температуре отжига  $62^\circ\text{C}$ ).

Каждый эксперимент был повторен не менее трех раз. Для каждого биологического повтора использовали не менее 25 листьев. Полученные результаты представлены на рисунках в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для оценки достоверности различий использовали критерий Стьюдента. Значения *t*-критерия находили для 95% уровня значимости ( $P < 0.05$ ). Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы Statistica 10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Оценка пигментного состава в разных частях листовой пластины

Известно, что листья однодольных растений растут основанием, поэтому распределение фотосинтетических пигментов в разных частях листовой пластины неодинаково. Мы проанализировали содержания фотосинтетических пигментов в разных частях листьев ячменя при их темновой инкубации на 1, 3 и 5 сутки (рис. 1).

В исходной точке эксперимента (ИТ) содержание хлорофиллов было одинаково во всех частях листа, при этом уровень каротиноидов в верхней

**Таблица 1.** Параметры фотосинтеза в разных частях листовой пластины.

	низ	середина	верх
$F_v/F_m$	0.764 ± 0.014	0.761 ± 0.006	0.779 ± 0.005
Y(II)	0.656 ± 0.007	0.646 ± 0.006	0.651 ± 0.008
Y(NPQ)	0.072 ± 0.003*	0.126 ± 0.009	0.138 ± 0.010
Y(NO)	0.272 ± 0.008*	0.229 ± 0.014	0.211 ± 0.003
ETR	52.322 ± 0.532	51.511 ± 0.445	51.956 ± 0.589
qP	0.912 ± 0.021*	0.962 ± 0.019	0.956 ± 0.005
qN	0.255 ± 0.010*	0.431 ± 0.033	0.470 ± 0.026
qL	0.745 ± 0.060*	0.894 ± 0.054	0.875 ± 0.017

Примечание.  $F_v/F_m$  – максимальная фотохимическая эффективность второй фотосистемы, Y(II) – эффективный квантовый выход, Y(NPQ) – регулируемое рассеивание тепловой энергии, Y(NO) – нерегулируемое рассеивание тепловой энергии, ETR – плотность потока электронов, qP – коэффициент фотохимического тушения, qN – коэффициент нефотохимического тушения, qL – доля открытых центров второй фотосистемы. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены звездочкой (\*).

части листовой пластины был выше. После суток инкубации, в нижней части листа, содержание всех исследуемых групп пигментов снизилось примерно в 2 раза. На пятые сутки наибольшее содержание хлорофилла *a* наблюдалось в средней части листовой пластины (рис. 1).

#### *Оценка функционального состояния второй фотосистемы в разных частях листовой пластины*

При исследовании фотохимической активности второй фотосистемы в разных частях листа 5-дневных проростков ячменя было показано, что величины максимального ( $F_v/F_m$ ) и эффективного (Y(II)) квантового выхода, показатель плотности потока электронов (ETR) существенно не отличались в разных частях листа, тогда как показатели регулируемого (Y(NPQ)) и нерегулируемого (Y(NO)) рассеивания тепловой энергии, коэффициентов фотохимического (qP) и нефотохимического (qN) тушения, а также доля открытых центров второй фотосистемы (qL) были сходны в верхней и средней части листа, при этом значительно отличаясь от данных показателей в нижней части листовой пластины (табл. 1).

Таким образом, основываясь на этих результатах, для проведения дальнейших исследований использовали среднюю часть листовой пластины.

#### *Влияние ЭБЛ и ЭПК на пигментный состав листьев ячменя*

Для определения оптимальной действующей концентрации гормонов исследовали содержание основных фотосинтетических пигментов в отделенных листьях ячменя при их старении, индуцированном темнотой. Использовали ЭБЛ и ЭПК в диапазоне концентраций 0.01–1 мкМ. Обработка brassinosterоидами не оказала значительного влияния на содержание хлорофилла *b*

(Хл *b*) и каротиноидов. К пятым суткам инкубации наблюдалось большее содержание хлорофилла *a* при обработке 1 мкМ ЭПК в сравнении с точным контролем (табл. 2).

#### *Влияние ЭПК и ЭБЛ на перекисное окисление липидов*

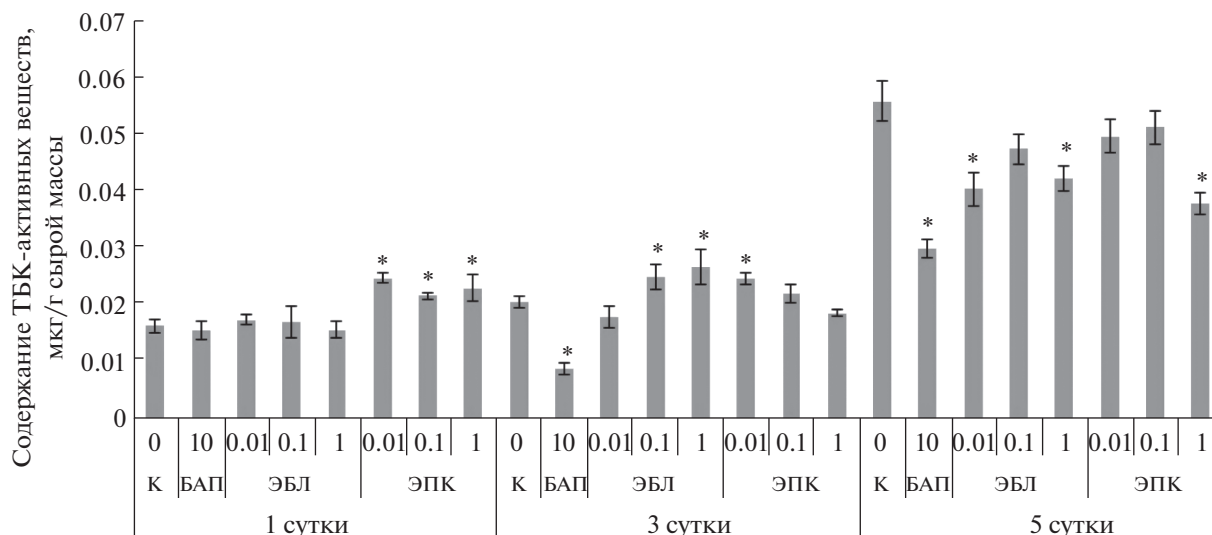
Наряду с содержанием фотосинтетических пигментов определяли степень окислительного стресса по накоплению веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Анализ показал, что как лактон-, так и кетонсодержащие БС снижали перекисное окисление липидов к пятым суткам воздействия при большинстве исследуемых концентраций. Особенно ярко данный эффект выражен для ЭБЛ и ЭПК в концентрации 1 мкМ (рис. 2).

Опираясь на полученные данные, для дальнейшей оценки эффективности функционирования второй фотосистемы нами была использована концентрация brassinosterоидов 1 мкМ.

#### *Влияние ЭБЛ и ЭПК на активность фотосинтетических процессов второй фотосистемы*

РАМ-флуориметрия, основанная на импульсной амплитудной модуляции, широко используется для исследования активности фотосинтетических процессов [23]. Одним из основных показателей функционирования фотосинтетического аппарата является максимальный фотохимический квантовый выход, который определяют как отношение значения переменной флуоресценции к максимальной ( $F_v/F_m$ ). В течение пяти суток показатель  $F_v/F_m$  постепенно снижался у всех вариантов, включая контрольный и варианты с гормональной обработкой (рис. 3а). Тем не менее, на третьи сутки величина данного показателя у контрольного варианта была выше, чем у опытных. На пя-



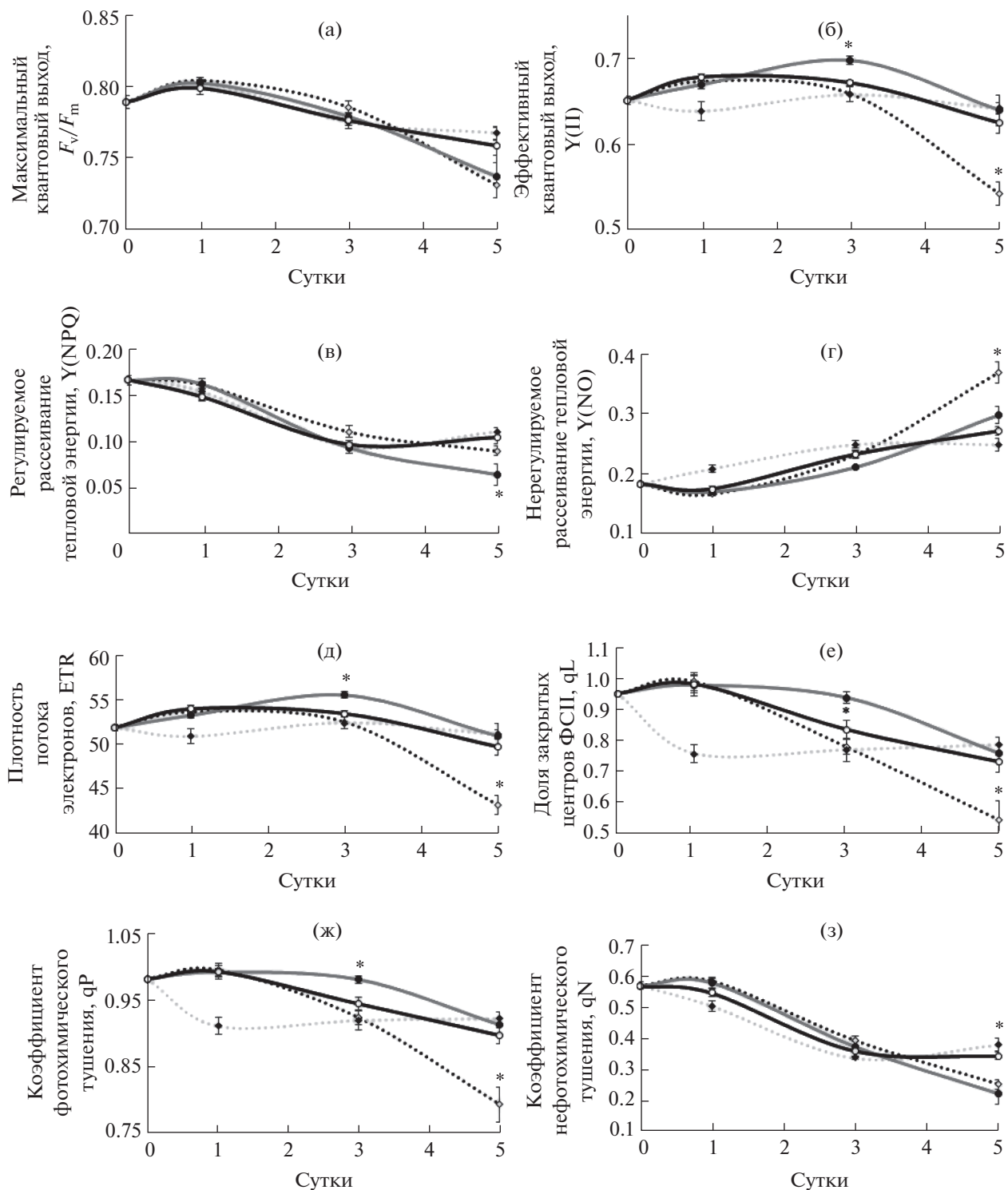


**Рис. 2.** Влияние ЭБЛ (0.01, 0.1 и 1 мкМ) и ЭПК (0.01, 0.1 и 1 мкМ) на содержание ТБК-активных веществ в средней части листа ячменя в динамике. Достоверные различия относительно суточного контроля на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены звездочкой (\*).

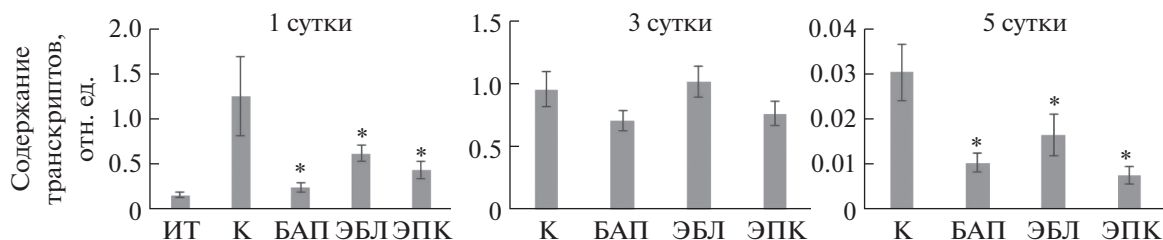
**Таблица 2.** Влияние ЭБЛ и ЭПК на содержание фотосинтетических пигментов в отделенных листьях ячменя

	Вариант	Концентрация, мкМ	Хл <i>a</i> , мг/г сырой массы	Хл <i>b</i> , мг/г сырой массы	Каротиноиды, мг/г сырой массы
ИТ	ИТ	0	0.73 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01
1 сутки	К	0	0.83 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.00
		БАП	10	0.98 ± 0.06*	0.26 ± 0.02*
	ЭБЛ	0.01	0.81 ± 0.07	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02
		0.1	0.78 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02
		1	0.90 ± 0.07	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02
	ЭПК	0.01	0.95 ± 0.07*	0.26 ± 0.02*	0.27 ± 0.02
		0.1	0.79 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01*
		1	0.85 ± 0.06	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02
	3 сутки	К	0	0.64 ± 0.06	0.17 ± 0.02
БАП			10	0.83 ± 0.03*	0.23 ± 0.01*
ЭБЛ		0.01	0.57 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.01
		0.1	0.59 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02
		1	0.57 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.01
ЭПК		0.01	0.58 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.02
		0.1	0.68 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01
		1	0.65 ± 0.09	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03
5 сутки		К	0	0.29 ± 0.03	0.10 ± 0.01
	БАП		10	0.75 ± 0.03*	0.20 ± 0.01*
	ЭБЛ	0.01	0.22 ± 0.04	0.07 ± 0.01*	0.12 ± 0.01
		0.1	0.23 ± 0.02*	0.07 ± 0.01*	0.12 ± 0.01
		1	0.31 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02
	ЭПК	0.01	0.26 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.02
		0.1	0.25 ± 0.02	0.07 ± 0.00*	0.13 ± 0.00
		1	0.39 ± 0.04*	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02

Примечание. Достоверные различия относительно суточного контроля на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены звездочкой (\*).



**Рис. 3.** Влияние ЭБЛ (1 мкМ) и ЭПК (1 мкМ) на параметры фотосинтеза: максимальный квантовый выход (а), эффективный квантовый выход (б), регулируемое рассеивание тепловой энергии (в), нерегулируемое рассеивание тепловой энергии (г), плотность потока электронов (д), доля открытых центров второй фотосистемы (е), коэффициент фотохимического тушения (ж), коэффициент нефотохимического тушения (з). Черная пунктирная линия – контроль, серая пунктирная линия – БАП, серая сплошная линия – ЭБЛ, черная сплошная линия – ЭПК. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены звездочкой (\*).



**Рис. 4.** Влияние ЭБЛ (1 мкМ) и ЭПК (1 мкМ) на относительный уровень транскриптов гена *HvS40* в листьях ячменя. Достоверные различия относительно суточного контроля на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены звездочкой (\*).

тые сутки отмечалось некоторое повышение показателя  $F_v/F_m$  у опытных вариантов в сравнении с суточным контролем (рис. 3а).

На протяжении всего периода инкубации было отмечено снижение эффективного квантового выхода ( $Y(II)$ ) во всех исследуемых вариантах. При этом уже на третьи сутки данный показатель увеличивался у вариантов с обработкой brassinosterоидами относительно контроля. У всех вариантов с гормональной обработкой на пятые сутки показатель  $Y(II)$  был выше примерно на 17%, чем у суточного контроля (рис. 3б).

Для оценки нефотохимического тушения флуоресценции используется параметр регулируемого рассеяния тепловой энергии ( $Y(NPQ)$ ). Данный показатель служит оценкой интенсивности нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла – защитного механизма регуляции фотосинтеза от избыточного облучения. Было отмечено незначительное повышение данного показателя на пятые сутки воздействия ЭПК, тогда как для варианта с ЭБЛ этот параметр был ниже суточного контроля (рис. 3в). Величина нерегулируемого рассеивания тепловой энергии ( $Y(NO)$ ) повышалась к пятым суткам инкубации, особенно в контрольном варианте. Гормональная обработка приводила к снижению данного показателя на 20–30% (рис. 3г).

О стабильной эффективности ФС II свидетельствует восстановление скорости переноса электронов (ETR) в ответ на гормональное воздействие. Так, на рисунке 3д показано, что относительная скорость транспорта электронов совпадала с динамикой эффективного квантового выхода  $Y(II)$ .

Показатель  $qL$  отражает долю открытых реакционных центров ФС II. ЭПК и ЭБЛ способствовали увеличению данного показателя на третьи и пятые сутки воздействия (рис. 3е).

Данные, представленные на рисунке 3ж, свидетельствуют о том, что значение коэффициента фотохимического тушения флуоресценции ( $qP$ ) в присутствии лактон- и кетонсодержащих brassinosterоилов было выше в сравнении с контролем на третьи и пятые сутки инкубации.  $qN$  – коэффициент нефотохимического тушения флуорес-

ценции – к пятым суткам эксперимента повышался при инкубации с 24-эпикастестероном и не отличался от суточного контроля при обработке 24-эпибрассинолидом (рис. 3з).

#### Оценка экспрессии гена *HvS40*

Ген *HvS40* ячменя относится к семейству генов *S40*, участвующих в регуляции старения растений, и может быть использован для оценки процесса старения, индуцированного темнотой, у отделенных листьев ячменя. После суток инкубации экспрессия гена *HvS40* была выше, чем в исходной точке эксперимента (до начала воздействия) (рис. 4). При этом гормональная обработка листьев снижала активность экспрессии гена старения.

На третьи сутки воздействия наблюдалось выравнивание с суточным контролем уровня транскриптов гена *HvS40* при обработке brassinosterоидами. К пятым суткам эксперимента экспрессия гена *HvS40* в суточном контроле была выше, чем в вариантах с гормональным воздействием (рис. 4).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Брассиностероиды, как класс фитогормонов, открыты сравнительно недавно и значительные успехи по исследованию их свойств и функций в растениях достигались благодаря использованию мутантных растений. При этом у разных видов растений, содержащих мутации по генам, отвечающим за синтез или сигналинг brassinosterоилов, наблюдалось проявление сходных фенотипических черт, в частности, карликовость [24]. Данные исследования положили начало изучению стероидных гормонов растений, как регуляторов развития, оказывающих значительное воздействие на рост, растяжение, деление и дифференциацию клеток. Позже было установлено, что влияние БС на рост осуществляется путем сложного сигнального каскада, модулирующего активность генов и баланс других фитогормонов [25]. Также было показано, что brassinosterоиды способны участвовать в формировании защитного потенциала растений от биотических и абиотических стрессоров [26].

Несмотря на то, что ученые вплотную приблизились к пониманию механизмов действия brassinosterоидов, вопрос об их регуляторной роли при старении до сих пор остается открытым. Также не определено, зависит ли направленность действия разных представителей БС от их химической структуры.

Например, отмечено ускорение процессов старения отделенных листьев гороха в результате изменения липидного состава при действии 0.1 мкМ 24-эпибрасинолида [8]. Кроме того, на 15 сутки воздействия снижалось накопление хлорофиллов *a* и *b* при действии 0.1 мкМ ЭБЛ по сравнению с контролем и ЭБЛ в концентрациях 1 и 10 нМ [8]. Брасинолид способствовал ускорению старения отделенных семядолей проростков огурца [9] и листьев пшеницы [10]. Было показано, что брасинолид способствовал опосредованному этиленом послеуборочному созреванию плодов томатов, увеличивая содержание растворимых сахаров, аскорбиновой кислоты, содержание ликопина, скорости дыхания и выработки этилена, но значительно снижал содержание хлорофилла по сравнению с контролем. При этом применение брасиназола — ингибитора биосинтеза brassinosterоидов — задерживало созревание томатов [11]. В исследованиях по влиянию брасинолида на рост и развитие сои продемонстрировано замедление процесса опадения и пожелтения листьев при физиологическом старении растений. Анализ экспрессии генов белков семейства WRKY, участвующих в регуляции старения, показал снижение их активности при действии брасинолида [12]. Кроме того, важно учитывать зависимость эффекта brassinosterоидов от возраста листьев. Было показано, что обработка brassinosterоидами зрелых листьев папайи отсрочила их пожелтение и опадение, тогда как развитию старения более молодых листьев она не препятствовала [13]. По большей части исследование влияния brassinosterоидов на старение проводится с применением гормонов лактонового ряда — брасинолида, 24-эпибрасинолида. Тогда как кастастерон и 24-эпикастастерон — представители кетонового ряда БС, предшественники БЛ и ЭБЛ, в данном аспекте изучены недостаточно [27].

Ведущая роль в функционировании ассимилирующих систем листа принадлежит фотосинтетическим пигментам. Содержание и соотношение разных групп пигментов отражает состояние фотосинтетического аппарата. Важной характеристикой фотосинтетической активности также является соотношение скорости образования новых и разрушение старых молекул хлорофилла. Последнее же напрямую зависит от физиологического состояния клетки и растения в целом. К условиям, снижающим фотосинтетическую активность, относится и старение. На пятые сутки инкубации листьев ячменя отмечено положи-

тельное влияние 1 мкМ 24-эпикастастерона на содержание фотосинтетических пигментов (табл. 2).

Хлорофиллы содержатся в составе фотосистем растений, и снижение их количества может значительно тормозить протекание фотохимических процессов. Оценка функционального состояния второй фотосистемы показала зависимость ее активности от старения. Так, к пятым суткам воздействия наблюдалось значительное снижение максимального и эффективного квантового выхода, плотности потока электронов, регулируемого рассеивания тепловой энергии, коэффициентов фотохимического и нефотохимического тушения электронов, а также доля открытых центров второй фотосистемы. При этом наблюдалось увеличение нерегулируемого рассеивания тепловой энергии (рис. 3а-з). Все это, несомненно, свидетельствует об угнетении активности фотосинтетического аппарата при старении.

ЭБЛ и ЭПК способствовали поддержанию ряда показателей на уровне выше суточного контроля к пятым суткам эксперимента. Величина эффективного квантового выхода, плотности потока электронов и доля открытых центров второй фотосистемы была выше как при обработке ЭБЛ, так и ЭПК в сравнении с суточным контролем (рис. 3б, д, е).

Чтобы избежать повреждений реакционных центров повышенной инсоляцией, растениям необходимо рассеивать в виде тепла часть энергии поглощенных квантов света. Такие процессы также активизируются, когда листья повреждены в результате действия других стрессовых факторов. Ведущую роль в этом процессе играют каротиноиды. Для оценки нефотохимического тушения флуоресценции используется параметр регулируемого рассеивания тепловой энергии ( $Y(NPQ)$ ), служащий для оценки функционирования защитного механизма регуляции фотосинтеза от избыточного облучения. Исходя из полученных данных, 24-эпикастастерон влиял на поддержание данного показателя на уровне выше суточного контроля, тогда как ЭБЛ снижал его на пятые сутки (рис. 3в). Показатель, характеризующий нерегулируемое рассеивание тепловой энергии, повышался к пятым суткам во всех исследуемых вариантах в сравнении с исходной точкой эксперимента. При этом на пятый день воздействия гормональная обработка значительно снижала данный показатель относительно суточного контроля, а кетонсодержащий brassinosterоид — ЭПК, в сравнении с лактонсодержащим — ЭБЛ, оказался более эффективен (рис. 3г).

В основе фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла лежит тот факт, что, в зависимости от окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора второй фотосистемы — пластохинона, уровень флуоресценции

хлорофиллов может различаться в несколько раз: увеличиваться при восстановлении пластохинона и уменьшаться при его окислении. Для оценки доли окисленных пластохинонов используют коэффициент фотохимического тушения ( $qP$ ). Чем выше значение  $qP$ , тем больше количество окисленных пластохинонов, а значит эффективность использования энергии света и пропускной способности фотосинтетической электрон-транспортной цепи достаточно высока для продуктивного функционирования фотосинтетического аппарата. При этом как 24-эпибрассинолид, так и 24-эпикастастерон повышали данный показатель уже на третьи сутки воздействия (рис. 3ж).

Старение способно вызывать разрушение хлоропластов. Во время деструкции пластид одновременно с уменьшением содержания хлорофиллов значительно понижается и содержание воды в листьях. Возникновение водного дефицита ведет к развитию осмотического стресса и, как следствие, к усилению генерации активных форм кислорода [28]. АФК обладают высокой реакционной способностью и могут окислять липиды, значительное количество которых содержится в клеточных мембранах [29]. При распаде жирных кислот, сопровождающим перекисное окисление липидов, первоначально образуются нестойкие и довольно быстро разрушающиеся диеновые конъюгаты [30]. Они быстро разрушаются с образованием вторичных продуктов, таких как малоновый диальдегид, составляющий основной компонент группы так называемых ТБК-активных веществ, которые взаимодействуют с тиобарбитуровой кислотой. Таким образом, нагрузка на фотосинтетический аппарат при старении значительно возрастает не только за счет АФК, образующихся в процессе фотосинтеза, но и за счет окислительного стресса, возникающего в клетках растений. Нами показано значительное увеличение ПОЛ к пятым суткам инкубации в контрольном варианте, при этом гормональная обработка способствовала снижению стрессорного воздействия на липидную мембрану, о чем свидетельствует уменьшение содержания ТБК-активных веществ в пробах. На основании описанных параметров можно сделать заключение об эффективности ЭБЛ и ЭПК в поддержании структуры фотосинтетического аппарата и фотосинтетической активности стареющих листьев ячменя (рис. 2).

Оценка уровня экспрессии гена старения *HvS40* на пятые сутки инкубации показала снижение накопления его транскриптов при гормональной обработке, причем кетонсодержащий брассиностероид оказался более эффективным (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что кетонсодержащий брассиностероид – 24-эпикастастерон – оказывает значительное физиологическое действие на растения. В условиях старения отделен-

ных листьев как лактон-, так и кетонсодержащие брассиностероиды оказали протекторное действие, однако при обработке 24-эпикастастероном защитный эффект был выражен сильнее. На фотосинтетический аппарат брассиностероиды также оказали положительное влияние, поддерживая фотохимическую активность второй фотосистемы. Однако в отношении защиты фотосинтетического аппарата кетонсодержащий брассиностероид оказался эффективнее лактонсодержащего. Снижение накопления транскриптов гена *HvS40* при действии брассиностероидов на 5 сутки может свидетельствовать о замедлении развития старения в сравнении с суточным контролем. При этом для большинства анализируемых параметров гормоны играли решающую роль к пятым суткам воздействия. Таким образом, кетонсодержащий брассиностероид, как предшественник лактонсодержащего брассиностероида, не менее эффективен, а в некоторых случаях биологически более активен в отношении исследуемых показателей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-34-50076 мол\_нр.

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. Woo H.R., Koo H.J., Kim J., Jeong H., Yang J.O., Lee H., Jun J.H., Choi S.H., Park S.J., Kang B., Kim Y.W., Phee B.K., Kim J.H., Seo C., Park C., Kim S.C., Park S., Lee B., Hwang D., Nam H.G., Lim P.O. Programming of plant leaf senescence with temporal and inter-organelle coordination of transcriptome in *Arabidopsis* // Plant physiology. 2016. V. 171. P. 452. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01929>
2. Woo H.R., Kim H.J., Kim P.O., Nam H.G. Leaf senescence: systems and dynamics aspects // Annu Rev Plant Biol. 2019. V. 70. P. 347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095859>
3. Krieger-Liszkay A., Krupinska K., Shimakawa G. The impact of photosynthesis on initiation of leaf senescence // Physiologia plantarum. 2019. V. 166. № 1. P. 148. <https://doi.org/10.1111/ppl.12921>
4. Lakhvich F., Khrpach V., Zhabinskii V. The synthesis of brassinosteroids? A new class of plant hormones // Russian chemical reviews. 1991. V. 60. № 6. P. 658. <https://doi.org/10.1070/RC1991v060n06ABEH001100>
5. Khrpach V., Zhabinskii V., Groot A. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Annals of Botany. 2000. V. 86. № 3. P. 441. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1227>
6. Литвиновская Р.П. Применение фитогормональных стероидов в технологии выращивания карто-

- феля // Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты”. Томск, 2018. С. 15.
7. Kanwar M.K., Bajguz A., Zhou J., Bhardwaj R.J. Analysis of brassinosteroids in plants // *J Plant Growth Regul.* 2017. V. 36. P. 1002. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9732-4>
  8. Fedina E.O., Yarin A.Y., Mukhitova F.K., Blufard A.S., Chechetkin I.R. Brassinosteroid-induced changes of lipid composition in leaves of *Pisum sativum* L. during senescence // *Steroids.* 2017. V. 117. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.10.009>
  9. Zhao Y.J., Xu R.J., Luo W.H. Inhibitory effects of abscisic acid on epibrassinolide-induced senescence of detached cotyledons in cucumber seedlings // *Chin. Sci. Bull.* 1990. V. 35. P. 928.
  10. Saglam-Cag S. The effect of epibrassinolide on senescence in wheat leaves // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2007. V. 21. P. 63. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817415>
  11. Zhu T., Tan W.-R., Deng X.-G., Zheng T., Zhang D.-W., Lin H.-H. Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit // *Postharvest Biology and Technology.* 2015. V. 100. P. 196. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.016>
  12. Yin W., Yin Y., Dong N., Niu M., Zhang X., Li L., Liu J., Liu B., Tong H. Brassinosteroid-regulated plant growth and development and gene expression in soybean // *The Crop Journal.* 2019. V. 7. P. 411. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.10.003>
  13. Assis-Gomes M.D., Pinheiro D.T., Bressan-Smith R.E., Campostrini E. Exogenous brassinosteroid application delays senescence and promotes hyponasty in *Carica papaya* L. leaves // *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2018. V. 30. P. 193. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0114-5>
  14. Chory J., Nagpal P., Peto C.A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* 1991. V. 3. P. 445. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.5.445>
  15. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Барташевич Д.А., Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов В.В. Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. С. 32.
  16. Ефимова М.В., Литвиновская Р.П., Медведева Ю.В., Мурган О.К., Савчук А.Л., Кузнецов В.В., Хрипач В.А. Содержание и баланс эндогенных брассиностероидов у микроклонов картофеля определяется органо-специфичностью и скороспелостью сорта // *Доклады академии наук.* 2019. Т. 485. № 1. С. 117. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524851117-121>
  17. Кулаева О.Н. Цитокинины их структура и функция. Москва: Наука, 1973. 264 с.
  18. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302.
  19. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods enzymology.* 1987. V. 148. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
  20. Pfundel E. Junior-PAM Chlorophyll fluorometer: Operator's guide // Germany, Heinz Walz GmbH. 2007. P. 58.
  21. Ковтун И.С., Ефимова М.В. Особенности подбора праймеров конститутивного гена для проведения полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции // *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2013. № 2 (22). С. 160.
  22. Hua W., Zhu J., Shang Y., Wang J., Jia Q., Yang J. Identification of suitable reference genes for barley gene expression under abiotic stresses and hormonal treatments // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015. V. 33. P. 1002. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0807>
  23. Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., Zlobin I.E., Kreslavskii V.I., Murgan O.K., Kovtun I.S., Khrpach V.I.A., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants // *Photosynth. Res.* 2020. V. 146. P. 151. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00708-z>
  24. Castorina G., Consonni G. The role of brassinosteroids in controlling plant height in *Poaceae*: a genetic perspective // *International journal of molecular sciences.* 2020. V. 21. P. 1191. <https://doi.org/10.3390/ijms21041191>
  25. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development // *Plant Cell.* 2011. V. 23. P. 1219. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
  26. 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>
  27. Xu Y., Li K., Zhu K., Tian Y., Yu Q., Zhang W., Wang Z. Effect of exogenous plant hormones on agronomic and physiological performance of a leaf early-senescent rice mutant *osled* // *Plant Growth Regulation.* 2020. V. 92. P. 517. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00653-w>
  28. Sharma A., Shahzad B., Kumar V., Kohli S.K., Sidhu G.P.S., Bali A.S., Handa N., Kapoor D., Bhardwaj R., Zheng B. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 7. P. 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
  29. Rasool S., Hameed A., Azooz M.M., Rehman M., Siddiqi T.O., Ahmad P. Salt stress: causes, types and responses of plants // *Ecophysiology and responses of plants under salt stress.* Springer, New York, NY. 2013. P. 1.
  30. Alche J.D. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants // *Redox biology.* 2019. V. 23. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>

## ДЕЙСТВИЕ СТРЕССОВЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА МЕТАБОЛИЗМ СТЕРИНОВ *Triticum aestivum* L.

© 2021 г. А. Г. Ренкова<sup>a,\*</sup>, В. Р. Хабибрахманова<sup>b</sup>, Ю. Н. Валитова<sup>a</sup>,  
Ф. К. Мухитова<sup>a</sup>, Ф. В. Минибаева<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Казанский национальный исследовательский технологический университет”, Казань, Россия

<sup>c</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Казанский (Приволжский) федеральный университет”, Казань, Россия

\*e-mail: renkova@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 22.06.2020 г.

После доработки 21.07.2020 г.

Принята к публикации 21.07.2020 г.

Проблема стрессовой устойчивости сельскохозяйственных растений традиционно находится в фокусе пристального внимания исследователей. Как известно, яровая пшеница проявляет высокую чувствительность к действию различных стрессовых факторов. Важную роль в формировании стрессовой устойчивости растений играют вторичные метаболиты. В настоящей работе методами тонкослойной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии комплексно изучены состав и особенности изменения содержания тритерпенов и стериннов в корнях и листьях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при действии стрессовых фитогормонов – абсцизовой кислоты, метилжасмоната и салициловой кислоты. Выявлены значительные изменения тритерпенового и стеринового компонентов пшеницы, а также уровня транскриптов ключевых генов стеринового биосинтеза. Обнаружено, что листья и корни проростков пшеницы проявляют различную чувствительность к действию фитогормонов. Полученные данные способствуют расшифровке роли мембранных стериннов в стрессовых ответах растений.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, тритерпены, стерины, гены, фитогормоны

**DOI:** 10.31857/S0015330321020159

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема стрессовой устойчивости сельскохозяйственных растений – предмет пристального внимания исследователей в течение многих лет. Как известно, одна из важнейших сельскохозяйственных культур, пшеница, проявляет высокую чувствительность к действию различных стрессовых факторов. В связи с этим актуально выявление эндогенных механизмов защиты растений пшеницы с целью направленного повышения их устойчивости к действию неблагоприятных факторов окружающей среды. Важную роль в формировании стрессовой устойчивости растений играют вторичные метаболиты, в том числе изопреноиды,

фенолы, необычные жирные кислоты и другие соединения. К одной из самых многообразных и многочисленных групп вторичных метаболитов растений относятся изопреноиды. В эту группу входят тритерпены (C<sub>30</sub>) и стерины (C<sub>18</sub>–C<sub>29</sub>) – структурно разнообразные молекулы, которые, по большей части, недоступны химическому синтезу [1]. В растениях эти соединения синтезируются по мевалонатному пути из сквалена (рис. 1). В ходе биохимических превращений сначала образуются тритерпены – циклоартенол и ланостерин, из которых далее синтезируются различные стерины, такие как β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин [2]. Стерины являются важным структурным элементом биологических мембран, а также предшественниками регуляторных гормонов brassinosterоидов, регулирующих рост и развитие растений [3]. В отличие от животных и грибов, где преобладает один стерин (холестерин и эргостерин соответственно), растения характеризуются сложным стериновым со-

**Сокращения:** ГХ–МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия; МеЖ – метилжасмонат; СК – салициловая кислота; CAS – циклоартенол синтаза; CYP710A – C22-стерин десатураза; HMGR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктаза; SMT – C24-стерин метилтрансфераза; SQE – сквален эпоксидаза; SQS – сквален синтаза

ставом. В частности, стеринный профиль растений *Arabidopsis thaliana* включает в себя  $\beta$ -ситостерин в качестве основного соединения (64%), а также 24-метилхолестерин (11%), стигмастерин (6%), изофукостерин (3%) и брассикастерин (2%) и несколько других минорных стеринов [4]. Мевалонатный путь биосинтеза стеринов представляет собой последовательность более чем 30 ферментативно-катализируемых реакций, протекающих в мембранах (рис. 1) [2]. Ключевыми ферментами биосинтеза растительных стеринов, определяющих соотношение их молекулярных видов, являются С24-стерин метилтрансфераза 1 (SMT1), С24-стерин метилтрансфераза 2 (SMT2) и С22-стерин десатураза (CYP710A) [4–6].

С24-стерин метилтрансфераза катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина на субстрат с образованием метил-/этилстеринов. Выделяют два фермента SMT, катализирующих первичное и вторичное метилирование, соответственно, SMT1 и SMT2. Предполагают, что С24-метилирование является ключевым регулятором биосинтеза стеринов, от которого зависит получение конечного продукта. С22-стерин десатураза, или CYP710A, относится к подсемейству растительных белков цитохрома P450, семейства 710A, катализирует реакцию десатурации, в результате которой происходит образование стигмастерина из  $\beta$ -ситостерина. Показано, что данная реакция является важной точкой, координирующей соотношение  $\beta$ -ситостерина и стигмастерина, значительные изменения которого происходят в стрессовых условиях [5, 7, 8].

В настоящее время становится ясно, что наряду со структурной функцией, стеринны играют роль в регуляции внутриклеточных процессов. При действии различных стрессовых факторов меняется соотношение молекулярных видов стеринов и их общее содержание, происходит изменение содержания специфических вторичных метаболитов, в том числе тритерпенового ряда, и активности стресс-индуцируемых генов. Необходимым этапом при формировании ответной реакции растения на действие биотических и абиотических стрессовых факторов является выработка растительными клетками фитогормонов, таких как абсцизовая кислота (АБК), метилжасмонаты (МеЖ) и салициловая кислота (СК). Например, известно, что содержание АБК увеличивается при солевом стрессе и засухе, а МеЖ и СК при раневом стрессе и атаке патогенов [9, 10]. Кроме того, фитогормоны могут регулировать экспрессию многих генов, имеющих индуцируемые фитогормонами *цис*-регуляторные элементы в промоторах [11]. К сожалению, роль фитогормонов в регуляции биосинтеза тритерпенов и стеринов в клетках растений в условиях стресса остается малоизученной.

Цель работы – анализ качественных и количественных изменений содержания тритерпенов и стеринов, а также уровня транскриптов ключевых генов ферментов биосинтеза стеринов в корнях и листьях проростков яровой пшеницы при действии фитогормонов АБК, МеЖ и СК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

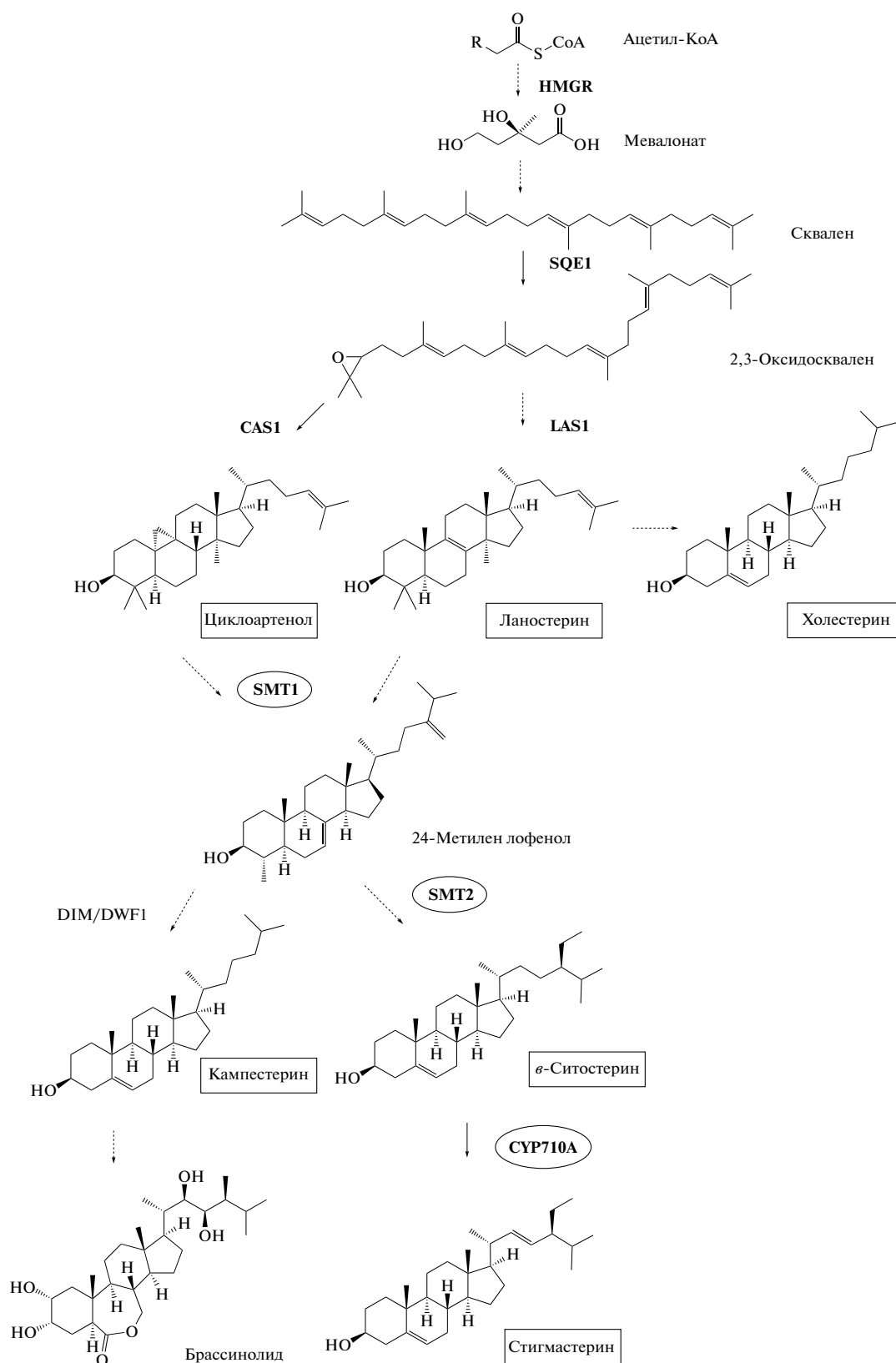
**Объект исследования.** В качестве объекта исследований использовали проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта “Казанская юбилейная”. Растения выращивали на 0.25 мМ CaCl<sub>2</sub> при температуре +22 ± 1° С и освещенности 100 Вт/м<sup>2</sup> с 12 ч фотопериодом в течение 4 суток. Затем растения перемещали в растворы фитогормонов АБК, МеЖ и СК в концентрациях 100 мкМ в течение 12 ч. Фитогормоны растворяли в 0.25 мМ CaCl<sub>2</sub>.

**Определение содержания тритерпенов и стеринов.** Образцы пшеницы экстрагировали смесью изопропанола и хлороформа. Для разделения и идентификации липидных соединений в полученных экстрактах использовали метод ТСХ. Исследование осуществляли на лабораторном комплексе для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (“САМАГ”, Швейцария). В состав комплекса входят приборы: Linomat 5 для автоматического нанесения образцов на ТСХ пластину, ADS 2 для элюирования ТСХ пластины в системе растворителей, TLS Scanner 3 для денситометрической обработки ТСХ пластин. Работа комплекса и обработка полученных результатов осуществлялась с помощью специализированной компьютерной программы winCATS, версия 1.4.9. Для количественного определения в образцах тритерпенов и стеринов использовали калибровочные графики по стандартам – циклоартенолу (08172, “Sigma-Aldrich”, США) и  $\beta$ -ситостерину (132720050, “Acros Organics”, Бельгия).

**Идентификация молекулярных видов стеринов.** Состав стеринов анализировали с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ–МС) (GC-17A/MS-QP5050, “Shimadzu”, Япония). Выделенные стеринны предварительно подвергали силилированию. Идентификацию стеринов проводили путем сравнения их времен удержания с достоверными стандартами масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометрической библиотеки данных ГХ–МС [12]. Количественную обработку осуществляли с использованием специализированной компьютерной программы UNICHROM (<http://www.unichrom.com>).

**Анализ экспрессии генов.** Относительный уровень транскриптов генов С24-стерин метилтрансфераз и С22-стерин десатураз определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ). Для этого были подобраны ген-специфичные прай-





**Рис. 1.** Схема пути биосинтеза стероидов у растений. HMGR – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктаза; SQE1 – сквален эпоксидаза; CAS1 – циклоартенол синтаза; LAS1 – ланостерин синтаза; SMT1/2 – C24-стерин метилтрансфераза; DIM/DWF1 – стерин- $\Delta$ 24-изомераз/редуктаза; CYP710A – C22-стерин десатураза. Пунктирные стрелки обозначают несколько ферментативных реакций. Прямоугольником показаны метаболиты, которые количественно были определены в этом исследовании. Овалом выделены ферменты, анализ генов которых проводился в данном исследовании.

**Таблица 1.** Содержание тритерпенов и стеридов в корнях и листьях проростков пшеницы при действии фитогормонов

Воздействие	Содержание, мкг/г сырой массы			
	тритерпены		стериды	
	корни	листья	корни	листья
Контроль	28.39 ± 1.15	261.71 ± 4.41	150.93 ± 1.18	305.89 ± 5.41
АБК	50.99 ± 1.77	544.20 ± 3.14	160.54 ± 0.72	492.09 ± 2.70
МеЖ	47.79 ± 0.99	213.62 ± 8.26	114.87 ± 1.13	576.49 ± 2.29
СК	14.45 ± 1.18	607.52 ± 10.8	117.69 ± 2.37	445.37 ± 4.13

меры с использованием Universal ProbeLibrary Assay Design Centre (<http://lifescience.roche.com/shop/en/global/overviews/brand/universal-probe-library>) и проведены эксперименты по оптимизации реакции при различной температуре и концентрации праймеров. Праймеры синтезировали в ЗАО “Евроген” (Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице S1 (Supplementary). Тотальную РНК пшеницы выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия), согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (“Bio-Rad”, США) с использованием набора MMLV RT Kit (“Евроген”, Россия). ПЦР–РВ проводили с использованием готовой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) при следующих условиях: 95°C – 5 мин, 40 циклов амплификации (95°C – 15 сек, 55/60°C – 10 сек, 72°C – 30 сек), 55/60°C – 0.5 сек, 95°C – 5 сек. Количество целевых транскриптов оценивали относительно стабильно экспрессирующихся транскриптов референсных генов, в качестве которых были использованы гены фактора АДФ-рибозилирования (*TaARF*), ингибитора РНКазы L-подобного белка (*TaRLI*) и белка контроля клеточного деления (*TaCDC*) [13]. Амплификацию и флуоресцентный мониторинг проводили с использованием системы детекции ПЦР–РВ CFX96 (“Bio-Rad”, США). Расчеты относительного содержания транскриптов были выполнены с использованием сравнительного ΔСТ метода [14]. Нуклеотидные последовательности исследуемых генов определяли с помощью ДНК-анализатора ABI 3130 Genetic Analyser (“Applied Biosystems”, США) [6].

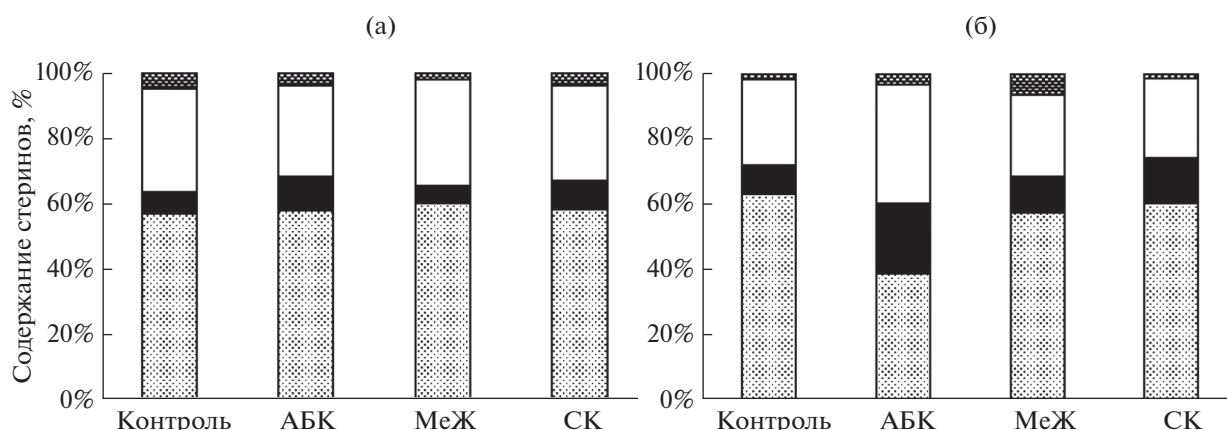
**Статистический анализ.** Все опыты проводили как минимум в трех биологических и четырех аналитических повторностях. В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента в Microsoft Excel 2013.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Количественное определение тритерпенов и стеридов в корнях и листьях проростков пшеницы*

Анализ тритерпенов и стеридов в растениях контрольного варианта показал, что их содержание было значительно выше в листьях, чем в корнях, почти в 10 и 2 раза, соответственно (табл. 1). При действии фитогормонов наблюдались изменения в содержании тритерпенов и стеридов в корнях и листьях проростков пшеницы. Воздействие АБК приводило к активации синтеза тритерпенов и стеридов в корнях и листьях. Содержание тритерпенов в исследуемых объектах увеличивалось в 2 раза по сравнению с контролем. В отличие от корней, в листьях проростков наблюдалось значительное возрастание (более чем в 1.5 раза) содержания стеридов в присутствии АБК (табл. 1). Действие МеЖ индуцировало обратные направленные изменения как в содержании тритерпенов, так и в содержании стеридов. Содержание тритерпенов в корнях увеличивалось, тогда как в листьях мы наблюдали незначительное уменьшение. Содержание стеридов, наоборот, уменьшалось в корнях и увеличивалось почти в 2 раза в листьях (табл. 1). Действие СК вызывало снижение содержания тритерпенов и стеридов в корнях проростков, тогда как в листьях их количество значительно возросло (табл. 1).

Качественный состав стеридов и их количество определили методом ГХ–МС. В корнях и в листьях пшеницы были обнаружены основные молекулярные виды стеридов – β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин и холестерин (рис. 2). Установлено, что при действии фитогормонов происходили изменения в содержании стеридов в корнях и листьях пшеницы. На рисунке 2 приведены данные расчета содержания идентифицированных стеридов в процентном соотношении. Значительные изменения в составе стеридов были выявлены при действии АБК на проростки пшеницы, наблюдалось увеличение содержания стигмастерина практически в 2 раза как в корнях, так и в листьях (рис. 2). Стоит отметить, что в листьях увеличение стигмастерина сопровождалось



**Рис. 2.** Содержание молекулярных видов стерина в корнях (а) и листьях (б) пшеницы при действии фитогормонов в процентном соотношении от общего количества стерина. Последовательность распределения стерина в гистограмме снизу вверх: β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин, холестерин. Представлены данные среднеарифметических значений из трех независимых повторностей. Относительное стандартное отклонение среднего не превышало 5%.

значительным уменьшением содержания β-ситостерина (рис. 2б). При действии МеЖ в листьях происходило увеличение доли холестерина, соотношение других видов стерина практически не менялось по сравнению с контролем. При действии СК мы также наблюдали увеличение содержания стигмастерина как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (рис. 2).

Отличительной структурной особенностью основных растительных стерина, по сравнению с холестерином, является наличие метильных или этильных групп при 24 атоме углерода боковой цепи [2]. По этому признаку растительные стерин делят на 24-метил- и этилстерин. Кампестерин содержит только одну метильную группу при С24, а β-ситостерин и стигмастерин характеризуются наличием этильной группы при С24. В настоящее время известно, что соотношение количества 24-метил-/этилстерина является важным показателем метаболизма растений, а его регуляция — ключевым звеном многих процессов роста, развития, а также стрессовых ответов растений [15].

Анализ изменений в соотношении 24-метил-/этилстерина в корнях и листьях проростков пшеницы при действии фитогормонов показал, что в растениях контрольного варианта соотношение содержания 24-метилстерина к 24-этилстеринам в листьях было ниже, чем в корнях (табл. 2). При действии АБК в корнях соотношение количества 24-метил-/этилстерина не меня-

лось, тогда как в листьях увеличивался показатель соотношения, что говорит об увеличении доли относительного содержания кампестерина. При действии МеЖ незначительно увеличивалась доля метилстерина в корнях, тогда как в листьях она оставалась прежней. При действии СК соотношение количества 24-метил-/этилстерина в корнях также оставалось неизменным, тогда как в листьях наблюдалось уменьшение соотношения 24-метил-/этилстерина вследствие увеличения относительной доли 24-этилстерина — β-ситостерина и стигмастерина (табл. 2).

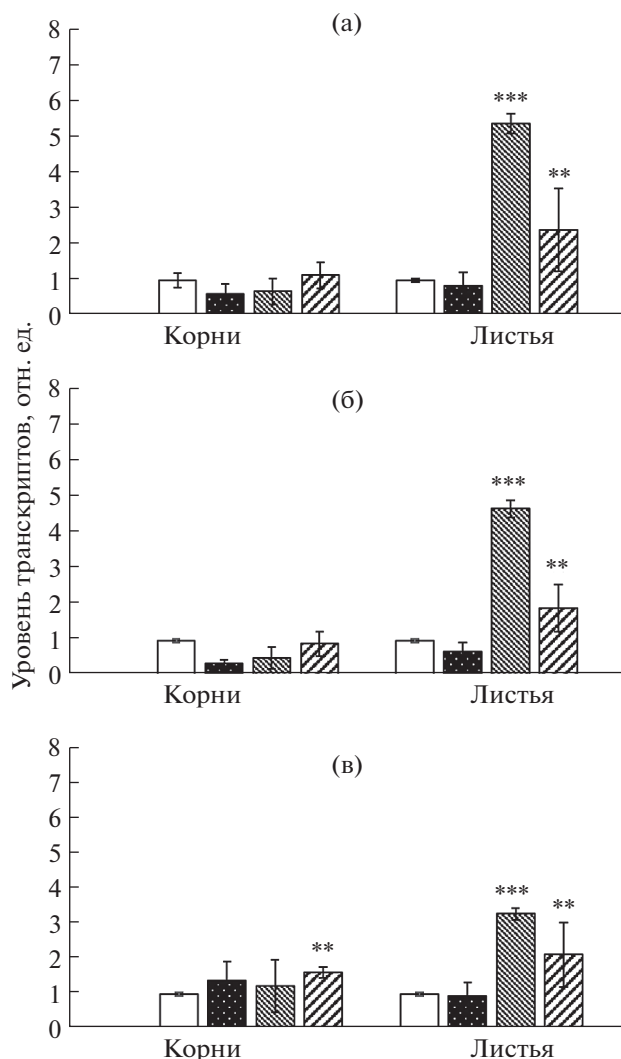
Можно полагать, что изменения содержания тритерпенов и стерина при действии фитогормонов обусловлены также изменениями на геномном уровне. В связи с этим, нами был проведен анализ уровня транскриптов генов, контролирующих биосинтез стерина.

#### *Экспрессия генов биосинтеза стерина при действии фитогормонов*

Известно, что мягкая пшеница (*T. aestivum*) обладает одним из сложнейших геномов, встречаемых у растений. Аллогексаплоидный геном пшеницы ( $2n = 6x = 42$ , AABBDD) образован в ходе естественной гибридизации трех геномов. В связи с этим многие гены у данного злака представлены в трех гомеологичных копиях. Нуклеотидные последовательности генов *TaSMT1* были ранее нами кло-

**Таблица 2.** Соотношение 24-метил-/этилстерина в корнях и листьях проростков пшеницы при действии фитогормонов

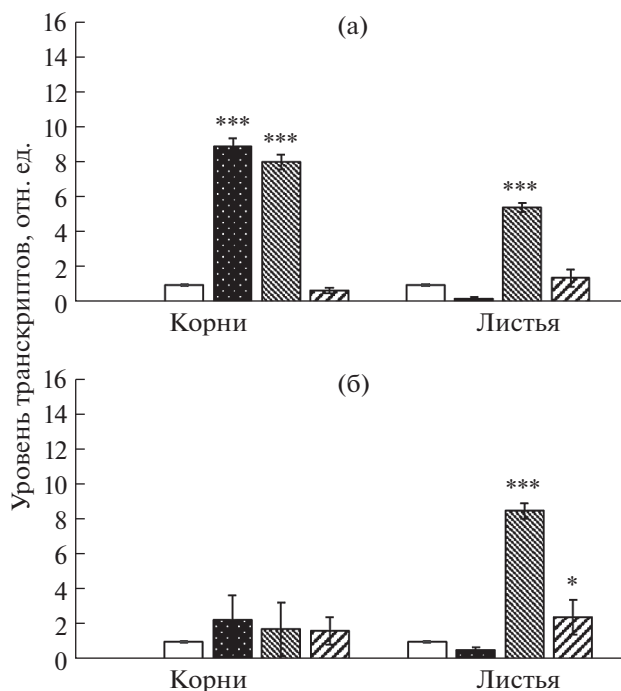
	Контроль	АБК	МеЖ	СК
Корни	0.43 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.50 ± 0.08	0.43 ± 0.01
Листья	0.35 ± 0.02	0.60 ± 0.07	0.37 ± 0.01	0.32 ± 0.01



**Рис. 3.** Влияние фитогормонов на уровень транскриптов генов *TaSMT1-5A* (а) и *TaSMT1-4D* (б) и *TaSMT2* (в) в корнях и листьях пшеницы. Варианты воздействий (слева направо): контроль, АБК, МеЖ, СК. Уровень транскриптов контрольных вариантов принят за единицу. Различия достоверны при \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  и \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

нированы и секвенированы [6], нуклеотидные последовательности генов *TaSMT2* и *TaCYP710A8* были взяты из статьи Tang с соавт. [16]. Кроме того, ранее нами было проведено секвенирование промоторных областей генов *TaSMT1-5A/-4B/-4D* и их анализ на наличие консервативных сайтов, а также стресс-чувствительных *цис*-элементов [6].

Так, относительное содержание транскриптов генов *TaSMT1-5A*, *TaSMT1-4D* и *TaSMT2* при действии всех фитогормонов практически не изменялось в корнях проростков пшеницы, лишь незначительное повышение уровня транскриптов гена *TaSMT2* мы наблюдали при действии СК (рис. 3в). В листьях так же, как и в корнях, действие АБК не вызывало изменений в уровне тран-



**Рис. 4.** Влияние фитогормонов на уровень транскриптов генов *TaCYP710A8-3A* (а) и *CYP710A8-3B/3D* (б) в корнях и листьях пшеницы. Варианты воздействий (слева направо): контроль, АБК, МеЖ, СК. Уровень транскриптов контрольных вариантов принят за единицу. Различия достоверны при \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  и \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

скриптов генов *TaSMT1* и *TaSMT2* (рис. 3). Напротив, в листьях при действии МеЖ уровень транскриптов генов *TaSMT1-5A* и *TaSMT1-4D* увеличивался в 5 раз, а *TaSMT2* в 3 раза. Влияние СК также повышало уровень транскриптов генов *TaSMT1* и *TaSMT2* примерно в 2 раза (рис. 3).

Анализ генов *CYP710A8* показал, что при действии АБК в корнях наблюдалось 10-кратное увеличение относительного содержания транскриптов гена *TaCYP710A8-3A*, а уровень транскриптов *TaCYP710A8-3B/3D* повышался незначительно (рис. 4). В листьях, напротив, изменения уровня транскриптов генов *TaCYP710A8* не происходило. Действие МеЖ также индуцировало повышение уровня транскриптов гена *TaCYP710A8-3A* в корнях в 8 раз, а в листьях в 6 раз (рис. 4а). Относительное содержание транскриптов другого гена, *TaCYP710A8-3B/3D*, в корнях практически оставалось на уровне контроля, а в листьях значительно повышалось (в 8 раз) (рис. 4б). Действие СК индуцировало только повышение уровня транскриптов генов *TaCYP710A8-3B/3D* примерно в 3 раза в листьях (рис. 4б) и не приводило к значительным изменениям уровня транскриптов генов *TaCYP710A8* в корнях проростков пшеницы (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Растения обладают богатым стеринным составом, что определяет их вовлечение в разнообразные процессы жизнедеятельности растения, в том числе, в их ответы на стрессовые факторы. Стерины являются важными компонентами клеточных мембран, а также предшественниками гормонов brassinosterоидов, участвующих в регуляции роста растений. Тритерпены – вторичные метаболиты, участвующие, в том числе, в защитных реакциях растений. Путь биосинтеза стеринов при стрессе может претерпевать различные изменения, приводя к накоплению промежуточных соединений, которые могут способствовать адаптации растений к воздействиям неблагоприятных факторов окружающей среды. Циклоартенол и ланостерин являются тритерпенами и представляют собой промежуточные продукты биосинтеза стеринов. Их накопление может привести к активации генов ферментов биосинтеза стеринов и, соответственно, к увеличению их содержания. Результаты наших экспериментов показали, что листья и корни проростков пшеницы проявляют различную чувствительность к действию стрессовых фитогормонов.

АБК контролирует в растениях множество жизненно важных процессов, таких как регуляция покоя семян и почек, ранние этапы онтогенеза, закрывание устьиц, ответные реакции растений на стрессовые воздействия – засуху, засоление, пониженную температуру [9]. Показано, что растительные стерины предотвращают вызванное АБК нарушение искусственных бислоев фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин. Влияние АБК на мембраны в равной степени ингибируется растительными стеринами и холестерином, что может свидетельствовать об участии растительных стеринов в контроле негативного действия АБК на мембраны [17]. Экзогенное действие АБК на растения *Cannabis sativa* L. индуцировало накопление вторичных метаболитов, таких как  $\alpha$ -токоферол и тетрагидроканнабинол, и значительно снижало содержание хлорофилла, каротиноидов, сквалена, стигмастерина,  $\beta$ -ситостерина, а также активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (HMGR) [18]. В наших экспериментах при действии АБК мы наблюдали увеличение абсолютного содержания тритерпенов и стеринов как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (табл. 1). Можно полагать, что в растениях при действии АБК происходят изменения в состоянии мембран, что, в свою очередь, индуцирует накопление промежуточных (циклоартенола и ланостерина) и конечных (стеринов) продуктов мевалонатного пути биосинтеза.

Жасмонаты обладают разнообразной биологической активностью, включая ингибирование прорастания семян и пыльцы или ингибирование

роста корней и активности фотосинтетического аппарата [19]. Известно, что МеЖ индуцирует биосинтез многих вторичных метаболитов, играющих важную роль в адаптации растений к биотическому стрессу [20]. Наиболее значимой функцией МеЖ является участие в ответных реакциях при повреждении растений патогенами и насекомыми. СК является ключевой сигнальной молекулой в регуляции защиты растений от патогенов. Действие МеЖ и СК вызывает у растений состояние, возникающее при атаке патогенов, в результате чего происходит увеличение концентрации метаболитов, участвующих в защитных механизмах. В некоторых работах МеЖ и СК использовали как индукторы синтеза флавоноидов и полифенолов в клеточной суспензии, каллусах и тканевых культурах различных семейств растений [21]. У *Medicago truncatula* МеЖ индуцирует накопление сапонинов и активность генов, кодирующих ранние ферменты образования тритерпенового агликона в культурах клеточной суспензии [22]. В наших экспериментах при действии МеЖ была выявлена обратная взаимосвязь между изменениями в содержании тритерпенов и стеринов. Уменьшение содержания стеринов в корнях сопровождалось увеличением содержания тритерпенов, а в листьях, напротив, в присутствии МеЖ уменьшение тритерпенов сопровождалось увеличением стеринов (табл. 1). Наличие таких согласованных изменений тритерпенов и стеринов может свидетельствовать об общей функциональной активности этих метаболитов и предполагает компенсаторный характер изменений. При действии СК мы наблюдали прямую зависимость изменений содержания тритерпенов и стеринов (табл. 1). Снижение уровня тритерпенов в корнях на фоне СК сопровождалось снижением стеринов, а значительное повышение уровня тритерпенов в листьях – увеличением стеринов. Аналогичный эффект был показан в одной из работ, где экзогенное применение СК значительно увеличивало синтез вторичных метаболитов (кумаринов, стеринов, ксантопротеинов, сердечных гликозидов и сапонинов) в листьях растений *Simarouba glauca* в условиях водного стресса [23]. Таким образом, значительные изменения при действии всех фитогормонов наблюдались в содержании тритерпенов по сравнению с изменениями уровня стеринов, что, возможно, связано с более ранним образованием тритерпеновых продуктов в процессе биосинтеза стеринов.

В условиях стресса важным для обеспечения функциональной активности мембран является поддержание соотношения 24-метил-/этилстеринов. Ранее нами было показано увеличение относительного содержания 24-этилстеринов в листьях пшеницы в условиях кратковременного холодового стресса, что, возможно, является одним из механизмов, способствующих повышению устойчивости мембран к изменению температур. Более дли-

тельное (12 ч) воздействие низкой температуры сопровождалось восстановлением соотношения 24-метил-/этилстерина до контрольного уровня и в корнях, и в листьях [24]. В настоящих экспериментах заметные изменения соотношения 24-метил-/этилстерина в сторону увеличения доли метилстерина наблюдались в корнях при действии МеЖ и в листьях при действии АБК (табл. 2). В листьях при действии СК обнаружено небольшое увеличение доли этилстерина, главным образом, стигмастерина. Содержание стигмастерина в корнях и листьях увеличивалось при действии АБК и СК (рис. 2). Известно, что активация синтеза стигмастерина происходит во время абиотического стресса, гравистимуляции, атаки патогенов и в ответ на сигнальные молекулы, такие как АБК, МеЖ, СК, кальций ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [25]. В растениях *A. thaliana* показано патоген-индуцированное увеличение содержания стигмастерина, что, в свою очередь, приводило к уменьшению проницаемости мембран и, как следствие, к повышению устойчивости растения к неспецифическому патогену. Мутанты *A. thaliana* с нуль-мутацией гена *Atcyp710a1* имели повышенную чувствительность к бактериальным патогенам [5, 7].

Как отмечалось выше, баланс между 24-метил- и этилстеринами специфичен для отдельного вида растения, органа и ткани. Предполагается, что изменение состава и соотношения различных типов стерина является ключевым звеном регуляции многих клеточных процессов [15]. В частности, соотношение 24-метил- и этилстерина определяется активностью ферментов С24-стерин метилтрансфераз, которые катализируют реакцию метилирования 24 атома углерода боковой цепи стерина. Соотношение  $\beta$ -ситостерина и стигмастерина, в свою очередь, определяется активностью С22-стерин десатуразы. Можно полагать, что количественные и качественные изменения стерина при действии фитогормонов обусловлены изменениями на уровне транскриптов. Анализ относительного содержания транскриптов *TaSMT1* и *TaSMT2* при действии АБК не выявил изменений как в корнях, так и в листьях проростков пшеницы (рис. 3). Возможно, имеющегося пула транскриптов данных генов было достаточно, однако анализ уровня транскриптов *TaCYP710A8-3A* показал его значительное повышение в корнях (рис. 4а). Действие МеЖ в корнях индуцировало повышение уровня транскриптов только одного гена *TaCYP710A8-3A* (рис. 4а). Значительное повышение уровня транскриптов пяти исследованных генов биосинтеза стерина было выявлено в листьях (рис. 3, 4). Эти данные согласуются с увеличением количественного содержания стерина в листьях. При действии СК в корнях наблюдалось незначительное повышение уровня транскриптов только одного гена, *TaSMT2* (рис. 3в). В листьях, напротив, уровень транскриптов всех исследуемых ге-

нов *TaSMT1*, *TaSMT2* и *TaCYP710A8* повышался (рис. 3, 4), что также согласуется с повышением содержания стерина в листьях (табл. 1). Сложно говорить о прямой связи между активацией генов и увеличением продукта, поскольку биосинтез любого продукта является многофакторным процессом. В работе Wentzinger с соавт. [26] показано, что ингибирование ферментов сквален синтазы (SQS) и сквален эпоксидазы (SQE) в клетках табака сопровождалось повышением активности HMGR и снижением содержания стерина. Анализ экспрессии генов *GmSMT2* в сое выявил, что биотические и абиотические факторы, в том числе обезвоживание, холод и АБК, индуцировали экспрессию этих генов в ходе роста проростков [27]. Анализ уровня транскриптов другого гена изопреноидного пути показал, что мРНК гена *BfSQS1* у *Bupleurum falcatum* L. накапливается повсеместно в органах растений и заметно увеличивается в корнях после обработки МеЖ и АБК [28]. Обнаружено влияние МеЖ в качестве элиситора на уровни экспрессии генов, участвующих в изопреноидном пути метаболизма тритерпенов, таких как *CaSQS* (*Centella asiatica*), *CabAS* (*C. asiatica*  $\beta$ -амирин синтаза) и *CaCAS*, в культивируемых клетках центеллы [29, 30].

Транскрипционная регуляция играет важную роль в активации или подавлении экспрессии генов и в значительной степени контролируется промоторными областями генов с помощью *cis*-элементов [11]. Секвенирование и анализ промоторных областей гомеологичных генов *TaSMT1*, проведенный нами ранее, показал наличие и АБК- и МеЖ- и СК- и элиситор-чувствительных элементов [6]. Можно предположить, что действие фитогормонов на относительное содержание транскриптов генов стеринового биосинтеза различалось в зависимости от наличия того или иного *cis*-элемента.

Таким образом, нами выявлены изменения тритерпенового и стеринового компонента в проростках пшеницы при действии стрессовых фитогормонов. Полученные данные способствуют расшифровке регуляторных функций мембранных стерина растений.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН, а также при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00988 (для А.Г. Ренковой и Ю.Н. Валитовой), гранта Президента РФ МК-264.2020.4 (для А.Г. Ренковой) и частично Программы Повышения Конкуренентоспособности КФУ (для Ф.В. Минибаевой).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A.* Triterpene biosynthesis in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. P. 225. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
2. *Benveniste P.* Biosynthesis and accumulation of sterols // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 429. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141616>
3. *Schaller H.* The role of sterols in plant growth and development // *Prog. Lipid Res.* 2003. V. 42. P. 163. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00047-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00047-4)
4. *Schaeffer A., Bronner R., Benveniste P., Schaller H.* The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2:1 // *Plant J.* 2001. V. 25. P. 605. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00994.x>
5. *Griebel T., Zeier J.* A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions // *Plant J.* 2010. V. 63. P. 254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>
6. *Renkova A., Valitova J., Schaller H., Minibayeva F.* The homoeologous genes encoding C24-sterol methyltransferase 1 in *Triticum aestivum*: structural characteristics and effects of cold stress // *Biologia Plantarum.* 2019. V. 63. P. 59. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.008>
7. *Wang K., Senthil-Kumar M., Ryu C.M., Kang L., Mysore K.S.* Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1789. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189217>
8. *Senthil-Kumar M., Wang K., Mysore K.S.* AtCYP710A1 gene-mediated stigmasterol production plays a role in imparting temperature stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8. P. e23142-1. <https://doi.org/10.4161/psb.23142>
9. *Finkelstein R.R., Gampala S.S.L., Rock C.D.* Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings // *Plant Cell.* 2002. V. 14 (Suppl). P. s15. <https://doi.org/10.1105/tpc.010441>
10. *Beckers G.J., Spoel S.H.* Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate // *Plant Biol. (Stuttg.)* V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872705>
11. *Zou C., Sun K., Mackaluso J.D., Seddon A.E., Jin R., Thomashow M.F., Shiu S.H.* Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 14992. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103202108>
12. *McLafferty F.W., Stauffer D.A., Loh S.Y., Wesdemiotis C.* Unknown identification using reference mass spectra. Quality evaluation of databases // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999. V. 10. P. 1229. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00104-X)
13. *Paolacci A.R., Tanzarella O.A., Porceddu E., Ciaffi M.* Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat // *BMC Mol. Biol.* 2009. V. 10. P. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-11>
14. *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. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
15. *Dufoure E.J.* The role of phytosterols in plant adaptation to temperature // *Plant Signal. Behav.* 2008. V. 3. P. 133. <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.5051>
16. *Tang J., Ohyama K., Kawaura K., Hashinokuchi H., Kamiya Y., Suzuki M., Muranaka T., Ogihara Y.* A new insight into application for barley chromosome addition lines of common wheat: achievement of stigmasterol accumulation // *Plant Physiol.* 2011. V. 157. P. 1555. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183533>
17. *Stillwell W., Cheng Y.F., Wassall S.R.* Plant sterol inhibition of abscisic acid-induced perturbations in phospholipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. V. 1024. P. 345. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90364-t](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90364-t)
18. *Mansouri H., Asrar Z.* Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in *Cannabis sativa* at vegetative stage // *Biologia Plantarum.* 2012. V. 56. P. 153. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0033-2>
19. *Rossato L., MacDuff J.H., Laine P., Le Deunff E., Ourry A.* Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1131. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1131>
20. *Martin D., Tholl D., Gershenzon J., Bohlmann J.* Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 1003. <https://doi.org/10.1104/pp.011001>
21. *Manivannan A., Soundararajan P., Park Y.G., Jeong B.R.* Chemical elicitor-induced modulation and antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. P. 399. <https://doi.org/10.3390/ijms17030399>
22. *Suzuki H., Reddy M.S., Naoumkina M., Aziz N., May G.D., Huhman D.V., Sumner L.W., Blount J.W., Mendes P., Dixon R.A.* Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula* // *Planta.* 2005. V. 220. P. 696. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1387-2>
23. *Awate P.D., Gaikwad D.K.* Influence of growth regulators on secondary metabolites of medicinally important oil yielding plant *Simarouba glauca* DC. under water stress conditions // *J. Stress Physiol. Biochem.* 2014. V. 10. P. 222.
24. *Valitova J., Renkova A., Mukhitova F., Dmitrieva S., Minibayeva F.* Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 142. P. 452. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.026>
25. *Aboobucker S.I., Suza W.P.* Why Do Plants Convert Sitosterol to Stigmasterol? // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 354. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00354>

26. *Wentzinger L.F., Bach T.J., Hartmann M.A.* Inhibition of squalene synthase and squalene epoxidase in tobacco cells triggers an up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 334.  
<https://doi.org/10.1104/pp.004655>
27. *Neelakandan A.K., Nguyen T.M., Kumar R., Tran L.S., Guttikonda S.K., Quach T.N., Aldrich D.L., Nes W.D., Nguyen H.T.* Molecular characterization and functional analysis of *Glycine max* sterol methyl transferase 2 genes involved in plant membrane sterol biosynthesis // *Plant Mol. Biol.* 2010. V. 74. P. 503.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-010-9692-6>
28. *Kim Y.S., Cho J.H., Park S., Han J.Y., Back K., Choi Y.E.* Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum* // *Planta.* 2011. V. 233. P. 343.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-010-1292-9>
29. *Kim O.K., Kim M.Y., Hwang S.J., Ahn J.C., Hwang B.* Cloning and molecular analysis of cDNA encoding cycloartenol synthase from *Centella asiatica* (L.) Urban // *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2005. V. 10. P. 16.  
<https://doi.org/10.1007/BF02931177>
30. *Mangas S., Bonfill M., Osuna L., Moyano E., Tortoriello J., Cusido R.M., Piñol M.T., Palazón J.* The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants // *Phytochemistry.* 2006. V. 67. P. 2041.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.025>



УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ И ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

© 2021 г. А. А. Игнатенко<sup>а, \*</sup>, В. В. Таланова<sup>а</sup>, Н. С. Репкина<sup>а</sup>, А. Ф. Титов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии – обособленное подразделение

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра  
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: angelina911@ya.ru

Поступила в редакцию 19.05.2020 г.

После доработки 06.07.2020 г.

Принята к публикации 06.07.2020 г.

Изучено влияние салициловой кислоты (СК) на реакцию растений огурца (*Cucumis sativus* L.) на действие низких положительных температур. Установлено, что обработка СК способствует снижению выхода электролитов из тканей семядольных листьев проростков, подвергнутых действию субповерхностной (12°C) и повреждающей (4°C) температур. В листьях проростков, обработанных СК и подвергнутых действию холода, зафиксирована более высокая активность супероксиддисмутазы, каталазы и гваякол-специфичной пероксидазы, а также выявлено усиление накопления транскриптов кодирующих их генов (*CuZnSOD* и *CAT*) по сравнению с контрольным вариантом (без обработки СК). В условиях действия на проростки низких температур (12°C и 4°C) СК также снижала образование одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида в листьях проростков. Сделан вывод, что при действии на проростки огурца низких положительных температур СК оказывает защитный эффект, который выражается в активизации работы антиоксидантных ферментов и снижении уровня окислительного стресса.

**Ключевые слова:** *Cucumis sativus*, салициловая кислота, низкие положительные температуры, окислительный стресс, антиоксидантная система

**DOI:** 10.31857/S0015330321020056

### ВВЕДЕНИЕ

Фитогормоны являются важнейшими компонентами регуляторной системы растений, играя ключевую роль не только в контроле их роста и развития, но и активно участвуя в защитно-приспособительных реакциях [1]. Особый интерес представляют те из них, которые способны стимулировать рост растений и одновременно с этим являются индукторами неспецифической устойчивости [2]. К их числу, в частности, относится салициловая кислота.

Салициловая, или 2-гидроксibenзойная кислота (СК) – физиологически активное природное соединение, биосинтез которого осуществляется по фенилпропаноидному (основной) или изохоризматному путям [3, 4]. В клетках растений СК представлена в свободной форме и/или в виде производных – конъюгатов с аминокислотами, метилсалицилата, β-D-глюкозида, эфиров глюкозинов и др. [5]. В норме большинство синтезированных молекул СК находится в клетке в форме биологически неактивных производных, которые при необходимости могут быть преобразованы в свободную активную форму [6].

СК участвует в регуляции многих физиологических процессов в растениях, включая рост и развитие (прорастание семян, вегетативный рост, цветение, созревание плодов, старение и др.), фотосинтез, транспирацию, термогенез, транспорт органических веществ, гравитропизм и др. [4, 6, 7]. Но особый интерес СК и ее производные вызывают в связи с их способностью индуцировать системную приобретенную устойчивость при инфицировании патогенами [8], формирование которой обусловлено накоплением так называемых PR-белков (*Pathogenesis Related proteins*), или белков, связанных с патогенезом. В последние годы накапливаются данные, свидетельствующие о способности СК оказывать защитное действие на растения и при действии стресс-факторов абиотической природы. Так, выявлено, что СК индуцирует повышение устойчивости растений к засухе [9], высоким температурам [10] и тяжелым металлам [11]. Что касается низких температур, при их действии в клетках растений обнаружено увеличение эндогенного уровня СК и повышение активности ферментов, участвующих в ее биосинтезе [12, 13]. Кроме того показано, что экзогенные СК и ее производные участвуют в сниже-

нии негативного действия холода на растения, включая такие теплолюбивые культуры, как томат, рис, кукуруза, огурец, перец, баклажан, олива, банан [3, 12–16]. Роль СК в повышении холодоустойчивости растений связывают с поддержанием ростовых процессов [3], фотосинтеза [8], снижением интенсивности окислительного стресса [13], стабилизацией клеточных мембран [16], активизацией альтернативной оксидазы [14], увеличением уровня пролина [16], аскорбата и глутатиона [15], усилением экспрессии генов белков холодового шока [12] и др. Высказано мнение, что важную роль в проявлении защитного эффекта СК при действии на растения низких температур может играть ее способность активизировать работу антиоксидантных ферментов [7, 13, 16]. Однако следует отметить, что имеющиеся в литературе сведения о регуляции их активности СК зачастую носят противоречивый характер. В частности, результаты одних исследований указывают на повышение активности антиоксидантных ферментов под влиянием СК у теплолюбивых растений в условиях гипотермии [12], а из других следует, что экзогенная СК вызывает снижение их активности [17]. В одной из работ [17] высказано предположение, что именно уменьшение активности антиоксидантных ферментов, индуцируемое СК, приводит к снижению устойчивости растений к низкой температуре. Еще в меньшей степени исследовано влияние экзогенной СК на экспрессию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, у растений, испытывающих действие низких температур [12, 15].

Учитывая это, в настоящей работе изучено влияние экзогенной СК на устойчивость, активность антиоксидантных ферментов и содержание транскриптов кодирующих их генов в листьях типичного представителя теплолюбивых растений — огурца (*Cucumis sativus* L.), при действии на него низких положительных температур.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны растения огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля. Их выращивали на модифицированном питательном растворе Кнопа, содержащем 3.15 мМ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.55 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.55 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 24 мкМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 21 мкМ  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 10 мкМ  $\text{MnSO}_4$ , 3.1 мкМ  $\text{CuSO}_4$ , 2.55 мкМ  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , 1.55 мкМ  $\text{ZnSO}_4$  и 5 мМ  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , в контролируемых условиях: при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности ФАР 180 мкмоль/м<sup>2</sup>·с и фотопериоде 14 ч. По достижении недельного возраста растения помещали на раствор СК (“Sigma-Aldrich”, США) и через 1 сут подвергали воздействию температуры 12°C или 4°C в камере искусственного климата (ВКШ-73, Россия), со-

храняя прочие условия неизменными. При этом часть растений на протяжении всего опыта находилась на питательном растворе без добавления СК. Эти растения служили контролем, отражающим характер изменения изучаемых показателей при действии только низких температур.

Выбор низких температур (12°C и 4°C) и продолжительности (3 сут) их действия основан на результатах предыдущих исследований [1, 18]. Используемая в опытах концентрация СК (100 мкМ) была также выбрана на основании предварительных экспериментов. Все измерения проводили на семядольных листьях.

Проницаемость мембран клеток определяли по выходу электролитов из высечек листьев с использованием кондуктометра (“HANNA”, Италия). Полный выход электролитов определяли по электропроводности вытяжки после разрушения мембран кипячением. Результирующий выход электролитов рассчитывали в процентах от полного выхода [19].

Интенсивность ПОЛ в листьях оценивали по накоплению продукта окисления — МДА, по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [20]. Для этого навеску (0.1 г) растительного материала (листья) гомогенизировали в смеси, содержащей трихлоруксусную кислоту и тиобарбитуровую кислоту. Гомогенат центрифугировали (“BR 4i”, Франция) в течение 15 мин при 10000 г и температуре 4°C, затем нагревали при 95°C в течение 30 мин, охлаждали во льду 5 мин и вновь центрифугировали 5 мин при 10000 г. Содержание МДА определяли на спектрофотометре СФ-2000 (“Спектр”, Россия), измеряя оптическую плотность при 532 нм и неспецифическое поглощение при 600 нм. Для расчета содержания МДА использовали коэффициент молярной экстинкции, равный 155 л / (ммоль см).

Для определения активности антиоксидантных ферментов навеску листьев (0.3 г) гомогенизировали на льду в К-, Na-фосфатном буфере, рН 7.8. Далее гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 14000 г и температуре 4°C. Супернатант использовали для определения активности ферментов.

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически при 560 нм по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия до формазана [21]. Активность каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) определяли по ферментативному разложению  $\text{H}_2\text{O}_2$  при 240 нм [22] и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции  $\epsilon = 39.6$  л/(моль см). Об активности гваякол-специфичной пероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) судили по увеличению оптической плотности при 470 нм в результате окисления гваякола ( $\epsilon = 26.6$  л/(моль см)) в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  [23].

Общее содержание белка анализировали методом Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [24].

Накопление транскриптов генов *CuZnSOD* и *SAT* определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Навеску листьев (0.05 г) растирали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA (“Синтол”, Россия). Количество и качество тотальной РНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (“Био-Рад”, США) по соотношению длин волн 260/280 и с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (“Синтол”, Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с обратной транскриптазой MMLV и случайными (random) гексапраймерами (“Евроген”, Россия) (Supplementary, Table S1). В качестве референсного гена использовали актин *C. sativus*. Количество и качество синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (“Био-Рад”, США). Амплификацию образцов проводили на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Био-Рад”, США), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (“Евроген”, Россия). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР, оцениваемая по стандартной кривой, достигала 98%. Содержание транскриптов генов вычисляли по формуле  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и выражали в относительных единицах. В качестве контрольных образцов были выбраны кДНК, выделенные из растений, не подвергавшихся действию низких температур и обработке СК.

Биологическая повторность в пределах каждого варианта опыта в зависимости от анализируемого показателя была 3–5-кратной, аналитическая – 3-кратной. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз. Статистическую значимость различий между средними значениями определяли при  $P < 0.05$  на основе дисперсионного анализа (LSD-тест) с использованием программного обеспечения Statgraphics (v. 2.1). На рисунках и в таблице представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что действие низких температур (12°C и 4°C) на растения огурца вызывает повышение выхода электролитов из листьев (рис. 1). При температуре 12°C его увеличение наблюдалось только в течение 24 ч и было относительно небольшим (рис. 1а), а при 4°C проницаемость мембран значительно возрастала в течение всего опыта (рис. 1б). Обработка растений СК (100 мкМ) вызывала снижение экзоосмо-

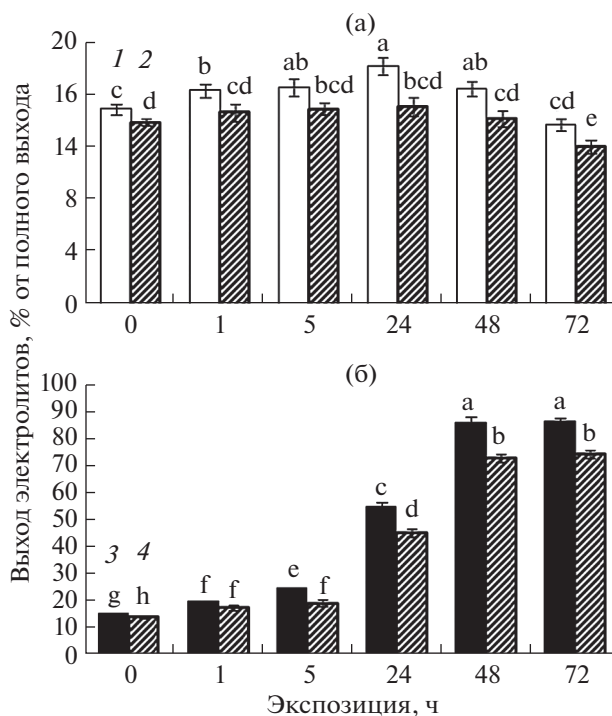


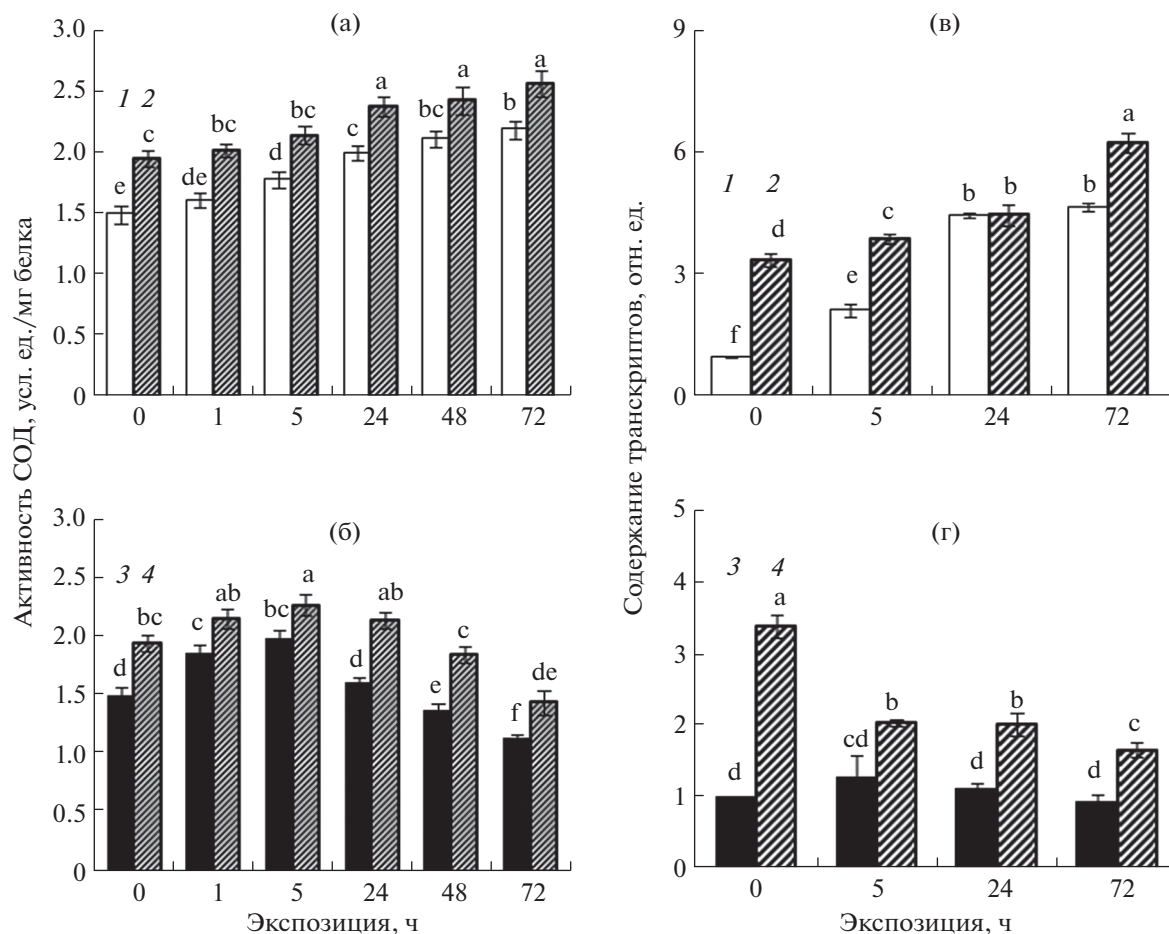
Рис. 1. Влияние СК (100 мкМ) на выход электролитов из листьев огурца при действии низких температур – 12°C (а) и 4°C (б). Варианты: 1 – 12°C; 2 – 12°C + СК; 3 – 4°C; 4 – 4°C + СК. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые отличия между средними значениями при  $P < 0.05$ .

са электролитов еще до начала холодových воздействий (при 22°C) (рис. 1). В условия холода (12°C и 4°C) под влиянием СК в течение всего эксперимента был зарегистрирован более низкий уровень выхода электролитов из тканей листьев по сравнению с вариантом без обработки проростков СК.

Действие низких температур (12°C и 4°C) приводило также к накоплению одного из конечных продуктов ПОЛ – МДА (табл. 1). При этом к концу опыта (72 ч) его содержание при 12°C повысилось относительно исходного уровня примерно в 2 раза, а при 4°C – примерно в 5 раз (табл. 1). Обработка проростков СК вызывала небольшое (на 15% относительно исходных значений) увеличение уровня МДА в листьях при 22°C (табл. 1). При действии на проростки низких температур, как 12°C, так и 4°C, в листьях проростков, обработанных СК, выявлено меньшее содержание МДА, причём на протяжении всего опыта (табл. 1).

При воздействии на растения огурца низких температур в их листьях уже через 1 ч зафиксировано повышение активности СОД (рис. 2а, б).

С увеличением продолжительности действия температуры 12°C активность СОД (рис. 2а) и содержание мРНК кодирующего ее гена *CuZnSOD* (рис. 2в) продолжали возрастать, тогда как при 4°C активность фермента снижалась уже че-



**Рис. 2.** Влияние СК (100 мкМ) на активность СОД (а, б) и содержание транскриптов гена *CuZnSOD* (в, г) в листьях огурца при действии низких температур. Варианты: 1 – 12°C; 2 – 12°C + СК; 3 – 4°C; 4 – 4°C + СК. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые отличия между средними значениями при  $P < 0.05$ .

рез 24 ч (рис. 2б), а уровень мРНК гена *CuZnSOD* не изменялся (рис. 2г). Экзогенная СК еще до начала действия низких температур (при 22°C) вызывала повышение активности СОД на 30% относительно исходного уровня (рис. 2а, б). При последующем действии низких температур (12°C и 4°C) активность фермента в листьях растений огурца, обработанных СК, превышала та-

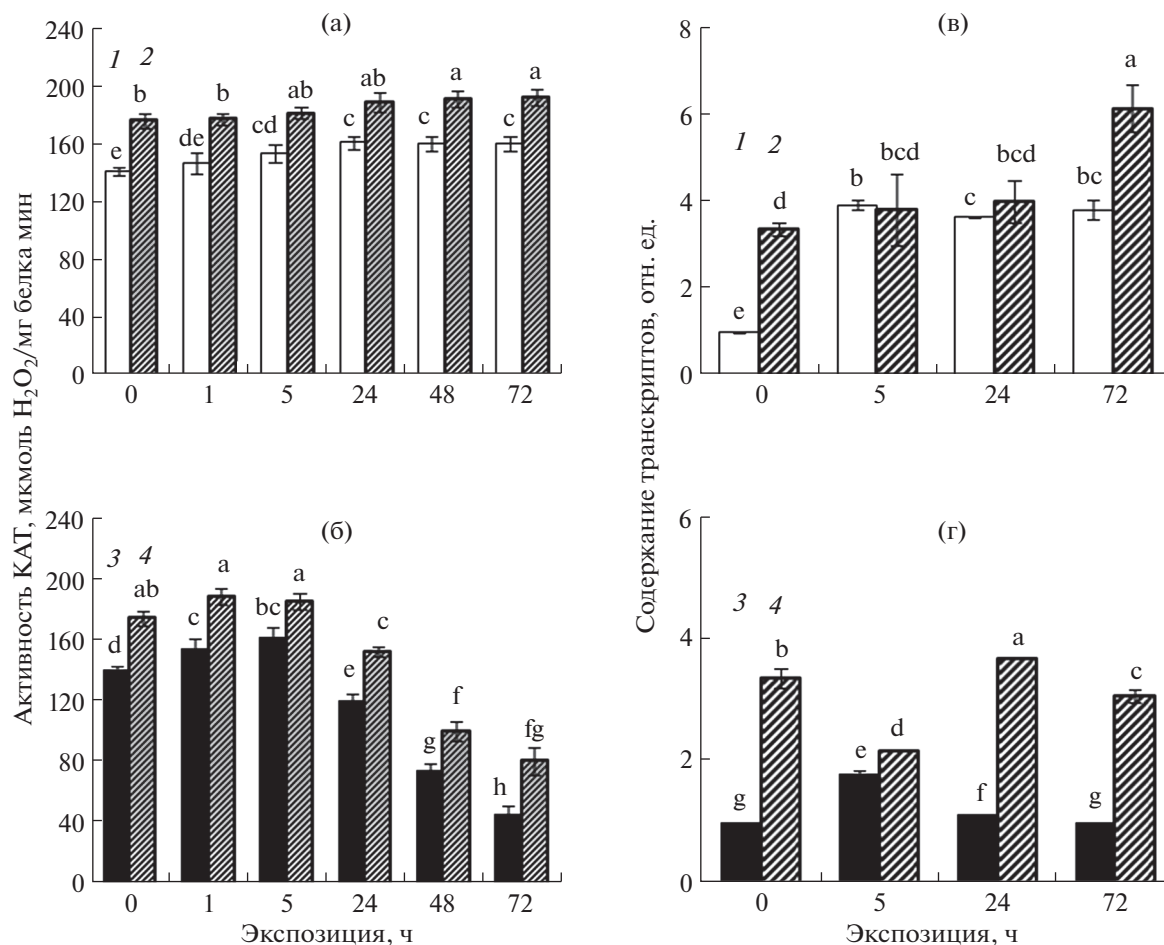
ковую в контрольном варианте в течение всего опыта (рис. 2а, б). Наряду с повышением активности СОД под влиянием СК отмечено возрастание экспрессии гена *CuZnSOD* (рис. 2в, г).

Сходным образом с СОД, под влиянием низких температур изменялась активность КАТ – повышалась в течение всего эксперимента при 12°C (рис. 3а) и резко снижалась спустя сутки

**Таблица 1.** Влияние СК (100 мкМ) на содержание МДА в листьях огурца при действии низких температур.

Экспозиция, ч	Содержание МДА, нмоль/г сырого веса			
	12°C	12°C + СК	4°C	4°C + СК
0	8.8 ± 0.5 <sup>g</sup>	10.1 ± 0.4 <sup>def</sup>	8.8 ± 0.5 <sup>i</sup>	10.1 ± 0.4 <sup>h</sup>
1	10.6 ± 0.3 <sup>def</sup>	9.7 ± 0.5 <sup>dfg</sup>	12.0 ± 0.7 <sup>f</sup>	9.6 ± 0.4 <sup>hi</sup>
5	11.1 ± 0.5 <sup>de</sup>	9.9 ± 0.7 <sup>fg</sup>	13.3 ± 0.7 <sup>f</sup>	10.6 ± 0.6 <sup>gh</sup>
24	12.1 ± 0.3 <sup>c</sup>	11.0 ± 0.3 <sup>ef</sup>	15.9 ± 0.7 <sup>e</sup>	12.8 ± 1.1 <sup>fg</sup>
48	14.4 ± 0.7 <sup>ab</sup>	12.9 ± 0.4 <sup>bc</sup>	26.3 ± 1.4 <sup>c</sup>	20.1 ± 1.5 <sup>d</sup>
72	16.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	12.8 ± 0.5 <sup>bc</sup>	41.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	35.1 ± 1.5 <sup>b</sup>

Примечание. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые отличия между средними значениями в пределах каждого температурного воздействия при  $P < 0.05$ .



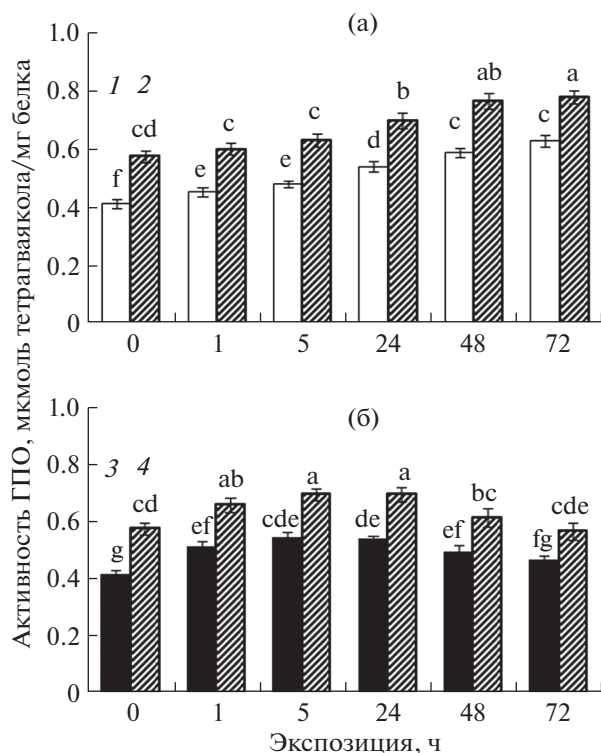
**Рис. 3.** Влияние СК (100 мкМ) на активность КАТ (а, б) и содержание транскриптов гена *CAT* (в, г) в листьях огурца при действии низких температур. Варианты: 1 – 12°C; 2 – 12°C + СК; 3 – 4°C; 4 – 4°C + СК. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые отличия между средними значениями при  $P < 0.05$ .

действия температуры 4°C (рис. 3б). Содержание мРНК гена *CAT* превышало исходный уровень в течение всего периода действия температуры 12°C (рис. 3в), а при 4°C – к концу опыта не отличалось от него (рис. 3г). Под влиянием СК активность КАТ и уровень мРНК гена *CAT* увеличивались уже при 22°C (рис. 3). При последующем действии холода (особенно температуры 4°C) активность КАТ и содержание мРНК гена *CAT* под влиянием СК существенно превышали таковые в контроле (рис. 3).

Анализ активности ГПО в листьях растений, подвергнутых холодному воздействию, показал, что при температуре 12°C она возрастает с увеличением продолжительности опыта (рис. 4а), а при 4°C – после некоторого повышения возвращается к исходному уровню (рис. 4б). При этом в варианте, в котором растения на протяжении всего периода действия холода находились на питательном растворе с добавлением СК, обнаружена более высокая активность ГПО (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, адаптивные возможности теплолюбивых растений, к которым относится огурец, крайне ограничены [18]. Действие на них низких температур приводит к различным структурно-функциональным нарушениям и сопровождается появлением симптомов холодного повреждения [1, 19]. Как правило, под влиянием низких температур, особенно при их продолжительном действии, происходит нарушение целостности мембранных структур [25]. СК, как показывают исследования, способна оказывать защитный эффект на мембраны клеток растений, обусловленный, в первую очередь, предотвращением ПОЛ [3, 14, 16]. В нашем случае при действии субповреждающей температуры (12°C) СК способствовала сохранению их целостности, и судя по выходу электролитов, холодоустойчивость растений огурца к концу опыта под влиянием СК повышалась. Важно отметить, что и при повреждающей температуре (4°C) СК частично нивелировала ее негативный эффект на



**Рис. 4.** Влияние СК (100 мкМ) на активность ГПО в листьях огурца при действии низких температур – 12°C (а) и 4°C (б). Варианты: 1 – 12°C; 2 – 12°C + СК; 3 – 4°C; 4 – 4°C + СК. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые отличия между средними значениями при  $P < 0.05$ .

мембраны клеток, способствуя снижению их проницаемости (по сравнению с контролем), хотя и не предотвращая ее рост с повышением продолжительности воздействия.

Механизмы протекторного действия СК и ее производных в настоящее время активно изучаются [3, 5, 7]. При этом отмечается, что СК сочетает в себе свойства сигнальной молекулы и стрессового фитогормона [8]. Например, при атаке патогенов в местах их внедрения СК индуцирует у растений развитие реакции сверхчувствительности. Она выражается в быстром отмирании части клеток, в том числе инфицированных, в результате интенсивного накопления АФК [6]. Последние, в свою очередь, не только обладают прямым биоцидным действием, но и являются одними из сигнальных посредников в реализации эффектов СК [26, 27]. С другой стороны, имеются данные о том, что при обработке растений СК в их клетках, наоборот, происходит снижение уровня АФК и продуктов ПОЛ, что, в конечном итоге, способствует повышению их устойчивости к неблагоприятным факторам среды [5–7, 9].

Об участии СК в регуляции устойчивости теплолюбивых растений к низким температурам че-

рез снижение уровня окислительного стресса уже сообщалось в ряде работ [12–14, 28]. Например, показано, что предобработка растений огурца [14] и кукурузы [13] СК значительно снижала содержание пероксида водорода и/или МДА в условиях действия низких температур (10°C и 5°C). Интересно отметить, что при использовании ингибиторов биосинтеза СК негативное действие холода на растения усиливалось, о чем свидетельствовало более интенсивное накопление индикаторов развития окислительного стресса, которое подавлялось в случае совместного использования ингибиторов биосинтеза СК и экзогенной СК [12, 13].

Как следует из полученных нами результатов, действие низких температур, как 12°C, так и 4°C, вызывает усиление процессов ПОЛ в значительно большей степени развивающихся в клетках растений огурца, испытывающих действие температуры 4°C. При этом в варианте с экзогенной СК интенсивность процессов ПОЛ, индуцируемых холодowymi воздействиями, была меньше, на что указывает более низкий уровень МДА в течение всего опыта. В случае действия температуры 12°C это, очевидно, способствовало более успешной адаптации проростков к холоду. Напротив, с увеличением продолжительности повреждающего воздействия (4°C) независимо от присутствия в питательном растворе СК в листьях огурца происходило значительное накопление МДА. Последнее, в свою очередь, приводило к резкому повышению проницаемости мембран клеток, которое сопровождалось потерей их содержимого, и в конечном итоге к гибели растений.

Согласно литературным данным об участии СК и ее производных в защитно-приспособительных реакциях растений, одним из механизмов их протекторного действия является регуляция активности антиоксидантных ферментов [3, 5, 6]. При этом, как показывают исследования, СК может и стимулировать, и ингибировать их активность. В частности, СК-индуцированное повышение устойчивости растений к патогенам обусловлено ее способностью ингибировать активность железосодержащих ферментов, что приводит к накоплению АФК и способствует уничтожению патогенов [6, 28]. С другой стороны, увеличение активности антиоксидантных ферментов под влиянием СК способствует повышению устойчивости растений к другим стресс-факторам, включая низкие температуры [9, 10, 12, 13, 16].

Нашими исследованиями показано, что СК индуцировала активизацию основных антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ГПО) в листьях огурца еще до начала действия низких температур (при 22°C). Можно предположить, что СК вызывала в этом случае эффект, сходный с действием модуляторов окислительного стресса, т. е. увеличение активности антиоксидантных ферментов могло

быть обусловлено усилением генерации их субстратов. В пользу этого предположения говорят, к примеру, данные о том, что обработка растений пшеницы СК вызывает повышение активности супероксид-генерирующих ферментов (НАДФН-оксидазы и внеклеточной пероксидазы), содержания АФК (супероксидного радикала и пероксида водорода) и активности ряда антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ГПО) [29]. При этом ингибиторы НАДФН-оксидазы ( $\alpha$ -нафтол) и пероксидазы (салицилгидроксамовая кислота), а также антиоксидант ионол частично нивелировали действие СК и существенно снижали ее положительное влияние на устойчивость пшеницы к высокой температуре. О способности СК индуцировать увеличение уровня АФК, в частности супероксидного радикала, вследствие активизации внеклеточных пероксидаз свидетельствуют данные, полученные на корнях растений пшеницы [30].

Исходя из этого можно полагать, что в наших опытах СК усиливала образование АФК в клетках огурца, что, в свою очередь, активизировало работу антиоксидантных ферментов. При последующем действии температуры 12°C, благодаря уже произошедшей активизации работы СОД, КАТ и ГПО, их активность в листьях обработанных СК растений в течение всего опыта превышала таковую у необработанных. Существенно, что и при температуре 4°C СК хотя и не предотвращала снижения активности СОД и КАТ, но способствовала их поддержанию на более высоком уровне.

Как показывают исследования, регуляция активности антиоксидантных ферментов под влиянием СК может осуществляться не только посредством постраскрипционной и пострасляционной активации ранее синтезированных в клетках молекул, но и через их синтез *de novo*. Так, Dong с соавт. [12] показали участие СК в регуляции транскрипции генов ферментов, осуществляющих антиоксидантную функцию, в листьях огурца при действии температуры 8°C. При этом использование ингибитора биосинтеза СК (паклобутразола) вызывало снижение уровня мРНК генов *SOD*, *CAT* и *APX*, что, в свою очередь, сказывалось и на активности ферментов, кодируемых этими генами. В случае совместного использования паклобутразола и экзогенной СК уровень экспрессии этих генов и активность антиоксидантных ферментов не только не уменьшались, а даже превышали значения в контроле (без паклобутразола и СК), что способствовало снижению негативного действия охлаждения на проростки огурца [12].

В наших опытах выявлено значительное усиление экспрессии генов *CuZnSOD* и *CAT*, кодирующих СОД и КАТ, в листьях огурца под влиянием СК даже при 22°C. По всей видимости, это стало причиной того, что при последующем воздействии низких температур в листьях огурца в опыт-

ном варианте (с обработкой СК) уровень мРНК генов *CuZnSOD* и *CAT* и активность кодируемых ими ферментов были существенно выше, чем у растений, не подвергавшихся подобной обработке. Однако, даже в присутствии СК активность КАТ и СОД с увеличением продолжительности действия температуры 4°C уменьшалась и к концу опыта была ниже исходных значений. По-видимому, это было связано с холодовой инактивацией ферментов вследствие повреждения их белковой части. Кроме того, инактивация железосодержащих ферментов могла быть обусловлена необратимым окислением их Fe-S-центров, которое вызывают АФК [26].

Таким образом, суммируя полученные нами результаты и сопоставляя их с имеющимися в литературе данными, можно заключить, что в условиях действия низких положительных температур защитный эффект СК в отношении растений огурца обеспечивается за счет ее участия в регуляции деятельности антиоксидантной системы. Увеличение активности ключевых антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ и ГПО) под влиянием СК приводит к снижению интенсивности окислительного стресса в клетках растений и, как следствие, способствует сохранению целостности их мембранных структур. В конечном итоге, указанные изменения, наряду с функционированием других адаптивных механизмов, обеспечивают повышение холодоустойчивости огурца в условиях действия субповреждающей температуры, а также частично нивелируют ее негативный эффект в случае повреждающего воздействия на растения.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук". Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук" (тема № 0218-2019-0074).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Титов А.Ф., Таланова В.В.* Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2009. 206 с.
2. *Шакирова Ф.М.* Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
3. *Miura K., Tada Ya.* Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid // Front. Plant

- Sci. 2014. V. 5. P. 1.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004>
4. *Klessig D.F., Choi H.W., Dempsey D.A.* Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2018. V. 31. P. 871.  
<https://doi.org/10.1094/mpmi-03-18-0067-cr>
  5. *Kumar D.* Salicylic acid signaling in disease resistance // *Plant Sci.* 2014. V. 228. P. 127.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014>
  6. *Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F.* Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009. V. 47. P. 177.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
  7. *Khan M.I.R., Fatma M., Per T.S., Anjum N.A., Khan N.A.* Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6: 462.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>
  8. *Janda T., Gondor O.K., Yordanova R., Szalai G., Pal M.* Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects // *Acta Physiol. Plant.* 2014. V. 36. P. 2537.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-014-1620-y>
  9. *La V.H., Lee B., Zhang Q., Park S.-H., Islam Md. T., Kim T.-H.* Salicylic acid improves drought-stress tolerance by regulating the redox status and proline metabolism in *Brassica rapa* // *Hortic. Environ. Biotechnol.* 2019. V. 60. P. 31.  
<https://doi.org/10.1007/s13580-018-0099-7>
  10. *Zhang Z., Lan M., Han X., Wu J., Wang-Pruski G.* Response of ornamental pepper to high-temperature stress and role of exogenous salicylic acid in mitigating high temperature // *J. Plant Growth Regul.* 2020. V. 39. P. 133.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-019-09969-y>
  11. *Sharma A., Sidhu G.P.S., Araniti F., Bali A.S., Shahzad B., Tripathi D.K., Brestic M., Skalicky M., Landi M.* The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals // *Molecules.* 2020. V. 25: 540.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25030540>
  12. *Dong C.-J., Li L., Shang Q.-M., Liu X.-Y., Zhang Z.-G.* Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings // *Planta.* 2014. V. 240. P. 687.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2115-1>
  13. *Wang Y., Wen T., Huang Y., Guan Y., Hu J.* Salicylic acid biosynthesis inhibitors increase chilling injury to maize (*Zea mays* L.) seedlings // *Plant Growth Regul.* 2018. V. 86. P. 11.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-018-0407-3>
  14. *Lei T., Feng H., Sun X., Dai Q.L., Zhang F., Liang H.G., Lin H.H.* The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid // *Plant Growth Regul.* 2010. V. 60. P. 35.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-009-9416-6>
  15. *Chen S., Liu Z., Cui J., Ding J., Xia X., Liu D., Yu J.* Alleviation of chilling-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment and related gene expression in eggplant seedlings // *Plant Growth Regul.* 2011. V. 65. P. 101.  
<https://doi.org/10.1007/s10725-011-9579-9>
  16. *Hashempour A., Ghasemnezhad M., Fotouhi Ghaziyini R., Sohani M.M.* The physiological and biochemical responses to freezing stress of olive plants treated with salicylic acid // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 443.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443714040098>
  17. *Wang D.H., Li X., Su Z. K., Ren H. X.* The role of salicylic acid in response of two rice cultivars to chilling stress // *Biol. Plant.* 2009. V. 53. P. 545.  
<https://doi.org/10.1007/s10535-009-0099-7>
  18. *Тумов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В.* Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. Москва: Наука, 2006. 143 с.
  19. *Grishenkova N.N., Lukatkin A.S.* Determination of plant tissue resistance to abiotic stresses using conductometric method // *Povolzh. Ekol. Zh.* 2005. № 1. P. 3.
  20. *Stewart R.R.C., Bewley J.D.* Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // *Plant Physiol.* 1980. V. 65. P. 245.  
<https://doi.org/10.1104/pp.65.2.245>
  21. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 276.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
  22. *Aebi H.* Catalase *in vitro* // *Methods in Enzymol.* 1984. V. 105. P. 121.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
  23. *Maehly A.C., Chance B.* The assay of catalase and peroxidase // *Meth. Biochem. Anal.* 1954. V. 1. P. 357.  
<https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
  24. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  25. *Los D.A.* Molecular mechanisms of cold tolerance in plants // *Herald of the Russian Academy of Sciences.* 2005. V. 75. P. 149.
  26. *Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // *J. Bot.* 2012. 217037. P. 1.  
<https://doi.org/10.1155/2012/217037>
  27. *Herrera-Vásquez A., Salinas P., Holuigue L.* Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6: 171.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00171>
  28. *Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О.* Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и её структурных аналогов // *Физиология и биохимия культ. растений.* 2013. Т. 45. С. 113.
  29. *Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Shvidenko N.V., Karpets Yu.V.* Induction of heat resistance in wheat coleoptiles by salicylic and succinic acids: connection of the effect with the generation and neutralization of active oxygen forms of reactive oxygen species // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 500.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683812050055>
  30. *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.  
<https://doi.org/10.1007/bf01289421>



## СПОСОБНОСТЬ ЛАКТОН- И КЕТОНСОДЕРЖАЩИХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ ИНДУЦИРОВАТЬ ПРАЙМИНГ У РАСТЕНИЙ РАПСА К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ

© 2021 г. Л. В. Коломейчук<sup>a,\*</sup>, Е. Д. Данилова<sup>a</sup>, В. А. Хрипач<sup>b</sup>,  
В. Н. Жабинский<sup>b</sup>, Вл. В. Кузнецов<sup>a,c</sup>, М. В. Ефимова<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>b</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>c</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: kolomeychuklv@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2020 г.

После доработки 29.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Исследовали способность brassinosteroidов (БС) разной химической структуры (на примере 24-эпибрасинолида (ЭБЛ) и 24-эпикастастерона (ЭКС)) индуцировать у растений рапса (*Brassica napus* L.) состояние прайминга, повышающего устойчивость к “отсроченному” солевому стрессу (150 мМ NaCl). После 2-недельного роста проростков рапса на гидропонной установке на среде Хогланда-Снайдера (ХС) их переносили на ту же среду с добавлением ЭБЛ или ЭКС (10 нМ) на 4 ч. Далее растения находились на среде ХС без добавления БС 20 ч. В дальнейшем их выращивали на питательной среде ХС в отсутствие или в присутствии 150 мМ NaCl в течение 6 суток. Засоление тормозило ростовые процессы (длину стебля, число листьев, площадь ассимилирующей поверхности, сырую массу растений (на 30–35%)), понижало уровни хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов (на 38–44%), оводненность тканей (на 3.54%), осмотический потенциал клеток (в 1.7 раза) и повышало перекисное окисление липидов (ПОЛ) (на 62%) в листьях. Одновременно солевой стресс стимулировал в 6 раз уровень пролина в листьях, в 11 раз в стеблях и корнях, в 2.3 раза активность супероксиддисмутазы (СОД) и на 26% пероксидазы. При засолении во всех частях растений возрастала концентрация (At%) Na и Cl, но снижалась концентрация ионов K, Ca, Mg, S, P, Al и Fe. Обработка растений БС (10 нМ, 4 ч) стимулировала ростовые процессы в оптимальных условиях, что в большей степени было характерно для ЭКС, который также увеличивал содержание хлорофилла *a* и каротиноидов (на 11 и 18% в листьях, соответственно). БС стимулировали активность антиоксидантных ферментов (ЭБЛ повышал в 4.6 раза активность СОД, ЭКС увеличивал активности СОД и пероксидазы (на 48%)), что могло влиять на развитие состояния прайминга у растений. Предобработка проростков рапса БС повышала устойчивость к последующему солевому стрессу. Протекторный эффект БС проявлялся на уровнях ростовых реакций (прежде всего, у ЭКС), водного статуса и осмотического потенциала листьев. Уровень ПОЛ понижался за счет активации СОД и пероксидазы в случае с ЭБЛ и ЭКС, соответственно. Накопление ионов в растениях, подвергнутых гормональному праймингу, зависело от химической структуры БС. Высказано предположение, что протекторный эффект прайминга БС обусловлен способностью гормонов до стресса активировать антиоксидантные ферменты и воздействовать на систему транспорта неорганических ионов таким образом, что при последующем засолении растения более активно аккумулировали ионы, следствием чего являлось понижение осмотического потенциала клеток и поддержание водного статуса. Полученные результаты могут быть полезны при разработке технологии повышения солеустойчивости рапса.

**Ключевые слова:** *Brassica napus* L., прайминг, засоление, окислительный и осмотический стресс, пролин, ионы, brassinosteroidы

**DOI:** 10.31857/S0015330321020081

### ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное техногенное загрязнение окружающей среды привело к серьезному обострению эко-

логической ситуации в мире, в том числе, к расширению засоленных территорий. В настоящее время засоленные почвы составляют 932.2 млн га и встречаются, по меньшей мере, в 100 странах, прежде всего, в Пакистане, Китае, США, Индии, Аргентине, в странах Центральной и Западной Азии, а так-

**Сокращения:** БС – brassinosteroidы, ЭБЛ – 24-эпибрасинолид, ЭКС – 24-эпикастастерон

же на побережье Средиземного моря [1]. Засоление является следствием неэффективного управления агропроизводством и чрезмерной эксплуатации водных ресурсов, особенно в условиях засушливого климата [2]. В России засолению почв подвержены территории почти половины субъектов страны. Основные сельскохозяйственные угодья России, включая 80% пахотных земель, локализованы в южных регионах, значительная часть которых может быть отнесена к засоленным территориям [3].

Повышенное содержание солей в почве или поливной воде оказывает губительное влияние на растения, в основе которого лежат нарушения клеточного метаболизма, баланса эндогенных регуляторов, основных физиологических процессов и, в конечном итоге, приводит к снижению продуктивности растений и их пищевой ценности [4]. Ситуация усугубляется увеличением в геометрической прогрессии численности населения на планете, что предполагает рост производства продовольствия. При этом производство 90% всей мировой агрономической продукции достигается за счет выращивания 30 видов сельскохозяйственных культур, подавляющее большинство которых являются гликофитами, т. е. растениями, неустойчивыми к избыточному засолению [5].

В настоящее время не существует эффективных технологий снижения степени засоленности земель. По этой причине использование засоленных почвенных ресурсов в интересах аграрного производства требует повышения солеустойчивости хозяйственно ценных сортов растений. Подобная ситуация предполагает изучение физиологических механизмов адаптации растений к засоленным местообитаниям.

Ключевая роль в регуляции онтогенеза и адаптации растений к неблагоприятным условиям, в том числе и засолению, принадлежит фитогормонам, таким как абсцизовая кислота, гиббереллины, ауксины, цитокинины, этилен и брассиностероиды [6]. Брассиностероиды (БС) представляют собою группу стероидных гормонов растений, вовлеченных в регуляцию практически всех физиологических функций [7]. На клеточном уровне это проявляется в дифференциальной регуляции биосинтеза белков и нуклеиновых кислот, способности изменять свойства мембран и других клеточных структур, что приводит к стимуляции роста, оптимизации онтогенетического развития, улучшению пищевой ценности плодов и повышению урожайности [7, 8]. В то же время БС обладают стресс-протекторными и адаптогенными свойствами, повышающими устойчивость растений ко многим повреждающим воздействиям [7, 9, 10].

Среди преимуществ БС можно отметить их экологическую безопасность и способность вызывать биологические эффекты в крайне низких

по сравнению с другими гормонами концентрациях. В последние годы была существенно расширена область агроприложений стероидных гормонов растений и созданы новые способы и средства повышения с их помощью урожайности и качества продукции растениеводства [11–13]. Подавляющее большинство опубликованных работ было направлено на изучение протекторных механизмов БС в условиях стресса [13–15], тогда как их способность индуцировать состояние прайминга, повышающего устойчивость растений к отсроченному действию повреждающего фактора в результате кратковременной гормональной обработки растений, практически не изучена [11, 12, 16]. Тем не менее, было установлено, что высокую биологическую активность проявляет лактонсодержащий брассиностероид – 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) [17]. Потенциально активным соединением может быть и его предшественник в химическом синтезе – кетон-содержащий 24-эпикастастерон (ЭКС), чей механизм стресс-протекторного действия в настоящее время слабо исследован.

Цель работы – изучение способности лактон- и кетонсодержащего БС индуцировать состояние прайминга у растений рапса, а также специфичности их действия в условиях солевого стресса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на растениях рапса (*Brassica napus* L.) сорта Вестар канадской селекции. Семена проращивали в перлите на дистиллированной воде в течение 7 суток, после чего проростки переносили на жидкую питательную среду Хогланда-Снайдера (ХС) для дальнейшего культивирования под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora (“Osram”, Германия) при плотности потока квантов ФАР 100 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 23 ± 0.5°C (при освещении) и 20 ± 0.5°C (ночью). После 2-недельного роста на гидропонной установке в среде ХС растения переносили на ту же среду с добавлением ЭБЛ или ЭКС в концентрациях 10 нМ на 4 ч. Далее растения находились на среде ХС без добавления БС 20 ч. В дальнейшем их помещали на питательную среду ХС в отсутствие или в присутствии 150 мМ NaCl. Контрольные растения росли на стандартной среде ХС в течение всего эксперимента. Используемые в данной работе концентрации NaCl и БС были подобраны в предварительных опытах. Растительный материал фиксировали через 6 суток, после добавления в среду NaCl.

Для оценки активности антиоксидантных ферментов и оценки интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) листья средних ярусов (далее – листья) фиксировали в жидком азоте; для измерения содержания фотосинтетических пигментов – 96% этанолом. С целью определения

величины осмотического потенциала клеточного содержимого листа замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для анализа пролина листья, стебли и корни растений фиксировали жидким азотом.

Для оценки содержания фотосинтетических пигментов листья растирали в 96% этаноле, и полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 8 тыс. об/мин (центрифуга MiniSpin, "Eppendorf", Германия). Оптическую плотность спиртового раствора (итоговый объем вытяжки 1.5 мл) измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis ("ThermoScientific", США) при 470.0, 648.6; 664.2, 720.0 нм.

Свежую и сухую биомассы растительного материала оценивали гравиметрическим методом. Сухую массу определяли после фиксации материала при  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 1.5 ч и его высушивания при  $70^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса. Содержание воды (% от сырой массы) рассчитывали, исходя из отношения разности сырой и сухой биомассы, отнесенной к сырой массе и умноженной на 100%.

Осмотический потенциал клеточного экссудата определяли на криоскопическом осмометре Osmomat 030 ("Gonotec", Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Клеточный сок отжимали из размороженных образцов листьев растений.

Концентрации неорганических ионов (Na, K, Cl, Al, P, Mg, Ca, S и Fe) определяли в высушенных листьях, стеблях и корнях методом энергодисперсионного анализа на электронном ионно-растровом сканирующем микроскопе "Quanta 200 3D" EDAX (Нидерланды). Данные представлены в атомных процентах (At%) от общего количества элементов в данной точке образца (100 At%) за вычетом доли углерода и кислорода. Сканирование каждого варианта проводили не менее шести раз.

Интенсивность ПОЛ оценивали в образцах растений по образованию окрашенного комплекса – продукта малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой при нагревании. Определение содержания пролина оценивали в образцах растений согласно методике, описанной ранее [12].

Для оценки активности супероксиддисмутазы (СОД) (ЕС 1.15.1.1) и гваякол-зависимой пероксидазы (ПО) (ЕС 1.11.1.7) листья растений растирали в жидком азоте с нерастворимым поливинилпирролидоном, экстрагировали 0.066 М калий-фосфатным буфером (рН 7.4), содержащим 0.5 М дитиотрейтола, 0.1 М фенолметилсульфонилфторида в диметилсульфоксиде, затем центрифугировали 20 минут при 8000 об/мин и температуре  $4^{\circ}\text{C}$  ("Eppendorf 5430R", Германия). Из полученного супернатанта отбирали аликвоты для определения активности СОД и ПО. Общую активность СОД определяли по методу, описанному ранее [12]. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала: 10 мкл

супернатанта, 1.75 мл 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 7.8), 0.2 мл 0.1 М DL-метионина, 0.063 мл 1.7 мМ нитросинего тетразолия ("Fermentas", США), 0.047 мл 1% Тритона X-100 и 0.060 мл 0.004% рибофлавина. Реакцию проводили при освещении белыми светодиодными лампами ( $I = 232 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) в течение 30 мин. Поглощение раствора измеряли при 560 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis ("ThermoScientific", США).

Активность ПОЛ определяли так, как описано ранее [12]. Реакционная смесь содержала 50 мкл супернатанта, 1.95 мл 0.066 М калий-фосфатного буфера (рН 7.4), 200 мкл 7 мМ гваякола, 250 мкл 0.01 М  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Поглощение раствора измеряли при 470 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis ("ThermoScientific", США).

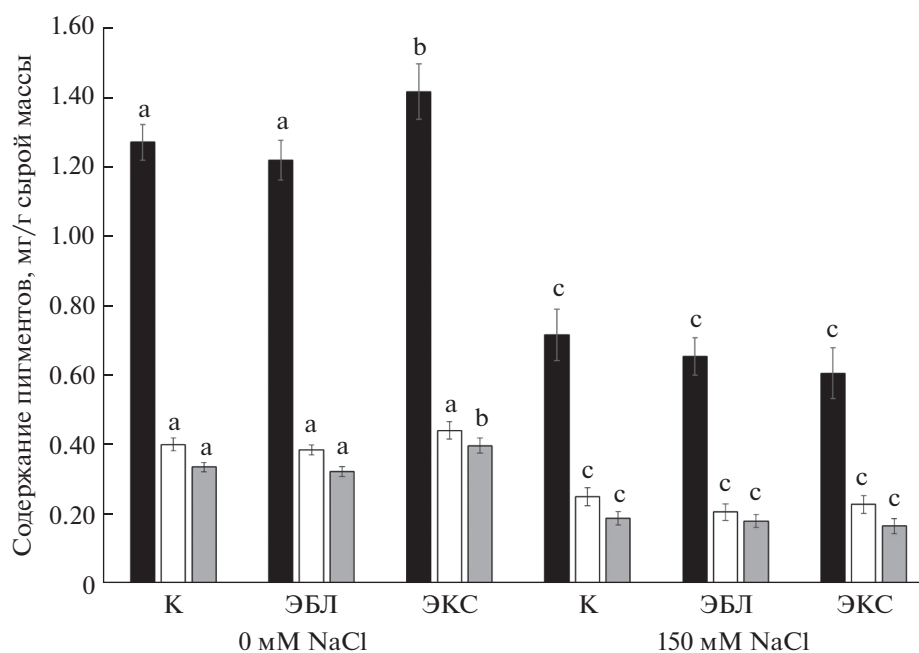
Концентрацию белка оценивали по методу, описанному ранее [12].

Все эксперименты повторяли не менее трех раз. Для каждой биологической повторности использовали 50 растений. Полученные результаты представлены на рисунках в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения  $t$ -критерия находили для 95% уровня значимости ( $P < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Влияние ЭБЛ, ЭКС и NaCl на рост растений рапса при солевом стрессе*

В оптимальных условиях выращивания внесение БС в питательный раствор на 4 ч стимулировало ростовые процессы. Так, добавление ЭКС приводило к увеличению длины стебля, суммарной площади листовой поверхности и сырой массы растений на 29, 22 и 15%, соответственно. В сравнении с ЭКС, стимулирующий эффект ЭБЛ был менее выражен и проявлялся лишь в ускорении на 13% роста стебля. Хлоридное засоление (150 мМ NaCl) тормозило рост стебля, уменьшало площадь ассимилирующей поверхности и, в конечном итоге, подавляло на 30–35% накопление сырой массы растений. Кратковременное воздействие ЭКС заметно снижало степень подавления роста растений в условиях отсроченного действия солевого стресса. Общая сырая масса растений и их ассимилирующая поверхность составляли 86–88% от значений контрольного варианта (табл. 1).



**Рис. 1.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений. Столбики черного цвета – хлорофилл *a*, белого цвета – хлорофилл *b*, серого цвета – каротиноиды. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.

*Влияние brassinosterоидов и NaCl на содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений*

В оптимальных условиях выращивания экзогенный ЭКС стимулировал накопление хлорофилла *a* и каротиноидов на 11 и 18%, соответственно, тогда как ЭБЛ достоверных изменений в содержании основных фотосинтетических пигментов не вызывал. Хлоридное засоление снижало содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в листьях на 38–44%. Кратковременная гормональная предобработка растений не снижала негативного эффекта последующего солевого стресса на уровне содержания фотосинтетических пигментов (рис. 1).

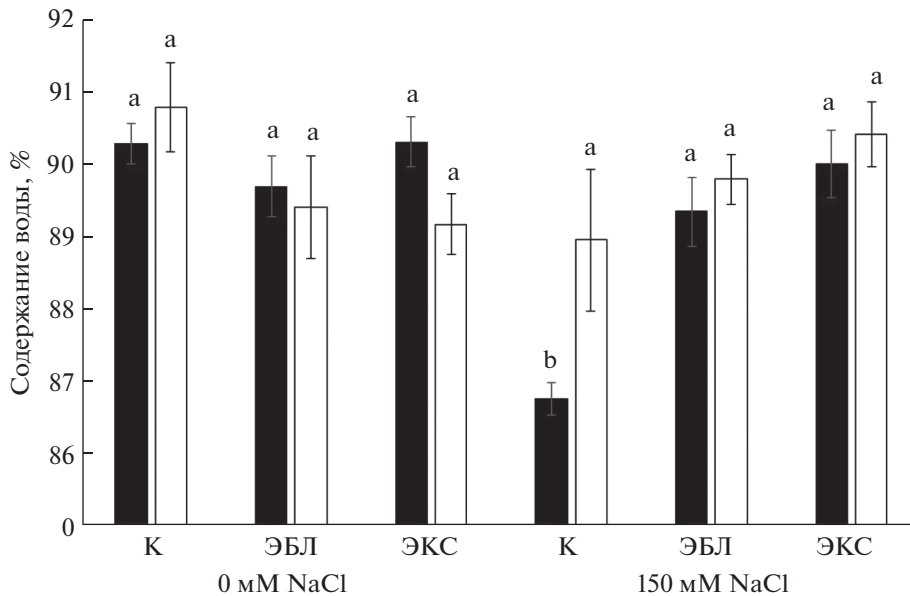
*Влияние ЭБЛ, ЭКС и NaCl на водный статус растений*

Кратковременное воздействие ЭБЛ и ЭКС достоверно не изменяло содержание воды в листьях и корнях рапса. При действии на растения рапса NaCl содержание воды в расчете на единицу сырой массы достоверно снизилось на 3.54% в листьях. Прайминг растений рапса БС способствовал повышению содержания воды в тканях листа практически до контрольных значений (рис. 2). Показатели содержания воды у растений, подверженных гормональной обработке и последующему солевому стрессу, достоверно не отличались от значений контрольного варианта.

Принципиально важным для поддержания оптимального водного статуса тканей растений при

**Таблица 1.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на ростовые показатели растений. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.

	Вариант	Длина стебля, см	Суммарная площадь листовой поверхности, см <sup>2</sup>	Общая сырая масса растений, г
0 мМ NaCl	Контроль	2.84 ± 0.14 <sup>a</sup>	48.07 ± 2.27 <sup>a</sup>	2.48 ± 0.12 <sup>a</sup>
	ЭБЛ	3.21 ± 0.17 <sup>ab</sup>	51.00 ± 2.25 <sup>a</sup>	2.53 ± 0.11 <sup>a</sup>
	ЭКС	3.65 ± 0.18 <sup>b</sup>	58.61 ± 2.40 <sup>b</sup>	2.85 ± 0.12 <sup>b</sup>
150 мМ NaCl	Контроль	2.05 ± 0.12 <sup>c</sup>	34.96 ± 2.23 <sup>c</sup>	1.60 ± 0.11 <sup>c</sup>
	ЭБЛ	2.12 ± 0.11 <sup>c</sup>	36.08 ± 1.88 <sup>c</sup>	1.81 ± 0.09 <sup>c</sup>
	ЭКС	2.21 ± 0.10 <sup>c</sup>	42.21 ± 2.34 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.14 <sup>a</sup>



**Рис. 2.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на содержание воды в растениях рапса. Столбики черного цвета – побеги, белого цвета – корни растений. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.

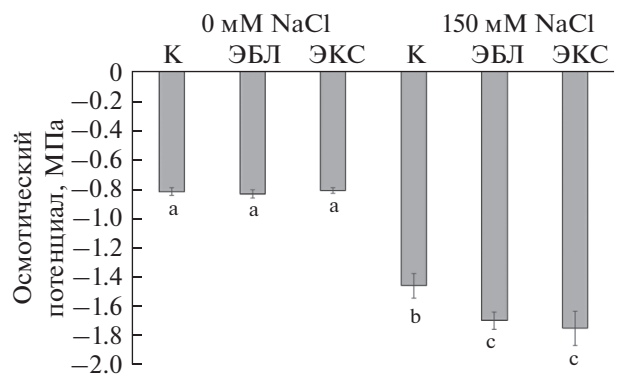
засолении является понижение их осмотического потенциала до уровня, обеспечивающего поступление воды из среды в растение. Осмотический потенциал при хлоридном засолении достигал величины  $-1.46$  МПа, что в 1.7 раз ниже контрольных значений. Кратковременное действие гормонов при последующем солевом стрессе приводило к снижению данного показателя до  $-1.70$  МПа в случае с ЭБЛ и до  $-1.75$  МПа при обработке ЭКС. В оптимальных условиях роста обработка растений БС не влияла на осмотический статус листьев (рис. 3).

*Влияние brassinosterоидов и NaCl на содержание неорганических ионов в листьях, стеблях и корнях растений*

Важную роль в формировании осмотического потенциала клеточного содержимого играют неорганические ионы, прежде всего, ионы К, хотя в условиях засоления важная роль принадлежит также и ионам Na. Нами были проанализированы концентрации в атомных процентах (At%) Na, Mg, Al, P, S, Cl, K, Ca и Fe в листьях, стеблях и корнях растений. В корнях контрольных растений, по сравнению с побегом, преобладали все анализируемые ионы, за исключением ионов калия и магния (табл. 2). Как следует из полученных данных, в ответ на воздействие NaCl во всех частях растений значительно возрастали At% натрия и хлора и снижались At% ионов калия, кальция, магния, серы, фосфора, алюминия и железа (табл. 2). При этом концентрации ионов натрия и хлора были несколько выше в листьях, чем в корнях.

Накопление ионов в растениях, подвергнутых кратковременной обработке БС, было органоспецифичным и определялось химической структурой гормона. Так, кратковременная обработка растений ЭБЛ увеличивала At% ионов натрия и серы в листьях на 90 и 13%, соответственно, в то время как концентрация ионов кальция снизилась на 25%. ЭКС усиливал накопление в листьях ионов серы, магния и кальция на 24, 23 и 16%, при этом концентрации алюминия, железа и калия снижались на 50, 30 и 14%, соответственно (табл. 2).

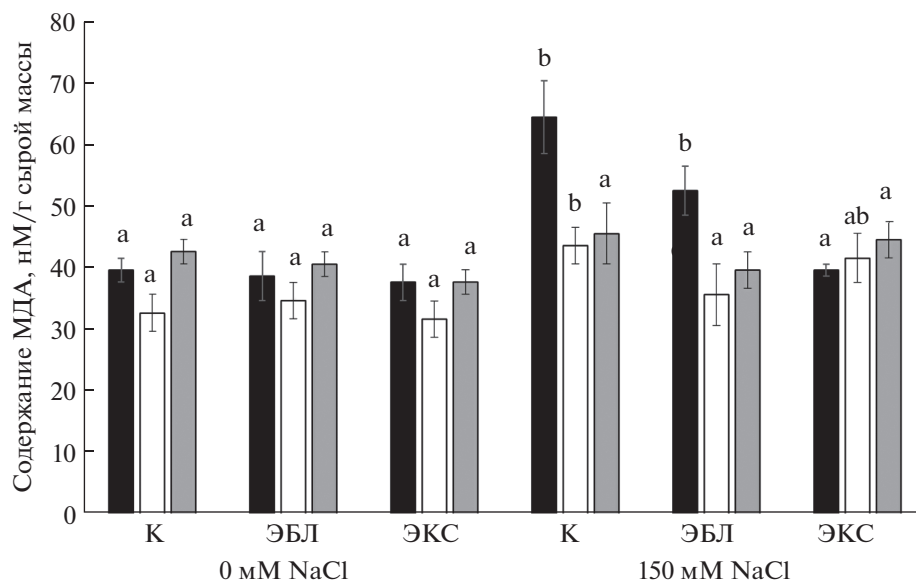
Прайминг растений БС с последующим солевым стрессом приводил к частичному восстановлению накопления фосфора в стебле, ионов кальция в листьях и стеблях для ЭБЛ, и в листьях – для ЭКС; снижал аккумуляцию ионов натрия в стеблях расте-



**Рис. 3.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на осмотический потенциал в листьях растений рапса. Достоверные различия на уровне  $P < 0.05$  отмечены разными буквами.

**Таблица 2.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на содержание неорганических ионов в листьях, стеблях и корнях растений. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами

Вариант		Na <sup>+</sup> , at %			K <sup>+</sup> , at %			Cl <sup>-</sup> , at %		
		лист	стебель	корень	лист	стебель	корень	лист	стебель	корень
0 мМ NaCl	Контроль	1.23 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.40 <sup>a</sup>	2.72 ± 0.23 <sup>a</sup>	48.31 ± 2.16 <sup>a</sup>	56.84 ± 1.30 <sup>a</sup>	34.85 ± 2.16 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.13 <sup>a</sup>
	ЭБЛ	2.37 ± 0.46 <sup>b</sup>	2.18 ± 0.74 <sup>ab</sup>	2.10 ± 0.36 <sup>a</sup>	45.21 ± 1.45 <sup>ab</sup>	62.16 ± 2.63 <sup>b</sup>	38.34 ± 1.87 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.35 <sup>a</sup>
	ЭКС	1.75 ± 0.42 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.46 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.57 <sup>a</sup>	41.42 ± 2.64 <sup>b</sup>	53.81 ± 2.50 <sup>a</sup>	31.40 ± 2.56 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.75 <sup>a</sup>
150 мМ NaCl	контроль	25.47 ± 1.34 <sup>c</sup>	24.37 ± 1.95 <sup>c</sup>	17.25 ± 1.48 <sup>b</sup>	17.16 ± 2.14 <sup>c</sup>	29.98 ± 3.36 <sup>c</sup>	19.45 ± 0.67 <sup>b</sup>	38.30 ± 1.39 <sup>b</sup>	25.55 ± 1.88 <sup>b</sup>	22.69 ± 1.37 <sup>b</sup>
	ЭБЛ	23.02 ± 0.80 <sup>c</sup>	19.31 ± 0.95 <sup>d</sup>	17.19 ± 0.88 <sup>b</sup>	14.77 ± 0.90 <sup>c</sup>	31.76 ± 1.20 <sup>c</sup>	20.08 ± 2.87 <sup>b</sup>	38.46 ± 2.22 <sup>b</sup>	24.52 ± 0.68 <sup>b</sup>	22.86 ± 1.35 <sup>b</sup>
	ЭКС	22.97 ± 0.80 <sup>c</sup>	17.52 ± 1.45 <sup>d</sup>	16.85 ± 0.63 <sup>b</sup>	16.56 ± 1.32 <sup>c</sup>	31.55 ± 3.06 <sup>c</sup>	23.48 ± 0.60 <sup>b</sup>	23.45 ± 0.79 <sup>c</sup>	23.07 ± 1.84 <sup>b</sup>	38.86 ± 1.60 <sup>c</sup>
Вариант		Mg <sup>++</sup> , at %			Ca <sup>++</sup> , at %			S <sup>++</sup> , at %		
0 мМ NaCl	контроль	7.52 ± 0.57 <sup>a</sup>	4.87 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.74 ± 0.67 <sup>a</sup>	21.67 ± 1.34 <sup>a</sup>	8.28 ± 0.50 <sup>a</sup>	16.20 ± 1.78 <sup>a</sup>	7.65 ± 0.48 <sup>a</sup>	8.16 ± 0.45 <sup>a</sup>	9.51 ± 1.02 <sup>a</sup>
	ЭБЛ	8.38 ± 0.79 <sup>ab</sup>	3.91 ± 0.59 <sup>a</sup>	3.30 ± 0.37 <sup>ab</sup>	16.18 ± 1.31 <sup>b</sup>	6.70 ± 0.72 <sup>ab</sup>	16.69 ± 1.24 <sup>a</sup>	8.70 ± 0.14 <sup>b</sup>	7.51 ± 0.50 <sup>a</sup>	8.67 ± 0.35 <sup>a</sup>
	ЭКС	9.28 ± 0.57 <sup>b</sup>	4.39 ± 0.74 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.44 <sup>a</sup>	25.15 ± 0.93 <sup>c</sup>	8.65 ± 1.33 <sup>a</sup>	22.60 ± 2.52 <sup>b</sup>	9.51 ± 0.53 <sup>b</sup>	9.67 ± 0.82 <sup>a</sup>	8.32 ± 0.77 <sup>a</sup>
150 мМ NaCl	контроль	3.61 ± 0.24 <sup>c</sup>	3.09 ± 0.86 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.38 <sup>b</sup>	5.38 ± 0.46 <sup>d</sup>	3.06 ± 0.29 <sup>c</sup>	9.28 ± 1.09 <sup>c</sup>	3.43 ± 0.29 <sup>c</sup>	4.54 ± 0.23 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.43 <sup>b</sup>
	ЭБЛ	3.76 ± 0.26 <sup>c</sup>	4.26 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.76 ± 0.39 <sup>b</sup>	9.76 ± 1.11 <sup>c</sup>	4.54 ± 0.38 <sup>b</sup>	7.78 ± 0.67 <sup>c</sup>	3.86 ± 0.48 <sup>c</sup>	4.79 ± 0.38 <sup>b</sup>	6.65 ± 0.11 <sup>b</sup>
	ЭКС	2.80 ± 0.21 <sup>c</sup>	3.87 ± 0.51 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.29 <sup>b</sup>	5.04 ± 0.72 <sup>d</sup>	5.98 ± 0.67 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.45 <sup>c</sup>	3.71 ± 0.33 <sup>c</sup>	4.45 ± 0.18 <sup>b</sup>	6.37 ± 0.34 <sup>b</sup>
Вариант		P <sup>+++</sup> , at %			Al <sup>+++</sup> , at %			Fe <sup>++</sup> , at %		
0 мМ NaCl	контроль	7.71 ± 0.72 <sup>a</sup>	11.31 ± 1.11 <sup>a</sup>	17.87 ± 1.55 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.40 <sup>a</sup>	7.06 ± 0.64 <sup>a</sup>	5.82 ± 0.50 <sup>a</sup>	9.26 ± 0.63 <sup>a</sup>
	ЭБЛ	9.09 ± 1.30 <sup>a</sup>	10.01 ± 0.98 <sup>a</sup>	17.50 ± 0.56 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.34 ± 0.62 <sup>a</sup>	5.99 ± 0.31 <sup>a</sup>	9.79 ± 1.01 <sup>ab</sup>
	ЭКС	6.44 ± 0.70 <sup>a</sup>	14.20 ± 0.79 <sup>b</sup>	20.81 ± 1.27 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.17 <sup>a</sup>	5.00 ± 0.39 <sup>b</sup>	5.72 ± 0.32 <sup>a</sup>	9.86 ± 0.85 <sup>a</sup>
150 мМ NaCl	контроль	3.81 ± 0.62 <sup>b</sup>	5.36 ± 0.28 <sup>c</sup>	13.42 ± 0.62 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.27 ± 0.32 <sup>c</sup>	3.90 ± 0.29 <sup>b</sup>	7.81 ± 0.44 <sup>b</sup>
	ЭБЛ	2.62 ± 0.24 <sup>b</sup>	6.51 ± 0.28 <sup>d</sup>	13.26 ± 0.69 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.68 ± 0.25 <sup>c</sup>	4.44 ± 0.32 <sup>b</sup>	8.66 ± 0.42 <sup>ab</sup>
	ЭКС	3.37 ± 0.52 <sup>b</sup>	7.36 ± 0.67 <sup>d</sup>	12.38 ± 0.49 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.26 <sup>ab</sup>	3.67 ± 0.18 <sup>c</sup>	4.93 ± 0.33 <sup>ab</sup>	7.99 ± 0.44 <sup>b</sup>



**Рис. 4.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на содержание МДА в листьях, стеблях и корнях растений рапса. Столбики черного цвета – листья, белого цвета – стебли, серого цвета – корни. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.

ний. ЭКС замедлял транспорт ионов хлора в листья растений и тормозил их накопление в корнях, по сравнению с действием одного солевого стресса, при этом суммарные At% ионов хлора во всех вариантах с NaCl были сходными (табл. 2).

#### *Влияние ЭБЛ, ЭКС и NaCl на интенсивность перекисного окисления липидов в растениях*

Одним из негативных последствий действия засоления на растения является окислительный стресс, связанный, прежде всего, с нарушениями процессов фотосинтеза и дыхания [18]. Интенсивность окислительного стресса в листьях рапса оценивали по уровню ПОЛ, критерием которого служило содержание МДА в реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Как следует из полученных данных, хлоридное засоление повышало уровень ПОЛ в листьях и стеблях растений на 62 и 33% относительно контроля (рис. 4). Кратковременная гормональная обработка рапса в оптимальных условиях выращивания достоверно не влияла на уровень окислительного стресса. Антиоксидантная эффективность БС определялась химической структурой гормона и, в определенной степени, характеризовалась органо-специфичностью. Так, прайминг ЭБЛ полностью снимал NaCl-зависимый окислительный стресс в стеблях и частично – в листьях, в то время как ЭКС полностью нивелировал негативный солевой эффект в листьях и не влиял на величину ПОЛ в стеблях (рис. 4).

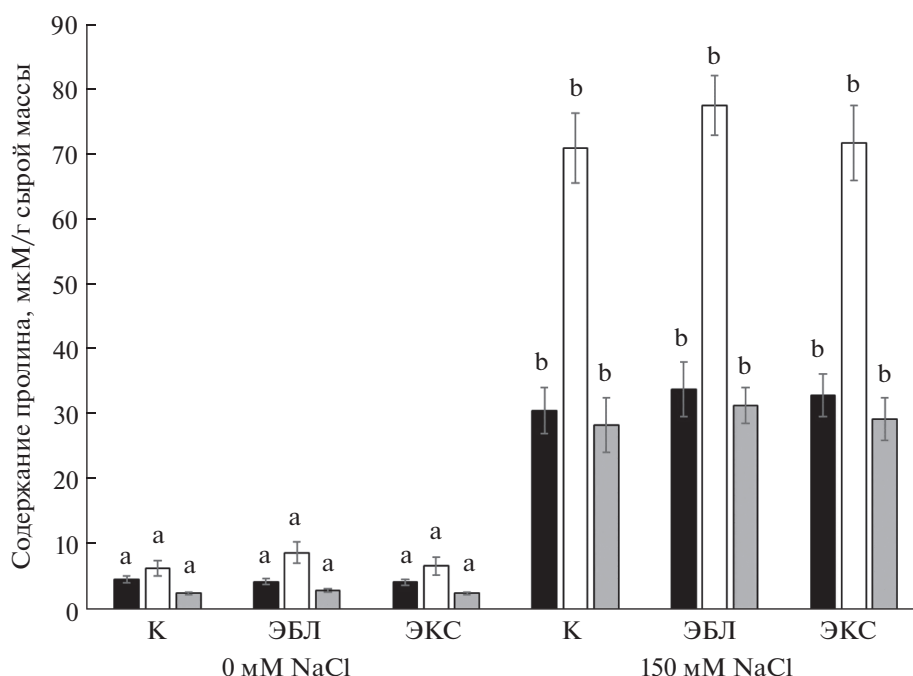
#### *Влияние brassinosteroidов и NaCl на содержание пролина в растениях*

Для поддержания водного гомеостаза между основными внутриклеточными компартментами цитоплазмой и вакуолью в условиях засоления важная роль принадлежит совместимым осмолитам, одним из которых является пролин [19]. В оптимальных условиях выращивания кратковременная обработка растений БС не влияла на эндогенное содержание пролина. Хлоридное засоление повышало уровень пролина в листьях в 6 раз, в стеблях и корнях – в 11 раз по сравнению с контрольным вариантом. Прайминг БС с последующим засолением растений не вызывал достоверных изменений в содержании пролина по сравнению с действием одного 150 мМ NaCl (рис. 5).

#### *Влияние ЭБЛ, ЭКС и NaCl на активности супероксиддисмутазы и пероксидазы в листьях растений рапса*

Для снижения негативного влияния окислительного стресса в растениях активируются антиоксидантные защитные системы, действие которых направлено на гашение активных форм кислорода (АФК). Важными ферментами антиоксидантной системы являются СОД и пероксидаза (ПО). В ответ на действие NaCl растения отвечали увеличением активности СОД в 2.3 раза и ПО на 26% относительно контрольных значений (рис. 6, 7).

Кратковременное воздействие ЭБЛ и ЭКС повышало активность СОД в 4.6 и 6.7 раз, соответственно, в сравнении с контрольным вариантом



**Рис. 5.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на содержание пролина у растений. Столбики черного цвета – листья, белого цвета – стебли, серого цвета – корни. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.

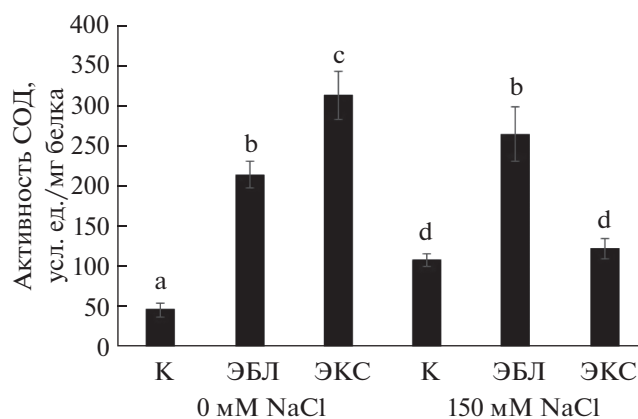
(рис. 6). Активность ПО достоверно повышалась только в ответ на действие ЭКС на 48% по сравнению с контролем (рис. 7).

Выявлена специфика действия БС в отношении активации ферментативной антиоксидантной системы у растений на фоне последующего солевого стресса. Так, кратковременная обработка ЭБЛ при последующем засолении приводила к увеличению активности СОД в 2.5 раза относительно соответствующих значений в растениях, подвергнутых хлоридному засолению, в то время

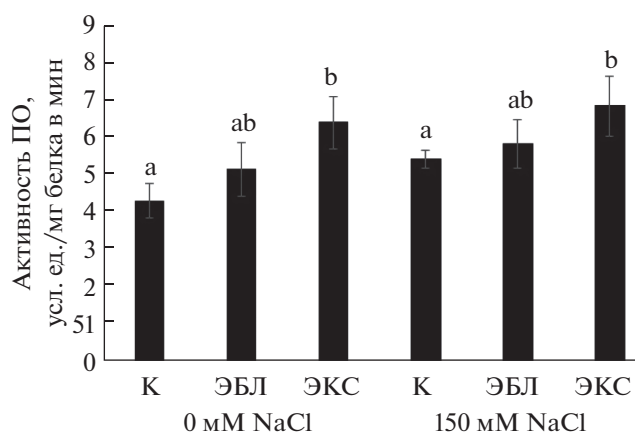
как эффект ЭКС был сопоставим с действием одного стрессора (рис. 6). Прайминг растений рапса БС с последующим засолением вызывал достоверное увеличение активности ПО относительно действия стрессора только в случае с ЭКС (рис. 7).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных негативных эффектов засоления является торможение роста растений, в основе которого лежит, прежде всего, прогресси-



**Рис. 6.** Влияние ЭБЛ, (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на активность СОД в листьях растений. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.



**Рис. 7.** Влияние ЭБЛ (10 нМ), ЭКС (10 нМ) и NaCl (150 мМ) на активность пероксидазы (ПО) в листьях растений рапса. Достоверные различия на уровне  $P \leq 0.05$  отмечены разными буквами.



рующий водный дефицит, обусловленный снижением способности клеток корня поглощать воду. Осмотический стресс инициирует развитие в растениях водного дефицита [20], приводящего к нарушению клеточного гомеостаза и снижению продуктивности растений [21]. В нашем исследовании хлоридное засоление ожидаемо ингибировало рост растений рапса. Подавление роста стебля и листьев 150 мМ NaCl снижало накопление биомассы и оводненность тканей (табл. 1, рис. 2). Такие отрицательные последствия засоления сопровождалось значительным понижением осмотического потенциала клеточного экссудата в листьях (рис. 3). Ранее было показано, что для адаптации к осмотическому стрессу ключевую роль играют  $K^+$  и  $Na^+$  [22]. В данном исследовании наблюдалось усиление накопления натрия и хлора, и падение концентраций других исследованных ионов на фоне засоления. Известно, что БС повышают устойчивость растений к осмотическому стрессу [12]. Такой эффект достигался за счет повышения эффективности использования воды и снижения устьичной проводимости [23]. Кратковременная обработка растений БС понижала величину осмотического потенциала в листьях при солевом стрессе (рис. 3). При этом вызванное ЭКС падение осмотического потенциала, по-видимому, повышало водопоглотительную способность клеток корня, поскольку морфометрические показатели растений и оводненность тканей практически соответствовали контрольным значениям (табл. 1). Возможно, данный эффект мог быть реализован путем гормональной регуляции накопления ионов в разных частях растений.

Известно, что продуктивность растения может определяться фотосинтетической активностью ассимиляционного аппарата, которая напрямую зависит от содержания фотосинтетических пигментов [24]. В настоящей работе показана высокая чувствительность фотосинтетического аппарата растений рапса к действию NaCl, о чем свидетельствует снижение содержания фотосинтетических пигментов на 38–44% (рис. 1). Аналогичные эффекты были обнаружены, например, на растениях риса [25] и картофеля [11]. Кроме того, известно, что NaCl ингибирует первичные процессы фотосинтеза в растениях картофеля посредством снижения скорости транспорта электронов, максимального и эффективного квантовых выходов фотосистемы II. Данные негативные эффекты засоления могут быть вызваны токсичным действием ионов на способность растений окислять пластохиновый пул [12]. Кратковременное воздействие на растения рапса лактон- или кетонсодержащих БС (10 нМ) с последующим солевым стрессом не снимало негативного действия засоления на основные фотосинтетические пигменты (рис. 1). Вероятно, эффект кратковременного действия БС на растения видоспецифичен. Так, корневая предобработка

растений картофеля 0.1 нМ ЭБЛ снижала отрицательное воздействие последующего засоления на содержание основных фотосинтетических пигментов, максимальный и эффективный квантовые выходы фотосистемы II и коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции qP [12].

Как уже отмечалось выше, NaCl в высоких концентрациях вызывает не только осмотический стресс, но и прямое токсическое действие на клеточный метаболизм, что сопровождается генерацией АФК и развитием окислительного стресса. Основная причина окислительного стресса в этом случае связана с закрыванием устьиц, снижением доступности  $CO_2$  и повышением энергии возбужденных электронов [26]. Другой причиной генерации АФК является нарушение дыхания в условиях солевого стресса. АФК вызывают деградацию белков и нуклеиновых кислот, окисление липидов, распад фотосинтетических пигментов и инактивацию ферментных систем. Вызываемое АФК повреждение мембран является основной причиной интоксикации клеток растений [26]. Удобным и широко распространенным методом оценки интенсивности окислительного стресса растений и структурной целостности мембран является определение уровня МДА, продукта реакции с тиобарбитуровой кислотой [12]. Нами была установлена органо-специфичность в накоплении МДА в растениях при солевом стрессе. Содержание МДА у растений рапса, подвергнутых действию NaCl, превышало контрольные значения, что свидетельствует о развитии у растений окислительного стресса. Кратковременная обработка растений БС не вызвала достоверных различий относительно действия одного NaCl (рис. 4).

Для снижения негативного влияния окислительного стресса в растениях активируются антиоксидантные защитные системы, действие которых направлено на гашение АФК. Повышенный интерес в этой связи могут представлять ферментативные (СОД, ПО, каталаза и др.) и неферментативные системы антиоксидантной защиты (каротиноиды, низкомолекулярные фенольные соединения, пролин и др.) [27]. Известно, что каротиноиды участвуют в тушении  $^1O^2$  и пероксида радикалов, которые генерируются при избыточном возбуждении хлорофилла [28] из-за падения тургора замыкающих клеток и сокращения, вследствие этого, поступления углекислоты в растение. Данная стратегия адаптации, направленная на снижение интенсивности окислительного стресса за счет аккумуляции каротиноидов, характерна, в основном, для растений галофитов [29]. Наиболее вероятно, что у растений рапса, относящегося к гликофитам, происходит накопление других антиоксидантных соединений, что и может быть причиной отсутствия стимулирующего эффекта ЭБЛ на содержание каротиноидов при хлоридном засолении (рис. 1).

Аккумуляция пролина является одной из типичных реакций растений на солевой стресс [19]. Уровень накопления пролина при засолении зависит от вида, сорта, стадии развития растения и интенсивности солевого стресса [30]. Нами показано, что содержание совместимого осмолита пролина в ответ на действие NaCl значительно увеличивалось во всех частях растений. Проллин, являясь “химическим шапероном”, реализует защитное действие через стабилизацию функциональных единиц II комплекса ЭТЦ хлоропластов, поддержание нативной конформации белков и ферментов, таких как РУБИСКО, а также проявляя антиоксидантные свойства и вовлекаясь в тушение активных форм кислорода [19]. Уровень пролина в растениях, подвергнутых праймингу БС, с последующим засолением был сходным с его содержанием в присутствии одного NaCl (рис. 5). Длительное воздействие БС на фоне солевого стресса не только не сопровождался дополнительным накоплением пролина, но и напротив, способствовал понижению его уровня [14].

В то же самое время кратковременное гормональное воздействие, особенно ЭКС, способствовало проявлению выраженного антиоксидантного эффекта (рис. 4, 7). Можно предположить, что подобная активность БС при последующем солевом стрессе в растениях рапса реализуется не через регуляцию накопления пролина, а через иные компоненты клеточной антиоксидантной системы.

Нами показана различная реакция антиоксидантных ферментов на кратковременную предобработку растений ЭБЛ и ЭКС при последующем действии NaCl. Так, растения, подвергнутые праймингу ЭБЛ, отвечали повышением активности СОД, в то время как экзогенный ЭКС способствовал усилению активности ПО по сравнению с действием только солевого стресса (рис. 6, 7). Аналогичный результат показан на колеоптилях пшеницы, подвергнутых термическому стрессу. Отмечено, что через 24 ч инкубации колеоптилей в растворах ЭБС и ЭКС на фоне термического стресса наблюдалась значительная активация СОД, причем для ЭБЛ в большей степени [15]. На растениях картофеля в условиях 0.1 нМ ЭБЛ прайминга также наблюдалась некоторая стимуляция активности СОД и пероксидазы только в течение первых 24 и 48 ч солевого воздействия соответственно [12]. Следует также обратить внимание на тот факт, что кратковременная обработка растений БС приводила к значительной стимуляции активностей СОД и ПО в контрольных растениях (рис. 6, 7). Весьма вероятно, что именно этот эффект ЭБЛ и ЭКС на антиоксидантные ферменты имеет принципиальное значение, поскольку он направлен на упреждающее формирование клеточной антиоксидантной системы для “встречи”

растения с отсроченным солевым стрессом, который вызывает интенсивную генерацию АФК.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что кратковременная обработка корней рапса лактон- и кетонсодержащими БС индуцирует переход растений в состояние прайминга, которое проявляется в их способности отвечать повышением устойчивости на солевой стресс в будущем. В основе защитного действия БС при заданных условиях, очевидно, лежит их способность еще до стресса формировать клеточную антиоксидантную систему и воздействовать на систему транспорта неорганических ионов таким образом, что она обеспечивает активное поступление несовместимых осмолитов при солевом стрессе, следствием чего является понижение клеточного осмотического потенциала и повышение эффективности поглощения воды. При этом специфика повышения активности антиоксидантных ферментов зависит от химической структуры гормона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-90093).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Qadir M., Noble A.D., Schubert S., Thomas R.J., Arslan A.* Sodicity-induced land degradation and its sustainable management: Problems and prospects // *Land Degrad. Dev.* 2006. V. 17. P. 661. <https://doi.org/10.3390/w5020578>
2. *Cuevas J., Daliakopoulos I.N., Moral F., Hueso J.J., Tsanis I. K.* A Review of soil-improving cropping systems for soil salinization: Review // *Agronomy.* 2019. V. 9. P. 295. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060295>
3. *Панкова Е.И.* Засоленные почвы: решенные и нерешенные проблемы // *Почвоведение.* 2015. Т. 2 С. 131. <https://doi.org/10.7868/S0869587314020121>
4. *Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M.* Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages // *Ecophysiology and Responses of Plants Under Salt Stress / Eds. Ahmad P., Azooz M., Prasad M.* Springer, New York, NY, 2013. P. 25. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4_2)
5. *Zorb C., Geilfus C.M., Diet K.J.* Salinity and crop yield // *Plant Biol.* 2019. V.1. P. 31. <https://doi.org/10.1111/plb.12884>
6. *Atia A., Barhoumi Z., Debez A., Hkiri S., Abdelly C., Smaoui A., Haouari C.C., Gouia H.* Plant hormones: Potent targets for engineering salinity tolerance in plants // *Salinity Responses and Tolerance in Plants / Eds. Kumar V., Wani S., Suprasanna P., Tran L.S.*

- Springer, Cham., 2018. V. 1. P. 159.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4_6)
7. *Khripach V., Zhabinskii V., Groot A.D.* Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // *Ann Bot.* 2000. V. 86. P. 441.  
<https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1227>
  8. *Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Khripach N.B.* New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus // *Brassinosteroids* / Eds. Hayat S., Ahmad A. Springer, Dordrecht, 2003. P. 189.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-017-0948-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0948-4_9)
  9. *Ahammed G.J., Li X., Liu A., Chen S.* Brassinosteroids in plant tolerance to abiotic stress // *J. Plant Growth Regul.* 2020.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10098-0>
  10. *Nolan T.M., Vukasinovic N., Liu D., Russinova E., Yin Y.* Brassinosteroids: Multi-dimensional regulators of plant growth, development, and stress responses // *Plant Cell.* 2020. V. 32. P. 295.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>
  11. *Efimova M.V., Khripach V.A., Boyko E.V., Malofii M.K., Kolomeichuk L.V., Murgan O.K., Vidarspun A.N., Mukhamatdinova E.A., Kuznetsov V.V.* The priming of potato plants induced by brassinosteroids reduces oxidative stress and increases salt tolerance // *DOBS.* 2018. Vol. 478, № 6. P. 33.  
<https://doi.org/10.1134/S0012496618010106>
  12. *Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., Zlobin I.E., Kreslavski V.I., Murgan O.K., Kovtun I.S., Khripach V.A., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I.* 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants // *Photosynth. Res.* 2020  
<https://doi.org/10.1007/s11120-020-00708-z>
  13. *Sytar O., Kumari P., Yadav S., Brestic M., Rastogi A.* Phytohormone priming: regulator for heavy metal stress in plants // *J. Plant Growth Regul.* 2019. V. 38. P. 739.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-018-9886-8>
  14. *Efimova M.V., Savchuk A.L., Hasan J.A.K., Litvinovskaya R.P., Khripach V.A., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V.* Physiological mechanisms of enhancing salt tolerance of oilseed rape plants with brassinosteroids // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61, № 6. P. 733.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443714060053>
  15. *Tanveer M., Shahzad B., Sharma A., Biju S., Bhardwaj R.* 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 130. P. 69.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.035>
  16. *Wang X., Gao Y., Wang Q., Chen M., Ye X., Li D., Chen X., Li L., Gao D.* 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 135. P. 30.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.026>
  17. *Sharma I., Ching E., Saini S., Bhardwaj R., Pati P.K.* Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1 // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 69. P. 17.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.04.013>
  18. *Jaarsma R., Vries R.S.M., Boer A.H.* Effect of salt stress on growth, Na<sup>+</sup> accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars // *PLoS ONE.* 2013.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060183>
  19. *Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I.* Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation // *Russ. J. Plant Physiol.* 1999. V. 46. P. 274.
  20. *Lisar S.Y.S., Motafakkerzad R., Hossain M.M., Rahman I.M.M.* Water stress in plants: Causes, effects and responses // *Water Stress* / Eds. Rahman I.M.M., Hasegawa H. IntechOpen, 2012.  
<https://doi.org/10.5772/39363>
  21. *Abdelraheem A., Esmaeili N., O'Connell M., Zhang J.* Progress and perspective on drought and salt stress tolerance in cotton // *Ind. Crop. Prod.* 2019. V. 130. P. 118.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.070>
  22. *Gharbi E., Martínez J.P., Benahmed H., Hichri I., Dobrev P.I., Motyka V., Quineta M., Luttsa S.* Phytohormone profiling in relation to osmotic adjustment in NaCl-treated plants of the halophyte tomato wild relative species *Solanum chilense* comparatively to the cultivated glycophyte *Solanum lycopersicum* // *Plant Science.* 2017. V. 258. P. 77.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.02.006>
  23. *Tanveer M.* Role of 24-Epibrassinolide in inducing thermo-tolerance in plants // *J. Plant Growth Regul.* 2019. V. 38. P. 945.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-018-9904-x>
  24. *Zivcak M., Olsovska K., Brestic M.* Photosynthetic responses under harmful and changing environment: Practical aspects in crop research // *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications* / Eds. Hou H., Najafpour M., Moore G., Allakhverdiev S. Springer, Cham., 2017. P. 203.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48873-8_10)
  25. *Chutipajit S., Cha-um S., Sompornpailin K.* High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. *indica* // *Aust. J. Crop Sci.* . 2011. V. 5. P. 1191.
  26. *Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S.* Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. V. 30. P. 161.
  27. *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>
  28. *Demmig-Adams B., Adams W.W.III.* The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis // *Trends Plant Sci.* 1996. V. 1. P. 21.  
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7)
  29. *Ozgur R., Uzilday B., Sekmen A.H., Turkan I.* Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes // *Funct. Plant Biol.* 2013. V. 40. P. 832.  
<https://doi.org/10.1071/FP12389>
  30. *Mansour M.M.F., Ali E.F.* Evaluation of proline functions in saline conditions // *Photochemistry.* 2017. V. 140. P. 52.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.04.016>

## ВОДНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АПОПЛАСТА ПОДУСТЫЧНОЙ ПОЛОСТИ ЛИСТА *Suaeda altissima* (L.) Pall. ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

© 2021 г. П. Ю. Воронин<sup>а</sup>, \*, Н. А. Мясоедов<sup>а</sup>, Л. А. Халилова<sup>а</sup>, Ю. В. Балнокин<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: pavel@ippras.ru

Поступила в редакцию 05.09.2020 г.

После доработки 18.10.2020 г.

Принята к публикации 18.10.2020 г.

С помощью метода регистрации водного потенциала апопласта клеток подустычной полости листа ( $\psi_{wa}$ ), позволяющего измерять на интактном листе одновременно интенсивность фотосинтетического  $CO_2/H_2O$  газообмена, исследовали у галофита сведы высокой, *Suaeda altissima* (L.) Pall., в условиях хлоридно-натриевого засоления питательного раствора формирование градиента водного потенциала в системе целого растения, измеряли скорость поглощения  $CO_2$  и транспирации, а также содержание ионов  $Na^+$  и  $Cl^-$  в органах. Установлено, что наряду со снижением биологической продуктивности растений, засоление питательного раствора приводит к уменьшению их способности к эквивалентному, по сравнению с  $Na^+$ , накоплению  $Cl^-$ ; уменьшению градиента водного потенциала между питательным раствором и апопластом клеток подустычной полости листа за счет повышения  $\psi_{wa}$  и, соответственно, к уменьшению потока воды из корней в листья и интенсивности  $CO_2/H_2O$  газообмена листа. Показано, что ключевую роль у *S. altissima* в регуляции транспорта воды в восходящем направлении в условиях засоления играет падение водного потенциала на границе жидкой и газовой фаз в апопласте подустычной полости листа, выражаемое величиной  $\psi_{wa}$ . Мы предполагаем, что наблюдавшееся под действием NaCl возрастание  $\psi_{wa}$  обусловлено подавлением фотосинтеза, необходимого для биосинтеза осмолитов, а также отражает снижение биологической продуктивности растений и силу стрессорного действия на них NaCl.

**Ключевые слова:** *Suaeda altissima*, сведа высокая, водный потенциал апопласта подустычной полости листа, фотосинтетический  $CO_2/H_2O$  газообмен листа, хлоридно-натриевое засоление питательного раствора, солевой стресс, биологическая продуктивность

DOI: 10.31857/S0015330321030179

### ВВЕДЕНИЕ

Почвенное засоление является для растений одним из наиболее вредоносных факторов среды. Более 800 млн га земли и, по крайней мере, 20% площади поливных земель в мире в той или иной степени засолены [1]. Солевой стресс оказывает на растения осмотическое и токсическое действие, приводит к подавлению жизненно важных процессов и физиологических функций (фотосинтеза, минерального питания, роста) и вызывает снижение продуктивности сельскохозяйственных культур. Глобальное потепление и усиление региональной аридизации климата способствует увеличению площади засоленных земель [2]. Поэтому изучение механизмов адаптации и устойчивости растений к засолению традиционно находится в фокусе физиологии растений.

**Сокращение:**  $\psi_{wa}$  — водный потенциал апопласта подустычной полости листа.

Важную роль в водном обмене растений и устойчивости к солевому и осмотическому стрессам играет формирование градиента водного потенциала в системе почвенный раствор — корень — побег — атмосфера. Значительный вклад в снижение водного потенциала на отдельных этапах транспорта воды играют осмолиты — низкомолекулярные органические соединения, выполняющие как осморегуляторную, так и протекторную по отношению к биополимерам функцию [3]. Эти вещества снижают водный потенциал не только во внутриклеточных компартментах, но также, по-видимому, и в апопласте [4].

Недавно был предложен новый метод измерения водного потенциала апопласта клеток мезофилла в подустычной полости листа ( $\psi_{wa}$ ) [4]. Этот метод позволяет измерять на интактном листе одновременно с  $\psi_{wa}$  интенсивность фотосинтетического  $CO_2$  газообмена и транспирации. Было показано, что у растений резкое падение

водного потенциала происходит на границе водной фазы клеток мезофилла и газовой фазы подустычной полости листа [4]. Эксперименты, проведенные с использованием этого метода, показали также, что  $\psi_{wa}$  в условиях солевого стресса и водного дефицита у хвои сосны снижается [5]. На проростках кукурузы были получены данные, позволившие обосновать предположение, что увеличение содержания органических осмолитов в клетках листьев под влиянием водного стресса приводит к снижению  $\psi_{wa}$ , тогда как уменьшение содержания осмолитов в клетках листьев вызывает повышение этого показателя [6]. Мы предположили, что синтезируемые в клетках осмолиты транспортируются по градиенту концентрации в апопласт, внося вклад в снижение его водного потенциала. Данное исследование продолжает цикл работ, посвященных физиологической роли регуляции  $\psi_{wa}$  при стрессе. Мы изучали влияние хлоридно-натриевого засоления субстрата выращивания на рост растений, водный потенциал апопласта подустычной полости листа ( $\psi_{wa}$ ), формирование градиента водного потенциала в системе целого растения и  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ -газообмен интактных листьев галофита (*Suaeda altissima*).

Цель работы – проверка предположения, что в условиях засоления величина  $\psi_{wa}$  отражает, наряду с биологической продуктивностью, способность сведы высокой противостоять стрессовому воздействию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Семена сведы высокой, *Suaeda altissima* (L.) Pall., были собраны с растений, произрастающих на берегу соленого озера Эльтон (Волгоградская обл.). Семена проращивали во влажном песке при комнатной температуре. Через три недели проростки пересаживали в 3-литровые стеклянные сосуды (4 растения на сосуд) на аэрируемый питательный раствор (ПР) [7]. Растения выращивали в факторостатной камере при 24°C в условиях водной культуры и освещали лампами высокого давления ДНаЗ 250 Вт (“Reflux”, Россия) с фотопериодом 16/8 ч (день/ночь) при интенсивности света 500 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Замену раствора в сосудах проводили каждую неделю в течение первых трех недель. По достижении 42-дневного возраста растений в ПР поэтапно вносили хлористый натрий с инкрементом 50 или 100 мМ до конечных концентраций 0 (контроль), 250 (вариант I) или 750 (вариант II) мМ. Далее растения росли без замены ПР до 60-дневного возраста, после чего были использованы для анализа.

**Осмотическое давление** растворов определяли криоскопическим методом с помощью осмометра OSMoMaT 030-D-RS (“Gonotec”, Германия) согласно инструкции производителя.

**Определение содержания  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в органах растений.** Высушенные при 90°C органы растений измельчали до порошкообразного состояния. Ионы из образцов извлекали кипячением в дистиллированной воде в течение 2 мин, экстракт фильтровали. Концентрацию  $\text{Na}^+$  в фильтратах определяли с помощью пламенного фотометра ФПА-2-01 (ОАО “ЗОМЗ”, Россия), концентрацию  $\text{Cl}^-$  путем титрования экстрактов ионами ртути согласно ГОСТ Р 4245-72, используя полуавтоматический титратор TopBuret (“Eppendorf”, Германия).

**Стационарный фотосинтетический  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ -газообмен** интактных листьев *S. altissima* изучали с помощью инфракрасного газоанализатора LI-820 (“Li-Cor”, США) в открытой проточной системе при атмосферной концентрации  $\text{CO}_2$  и интенсивности ФАР 200 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) [8]. Для этого неотделенный от растения лист помещали в листовую камеру-прищепку при комнатной температуре и освещали осветителем KL 1500 LCD (“Shott”, Германия) с галогеновой лампой 150 Вт (“Philips”, Нидерланды) через оптоволоконный световод. Лист адаптировали к условиям листовой камеры-прищепки в течение 15–20 мин до достижения стационарного режима фотосинтетического  $\text{CO}_2$ -газообмена. Транспирацию листа рассчитывали на основании разности влажности газа на входе и выходе из листовой камеры. В опорном газовом потоке на входе в листовую камеру поддерживали постоянную влажность при 25°C с помощью увлажнителя LI-610 (“Li-Cor”, США). Для определения влажности воздуха на выходе из листовой камеры использовали психрометрический датчик HMP50 (“Vaisala Intercap”, Финляндия). Питающим газом служил атмосферный воздух, предварительно собранный в 30-литровом полиэтиленовом газгольдере. Расход газа (100 мл/мин) обеспечивал непрерывную работу установки в течение 5 ч. Смесительный узел газового тракта позволял стабильно поддерживать концентрацию  $\text{CO}_2$  380 ppm в воздушном потоке на входе в листовую камеру.

**Определение водного потенциала на границе водной и газовой фаз апопласта на поверхности клеток мезофилла, выстилающих подустычную полость.** Согласно теории общего термодинамического взаимодействия статистической физики [9, с. 274], зависимость равновесного давления водяного пара над поверхностью водного раствора от водного химического потенциала описывается уравнением [10, с. 15]:

$$e = e_0 \exp(\psi V / (RT)), \quad (1)$$

где  $e$  – равновесное давление паров воды над водным раствором;  $e_0$  – давление насыщенного водяного пара над поверхностью чистой воды ( $\psi_0 = 0$ ) при абсолютной температуре  $T$ ;  $R$  – универсальная

**Таблица 1.** Биомасса листьев (А) и корней (В) *S. altissima* и содержание в них воды в конце эксперимента ( $n = 3$ )

Вариант	Органы	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Содержание воды, %
Контроль	Листья (А)	23.6 ± 2.5	5.1 ± 0.5	78
	Корни (В)	14.1 ± 1.2	1.48 ± 0.2	90
	А + В	37.7	6.6	–
	А/В	1.8	3.6	–
I	Листья (А)	58.6 ± 3.8	10.74 ± 0.6	82
	Корни (В)	32.2 ± 2.8	2.96 ± 0.18	91
	А + В	90.8	13.7	–
	А/В	1.8	3.6	–
II	Листья (А)	22.9 ± 2.10	2.13 ± 0.12	91
	Корни (В)	4.8 ± 0.4	0.47 ± 0.10	90
	А + В	27.7	2.6	–
	А/В	4.77	4.5	–

газовая постоянная (8.31441 Дж/(моль К));  $T$  – абсолютная температура (К);  $V$  – молярный объем воды ( $18 \times 10^{-6}$  м<sup>3</sup>/моль). Поэтому

$$\psi = (RT \ln(e/e_0))/V. \quad (2)$$

Физическая размерность водного потенциала видна из уравнения (2) и выражается в Дж/м<sup>3</sup> или Па.

По определению, относительная влажность (RH) представлена уравнением:

$$RH = (e/e_0) \times 100\%, \quad (3)$$

где  $e_0$  – давление насыщенного водяного пара (Па);  $e$  – фактическое давление водяного пара (Па).

Значение влажности воздуха, при которой транспирация прекращается, получали линейной аппроксимацией экспериментально полученной зависимости транспирации от относительной влажности воздуха [4]. Применение уравнений (2) и (3) позволяет рассчитать значение водного потенциала, исходя из экспериментально определенных значений относительной влажности (RH) в подустьичной полости при данной температуре листа.

**Статистическая обработка.** Все эксперименты проведены в трех биологических повторностях. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначена достоверность различий (двухфакторный анализ ANOVA;  $P < 0.05$ ). Одинаковые буквы показывают отсутствие достоверных различий.

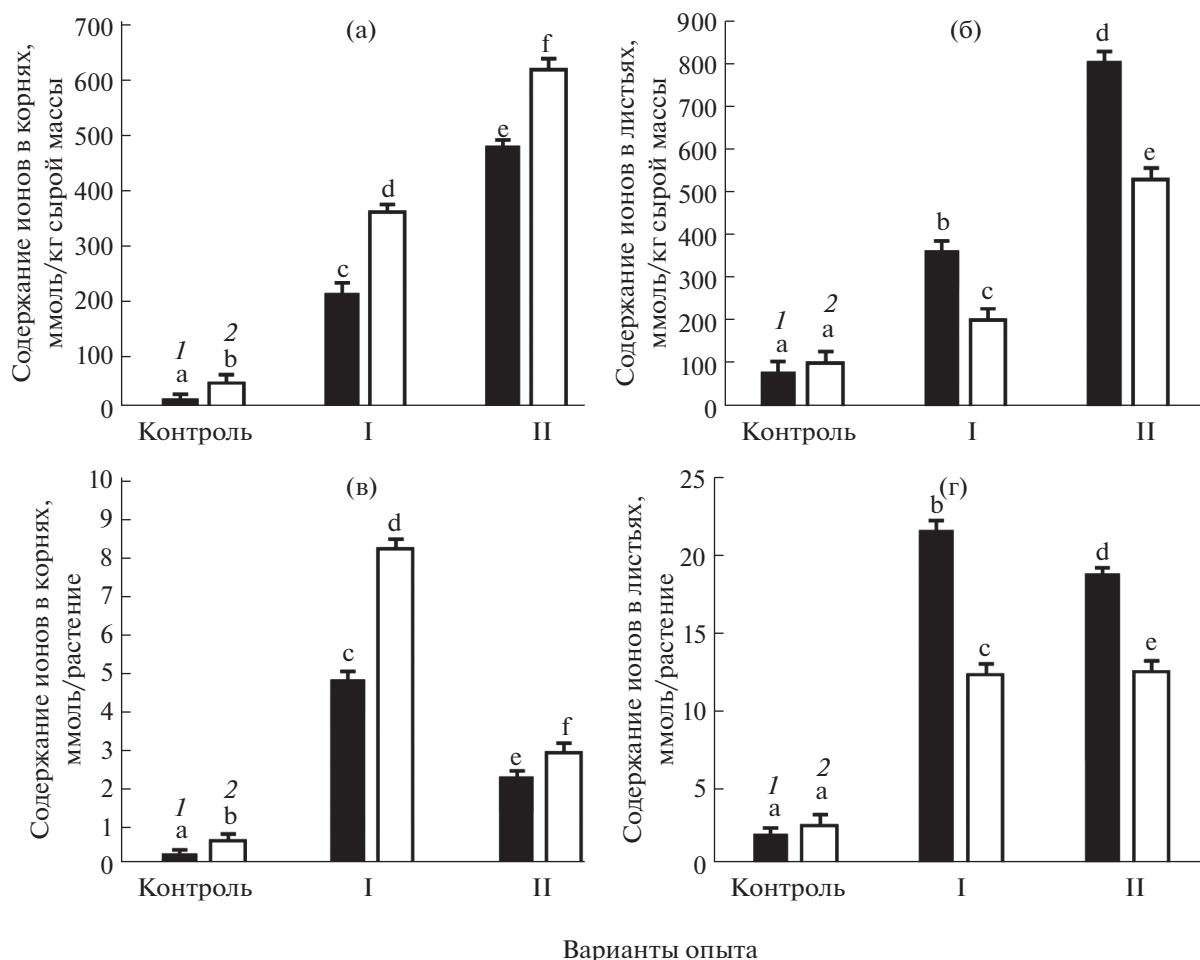
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование роли и регуляции водного потенциала апопласта клеток подустьичной полости листа *S. altissima* в условиях солевого стресса проводили, выращивая растения при концентрациях

NaCl в ПР 250 мМ (вариант I) и 750 мМ (вариант II), а также в отсутствие добавленного хлористого натрия (контроль). В последнем случае ПР содержал лишь следовые количества NaCl, поступающие в ПР в виде примеси с другими реагентами.

**Рост растений и содержание воды в органах.** Хлористый натрий, внесенный в ПР, стимулировал рост растений при концентрации 250 мМ и тормозил его при концентрации 750 мМ. Торможение роста у растений варианта II выразилось более чем в 2-кратном снижении средней сухой биомассы надземных органов в расчете на одно растение, по сравнению с растениями контрольного варианта, и в 5-кратном снижении, по сравнению с растениями варианта I (табл. 1). Различия в сухой биомассе корневой системы между вариантами качественно соответствовали различиям в биомассе надземной части растений, но были выражены еще сильнее. Так, в расчете на одно растение сухая биомасса корней в варианте II была почти в 6 раз меньше, чем у растений варианта I, и в 3 раза меньше, чем у контрольных растений (табл. 1). Содержание воды в корнях во всех вариантах было приблизительно одинаковым и составляло около 90% от общего веса корней (табл. 1). Содержание воды в надземных органах заметно различалось у растений разных вариантов: 78% в контроле, 82% в варианте I и 91% в варианте II.

**Содержание Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в органах.** Измерение содержания ионов в органах *S. altissima* показало, что корни и листья поглощают и накапливают как Na<sup>+</sup>, так и Cl<sup>-</sup> при всех наружных концентрациях NaCl в ПР (рис. 1). Даже в контрольном варианте содержание Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в корнях составило 14 и 46 ммоль/кг в расчете на сырую биомассу (рис. 1а), а в листьях – 79 и 107 ммоль/кг (рис. 1б), соответственно. Содержание ионов в органах

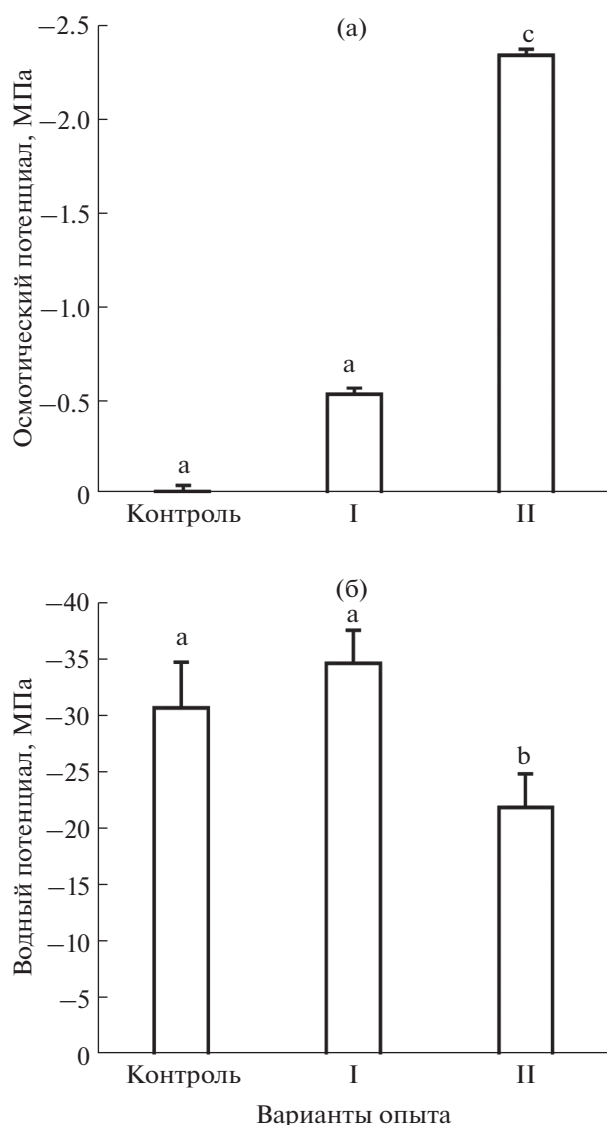


**Рис. 1.** Содержание ионов Na<sup>+</sup> (1) и Cl<sup>-</sup> (2) в корнях (а, в) и листьях (б, г) *S. altissima* при разных концентрациях NaCl в питательном растворе. а, б – в расчете на кг сырой биомассы; в, г – в расчете на одно растение. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины.

было тем больше, чем была выше концентрация Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> в питательном растворе. При максимальной концентрации NaCl в ПР (вариант II), содержание Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в корнях составило 478 и 605 ммоль/кг (рис. 1а), а в листьях – 797 и 535 ммоль/кг (рис. 1б), соответственно. Таким образом, по мере увеличения концентрации NaCl в ПР количество поглощенных ионов и Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> возрастало как в корнях, так и в листьях. Данные, представленные на рис. 1, демонстрируют также различие в поглощении растениями катиона Na<sup>+</sup> и аниона Cl<sup>-</sup>. При равных исходных концентрациях Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> в ПР корни *S. altissima* во всех вариантах опыта содержали заметно больше Cl<sup>-</sup>, чем Na<sup>+</sup> (рис. 1а). Листья, наоборот, содержали больше Na<sup>+</sup>, чем Cl<sup>-</sup> (кроме растений контрольного варианта) (рис. 1б). Суммарное содержание Na<sup>+</sup> в корнях и листьях преобладало над суммарным содержанием Cl<sup>-</sup>. Наиболее вероятным претендентом на роль веществ, компенсирующих избыточные положительные заряды ионов натрия в листьях, являются

ся анионы органической природы. По данным, представленным в табл. 1 и на рис. 1а, б, была рассчитана поглощательная способность корней и листьев *S. altissima* по отношению к ионам в расчете на одно растение (рис. 1в, г). Растения поглощали максимальное количество Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> при оптимальной для роста концентрации NaCl в ПР (250 мМ). При высокой концентрации NaCl (750 мМ) количество поглощенных ионов в расчете на одно растение были более низким, чем при 250 мМ NaCl, хотя в расчете на единицу сырой биомассы соленакопление возрастало по мере увеличения наружной концентрации соли и было максимальным при 750 мМ NaCl в ПР (рис. 1а, б), свидетельствуя о том, что лимитирующим фактором соленакопления при солевом стрессе являлось снижение скорости роста растений, т.е. снижение биомассы корней и листьев.

**Градиент водного потенциала в системе целого растения и фотосинтетический CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O газообмен листьев *S. altissima*.** Движение воды из почвы в ко-



**Рис. 2.** Осмотический потенциал питательного раствора (а) и водный потенциал листьев (б) *S. altissima* при разных концентрациях NaCl в питательном растворе. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины.

рень и далее в надземные органы осуществляется по градиенту водного потенциала [12, с. 81–139]. Для того, чтобы оценить значения градиентов водного потенциала в системе целого растения *S. altissima*, мы измеряли водный (осмотический) потенциал ПР и водный потенциал подустьичной полости листьев растений ( $\psi_{wa}$ ) в конце эксперимента, т.е. после 60-дневного культивирования растений (рис. 2а, б). Значения водного (осмотического) потенциала ПР разных вариантов опыта существенно различались (рис. 2а). Различия были обусловлены как внесением в питательные растворы NaCl в разных концентрациях, так и разной интенсивностью поглощения ионов рас-

тениями в процессе роста. Существенно более низкие значения водного потенциала ПР вариантов I и II, чем в контроле, объясняются внесением в них NaCl в высоких концентрациях. Наименьший осмотический потенциал, равный  $-2.34$  МПа, был обнаружен в ПР варианта II. В ПР варианта I осмотический потенциал составил  $-0.54$  МПа, т.е. в 4 раза больше, чем в варианте II. Осмотический потенциал ПР в контрольном варианте составлял  $-0.026$  МПа, что в 100 раз больше чем в варианте II. Следует, однако, подчеркнуть, что различия между водными потенциалами питательных растворов разных вариантов опыта (рис. 2а) не оказали заметного влияния на их градиенты в системе ПР – корень – надземные органы, т. к. подавляющий вклад в формирование этого градиента обеспечивался снижением водного потенциала апопласта в подустьичной полости листа ( $\psi_{wa}$ ) (рис. 2б). Даже самый низкий водный (осмотический) потенциал ПР в варианте II был почти в 10 раз больше водного потенциала апопласта подустьичной полости листьев растений *S. altissima* этого варианта ( $-22$  МПа). У контрольных растений и растений варианта I превышение водного (осмотического) потенциала питательного раствора над водным потенциалом апопласта клеток в подустьичной полости листа ( $\psi_{wa}$ ) было выражено еще сильнее (рис. 2а, б). Таким образом, именно существенно более низкий по сравнению с осмотическим (водным) потенциалом питательного раствора водный потенциал апопласта подустьичной полости листьев обеспечивал физическую возможность передвижения воды по ксилеме от корней в листья растений во всех вариантах опыта. Инструментально реализацию этой физической возможности регистрировали измерением скорости транспирации листьев (рис. 3а). В варианте II (наибольшее засоление ПР) скорость транспирации была приблизительно вдвое ниже, чем в контрольном варианте или варианте I. Скорость фотосинтетического поглощения  $CO_2$  листьями различных вариантов опыта коррелировала со скоростью транспирации листьев (рис. 3б). Значения скоростей  $CO_2/H_2O$  газообмена листьев растений варианта I не отличались от таковых контрольных растений. Однако скорости  $CO_2/H_2O$  газообмена листьев растений варианта II были вдвое ниже соответствующих параметров контрольного варианта (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Для передвижения воды из корней в надземные органы должен поддерживаться градиент водного потенциала в направлении от корня к побегу. Более высокое содержание веществ в надземных органах, чем в корнях, вносит вклад в поддержание такого градиента. Содержание ионов  $Na^+$  и



$\text{Cl}^-$  в органах *S. altissima* было тем выше, чем была выше концентрация  $\text{NaCl}$  в питательном растворе. При этом содержание  $\text{Na}^+$  в листьях поддерживалось на более высоком уровне, чем в корнях, что отвечает условию движения воды в восходящем направлении. Однако концентрационный градиент  $\text{Cl}^-$  у *S. altissima* в условиях засоления имел противоположную направленность, т.е. в листьях содержание ионов  $\text{Cl}^-$  было заметно ниже, чем в корнях. Учитывая более высокое осмотическое давление (осмоляльность) в листьях *S. altissima*, чем в корнях [11], и принимая во внимание электронейтральность внутриклеточных растворов [12, с. 81–139], можно принять, что недостаток ионов  $\text{Cl}^-$  в органах клетки компенсируют органическими анионами. Последние не только поддерживают электронейтральность внутриклеточных растворов при более интенсивном поглощении клетками  $\text{Na}^+$ , по сравнению с  $\text{Cl}^-$ , но вносят также вклад в поддержание градиента осмотического потенциала и, следовательно, градиента водного потенциала между корнем и надземными органами. Увеличение концентрации  $\text{NaCl}$  в питательном растворе сопровождалось не только усилением соленакопления в корнях и листьях в расчете на единицу сырой биомассы (рис. 1), но и заметным торможением прироста биомассы (табл. 1).

К концу эксперимента водные (осмотические) потенциалы питательных растворов разных вариантов опыта заметно различались (рис. 2а). Водный потенциал апопласта листьев растений ( $\Psi_{\text{wa}}$ ) в варианте с наибольшим засолением (II) был приблизительно на треть больше, чем водный потенциал апопласта листьев в контроле и в варианте I (рис. 2б). Вследствие этого градиент водного потенциала между питательным раствором и апопластом листьев в подустычной полости (движущая сила транспорта воды в восходящем направлении) в варианте II был заметно меньше, чем в контроле и варианте I. Этому соответствовала более низкая скорость транспирации и фотосинтетической ассимиляции  $\text{CO}_2$  у растений *S. altissima* варианта II (рис. 3а) по сравнению с контролем и вариантом I (рис. 3б). Поток воды равен произведению градиента водного потенциала и водной проводимости [12, с. 81–139]. Совпадение соотношений фотосинтетического  $\text{CO}_2$  газообмена, транспирации листьев и градиентов водного потенциала в разных вариантах опыта позволяет сделать вывод об устьичном лимитировании водного потока через листья и в целом о нарушении водоснабжения растений *S. altissima* в условиях засоления. Можно предположить, что снижение потока воды в растениях при солевом стрессе приводит к нарушению донорно-акцепторных отношений, в первую очередь, между корневой и надземной частями растения. Согласно имеющимся в литературе данным [13], в общем случае нельзя

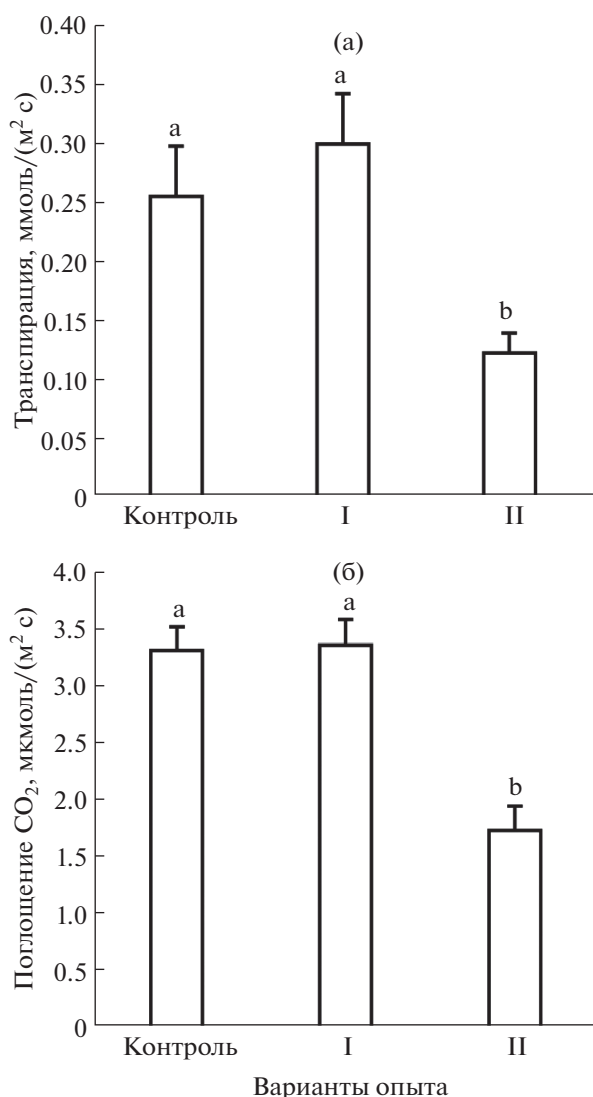


Рис. 3. Транспирация (а) и фотосинтетическое поглощение  $\text{CO}_2$  листьев (б) *S. altissima* при разных концентрациях  $\text{NaCl}$  в питательном растворе. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся величины.

исключать возможность неустыичного лимитирования  $\text{CO}_2$ -газообмена на свету. Однако в условиях данного опыта с точностью измерений соответствие снижения  $\text{CO}_2$ -газообмена на свету снижению транспирации листа (рис. 3) позволяет пренебречь вкладом темного дыхания в устьичное лимитирование  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ -газообмена.

Осмолитами, вносящими вклад в снижение  $\Psi_{\text{wa}}$ , как было показано ранее, могут быть такие продукты фотосинтеза, как восстанавливающие сахара [3]. Однако более низкое содержание  $\text{Cl}^-$ , по сравнению с  $\text{Na}^+$ , в листьях растений *S. altissima* указывает на биосинтез органических анионов, компенсирующих избыток положительных зарядов ионов натрия. Органические анионы, по-видимому, также вносят вклад в поддержание гра-

диента водного потенциала в системе целого растения у *S. altissima*.

Судя по данным  $\text{CO}_2$  газообмена, фотосинтез листьев растений варианта с наибольшим засолением питательного раствора (II) был в 2 раза ниже, чем в контроле и в варианте I (рис. 3б). Такое понижение скорости фотосинтеза в варианте II должно приводить к заметно меньшему, по сравнению с двумя другими вариантами опыта, образованию органических осмолитов и к смещению вследствие этого водного потенциала апопласта в подустьичной полости ( $\psi_{\text{wa}}$ ) к более высоким значениям. В соответствии с этим измеренное значение  $\psi_{\text{wa}}$  в варианте II было приблизительно на треть больше, чем в контроле и в варианте I (рис. 2б). Таким образом, несмотря на накопление соли клетками, приводящее к понижению их водного потенциала, движущая сила поступления воды в растения *S. altissima* в условиях засоления снижается за счет торможения фотосинтетического газообмена и снижения внутриклеточного содержания органических осмолитов (рис. 2б, 3)). В результате устьичного лимитирования транспорта воды из корней в листья, ограничения фотосинтетического  $\text{CO}_2$  газообмена и снижения ассимиляционной способности растений происходит замедление нарастания фитомассы (табл. 1). Полученные результаты показывают, что значение водного потенциала апопласта подустьичной полости листьев  $\psi_{\text{wa}}$ , наряду с биопродуктивностью, отражает силу стрессового воздействия засоления на галофит *S. altissima*. Остается открытым вопрос, какой механизм лежит в основе понижения водного потенциала апопласта подустьичной полости листьев. Как показано в нашей предыдущей работе [4], резкое снижение водного потенциала в апопласте листьев на границе водной и газовой фаз свойственно не только галофитам, но и гликофитам, т.е. носит универсальный характер. Возможно, ключ к пониманию механизма этого снижения кроется в комбинации капиллярных сил, развиваемых в апопласте, в сочетании с понижением осмотического потенциала апопласта за счет переноса органических осмолитов из клеток в капилляры клеточной стенки.

Работа поддержана за счет средств темы государственного задания АААА-А19-119041690035-9.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO. FAO Land and Plant Nutrition Management Service. 2008. <http://www.fao.org/ag/agI/agII/spush3>
2. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 651. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
3. Ahmad P., Sharma S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants // Plant Soil Environ. 2008. V. 54. P. 89.
4. Voronin P.Yu., Rakhmankulova Z.F., Shuyskaya E.V., Maevskaya S.N., Nikolaeva M.K., Maksimov A.P., Maximov T.Chr., Myasoedov N.A., Balnokin Yu.V., Rymar V.P., Valdayskih V.V., Kuznetsov V.I.V. New method for quantitative determination of water potential of mesophyll cells' apoplast in substomatal cavity of the leaf // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 452. <https://doi.org/10.1134/S1021443717020133>
5. Voronin P.Yu., Rakhmankulova Z.F., Tarnopolskaya E.E., Kuznetsov V.I.V. Closure of stomata in water-stressed pine needles results from the decreased water potential of the mesophyll apoplast in the substomatal cavity // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 518. <https://doi.org/10.1134/S1021443718030081>
6. Voronin P.Yu., Maevskaya S.N., Nikolaeva M.K. Physiological and molecular responses of maize (*Zea mays* L.) plants to drought and rehydration // Photosynthetica. 2019. V. 57. P. 850. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.101>
7. Robinson S.R., Downton W.J.S. Potassium, sodium and chlorid ion concentration in leaves and isolated chloroplasts of the halophyte *Suaeda australis* R. Br. // Aust. J. Plant Physiol. 1985. V. 12. P. 471.
8. Voronin P.Yu. Experimental installation for measurements of chlorophyll fluorescence,  $\text{CO}_2$  exchange, and transpiration of a detached leaf of a detached leaf // Russ. J. Plant Physiol. 2014. V. 61. P. 269. <https://doi.org/10.1134/S1021443714020174>
9. Рейф Ф. Статистическая физика: Учеб. руковод. Пер. с англ. / Под ред. А.И. Шальникова и А.О. Вайсенберга. 3-е изд., испр. М.: Наука, 1986. 336 с.
10. Лайск А.Х. Кинетика фотосинтеза и фотодыхания С3-растений. М.: Наука, 1977. 194 с.
11. Balnokin Yu.V., Kotov A.A., Myasoedov N.A., Khailova G.F., Kurkova E.B., Lun'kov R.V., Kotova L.M. Involvement of long-distance  $\text{Na}^+$  transport in maintaining water potential gradient in the medium-root-leaf system of a halophyte *Suaeda altissima* // Russ. J. Plant Physiol. 2005. V. 52. P. 489.
12. Nobel P.S. Physicochemical and environmental plant Physiology. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1999. 540 p.
13. Pan T., Liu M., Kreslavski V.D., Sergey K., Zharmukhamedov S.K., Nie Ch., Yu M., Kuznetsov V.I.V., Al-lakhverdiev S.I., Shabala S. Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2020. V. 50. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1735231>

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

УДК 581.1.58.036:581.132.1

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ  
И КАРОТИНОИДОВ В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Pinus sylvestris* L.)  
В ЗОНЕ ВЛИЯНИЯ ТЕПЛООВОГО ПОЛЯ ГАЗОВОГО ФАКЕЛА

© 2021 г. С. А. Шавнин<sup>а, \*</sup>, И. А. Юсупов<sup>а</sup>, Н. В. Марина<sup>б</sup>, А. А. Монтиле<sup>а, \*\*</sup>, Д. Ю. Голиков<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

“Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук”, Екатеринбург, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Уральский государственный лесотехнический университет”, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: sash@botgard.uran.ru,

\*\*e-mail: org17@mail.ru

Поступила в редакцию 25.06.2020 г.

После доработки 02.07.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Цель работы — установление закономерностей и проведение сравнительного анализа сезонных изменений содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое молодых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих на разном удалении от факела сжигания нефтяного газа, в зоне создаваемого им теплового поля на территории Ханты-Мансийского автономного округа (Югры), в течение периода “осень—зима—весна”. В ходе исследований проведена верификация двух гипотез: (1) тепловое поле факела сжигания нефтяного газа, имитирующее действие потепления климата на растения, влияет на состояние пигментного комплекса фотосинтетического аппарата (ФСА) хвои сосны обыкновенной; (2) трансформация пигментного комплекса ФСА хвои в течение периода “осень—зима—весна” чувствительна к долговременному повышению температуры среды на 1–2°C. В сезонных динамиках отдельных показателей ФСА в течение зимы наблюдаются максимумы и минимумы, объясняемые регуляцией содержания хлорофиллов и каротиноидов при изменении температуры воздуха. Сезонные изменения этих показателей у деревьев, произрастающих в условиях с отличающимся температурным режимом, не совпадают. Их закономерности свидетельствуют о последовательном изменении глубины зимней трансформации структурно-функционального состояния ФСА хвои на разном удалении от факела. Активность ФСА хвои в течение всего изучаемого периода была выше вблизи факела и уменьшалась по мере удаления от него. В осенне-зимний период, когда для хвои характерно уменьшение содержания хлорофилла, это снижение наименьшее вблизи факела (секция I), где температура выше фоновой на 1–2°C, среднее — на среднем расстоянии от факела (секция III) и наибольшее — на максимальном удалении от факела (секция VII). При этом соотношение содержания хлорофиллов *a* и *b* в хвое деревьев на секции I стабильно ниже, чем на секции VII. Это указывает на то, что в хлоропластах хвои деревьев, расположенных в секции I, количество светособирающих комплексов больше количества фотосистем. Величина отношения общего содержания хлорофиллов *a* и *b* к содержанию каротиноидов в хвое деревьев вблизи факела выше, чем на секциях III и VII, а также имеет в сезонной динамике два достоверных максимума, что объясняется повышенной сохранностью пула зеленых пигментов. Отличия сезонных изменений содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое и корреляционных связей данных показателей с температурой воздуха указывают на различие механизмов их регуляции. Количество хлорофиллов определяется балансом процессов распада и синтеза, результат которого зависит от влияния факторов среды на скорость синтеза хлорофиллов и реализацию защитных функций каротиноидами. Последние дополнительно синтезируются в фотосинтезирующих клетках в осенне-зимний период, обеспечивая увеличение степени защищенности хлорофиллов от фотодеструкции с осени до конца весны.

**Ключевые слова:** *Pinus sylvestris*, хлорофилл, каротиноиды, влияние температуры, влияние изменений климата, сезонные изменения пигментного аппарата хвои

DOI: 10.31857/S0015330321020184

ВВЕДЕНИЕ

Сезонная динамика структурно-функциональной организации пигментного аппарата (ПА) хло-

ропластов листьев является проявлением адаптации фотосинтетического аппарата (ФСА) к действию изменяющихся условий среды. Актуальность ее изу-

**Сокращения:** Кар — содержание каротиноидов; ПА — пигментный аппарат; ФСА — фотосинтетический аппарат; Хл *a* — содержание хлорофилла *a*; Хл *b* — содержание хлорофилла *b*; Хл (*a* + *b*) — суммарное содержание хлорофиллов *a* и *b*.

чения определяется недостаточной исследованностью механизмов сезонной трансформации ФСА, в том числе на уровне первичных фотосинтетических реакций преобразования энергии. Изучение этих процессов у вечнозеленых растений, произрастающих в климатических зонах с холодной зимой, позволило установить ряд основных закономерностей. В годичном цикле выделяют два основных этапа: уменьшение содержания хлорофиллов *a* и *b* (Хл *a* и Хл *b*) в осенне-зимний период и восстановление их пулов в начале активной вегетации весной и летом [1–4]. На Среднем Урале максимальное содержание хлорофиллов в двухлетней хвое молодых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) приходится на летний период, снижается в сентябре–феврале, продолжает уменьшаться в марте–апреле и восстанавливается в мае [1]. Следует отметить, что в северных широтах в структуре ПА наблюдается преобладание количества хлорофиллов в ССК по сравнению с фотосистемами [4, 5], свидетельствующее о высокой светопоглощающей способности хвои, позволяющей компенсировать низкий уровень накопления зеленых пигментов в этих условиях.

Содержание каротиноидов (Кар) в хвое отдельных видов ели, пихты и сосны обыкновенной возрастает зимой и уменьшается весной [2, 4–8]. При этом с наступлением зимы у большинства видов хвойных наблюдается уменьшение отношения суммарного содержания хлорофиллов к Кар, которое объясняется защитной функцией каротиноидов. Они предохраняют ассимиляционный аппарат от фотодинамического разрушения в условиях низких температур за счет тушения синглетного кислорода, поглощения и рассеивания энергии возбуждения молекул хлорофиллов и стабилизации физического состояния мембран и белков антенных комплексов [9, 10]. Роль каротиноидов, по-видимому, возрастает в условиях снижения интенсивности физиолого-биохимических процессов в клетках хвои при низких температурах. У хвойных видов растений основным механизмом фотозащиты в зимне-весенний период является зеаксантин-зависимая тепловая диссипация энергии возбуждения в реакционных центрах ФС II [2, 11].

Качественные и количественные изменения ПА хлоропластов хвои при переходе в зимнее состояние сопровождаются рядом структурных перестроек в клетках фотосинтетических тканей. В них происходит последовательный распад гранальной структуры и уменьшение числа тилакоидов в хлоропластах, уменьшение объема и дробление вакуолей, перераспределение пластид внутри клетки и трансформация мембранных структур [12–14]. В клетках мезофилла хвои ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) и ели колючей (*Picea pungens* Engelm.) исчезают зерна крахмала, а также изменяются форма и локализация хлоропластов [15]. Зимние условия приводят к ингибированию фотохимиче-

ской активности ФС II, подавлению нециклического электронного транспорта в хлоропластах [16, 17], частичному разрушению хлорофилл-белковых ССК [18] и изменению липидного состава мембран хлоропластов [19, 20]. На фоне этих процессов в хвое сосны обыкновенной наблюдаются последовательные изменения температурной зависимости выхода флуоресценции Хл *a* при полностью открытых реакционных центрах ФС II [1, 21], величины миллисекундной компоненты флуоресценции Хл *a* ФС II и параметров ее индукционных кривых [22]. В условиях Среднего Урала снижение фотохимической активности ФСА продолжается на протяжении всего зимнего периода, а ее минимальные значения наблюдаются в феврале.

Температурный режим относится к числу основных факторов среды, оказывающих влияние на состояние ПА [23–25], а также на скорость депонирования углерода и продуктивность лесных экосистем бореальной зоны. Глобальные изменения климата в ряде регионов сопровождаются повышением температуры среды на 1–2°C за несколько десятков лет (<https://unstats.un.org/sdgs/report/2019/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2019.pdf>). Скорость приращения среднегодовой температуры воздуха на территории Российской Федерации с 1976 по 2018 гг. составила 0.47°C за 10 лет [26]. При этом изучение влияния климатических изменений на реальные природные объекты связано с преодолением значительных технических и методических трудностей. Одним из перспективных методических подходов к изучению влияния потепления климата на растения является исследование состояния деревьев, произрастающих в максимально приближенных к естественным условиям среды, модифицированных тепловым полем длительно функционирующего факела сжигания нефтяного газа [27]. Проведение наблюдений в зоне теплового воздействия факела позволяет исследовать комплекс адаптационных реакций, происходящих в ФСА листьев растений при повышении температуры среды.

При планировании наших исследований было выдвинуто две рабочие гипотезы: (1) тепловое поле факела сжигания нефтяного газа, имитирующее действие потепления климата на растения, влияет на состояние пигментного комплекса ФСА хвои сосны обыкновенной (одного из основных лесобразующих видов северо-таежной подзоны таежной зоны); (2) трансформация состояния пигментного комплекса ФСА хвои в течение периода “осень–зима–весна” чувствительна к долговременному повышению температуры среды на 1–2°C. Подтверждением гипотезы 1 будет являться несоответствие сезонных динамик показателей состояния пигментного комплекса ФСА хвои деревьев сосны обыкновенной, произрастающих в условиях с отличающимся температурным режимом (на разном удалении от факела). При этом на

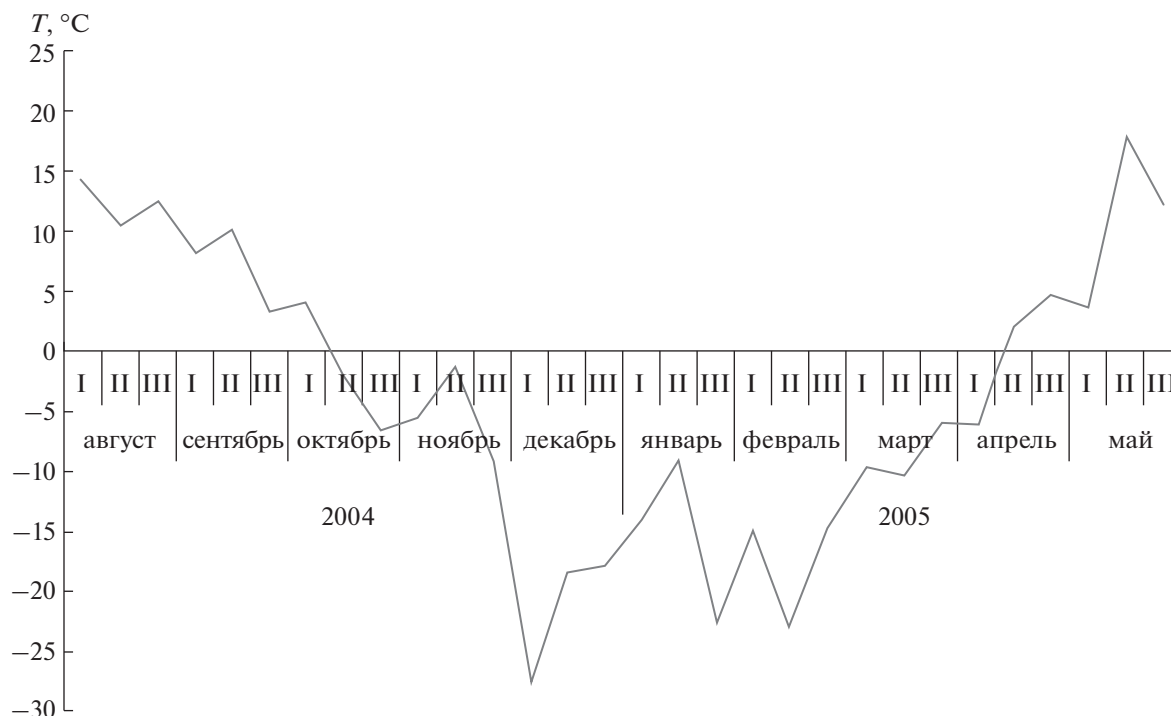


Рис. 1. Средние за декаду температуры воздуха в период проведения исследований по данным метеостанции г. Ханты-Мансийска (Погодные сервисы: архив погоды, <http://pogoda-service.ru>).

наибольшем расстоянии от факела температура среды соответствует фоновой. Гипотеза 2 будет подтверждена, если закономерности изучаемых сезонных динамик будут свидетельствовать о последовательном изменении глубины зимней трансформации структурно-функционального состояния ФСА хвой на разном удалении от факела. В соответствии с вышеприведенными гипотезами, цель работы — установить закономерности и провести сравнительный анализ сезонных изменений содержания хлорофиллов и каротиноидов в хвое деревьев сосны обыкновенной, произрастающих на разном удалении от факела сжигания нефтяного газа в зоне создаваемого им теплового поля, в течение периода “осень—зима—весна”.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на территории Покачевского участкового лесничества Мегионского лесничества Ханты-Мансийского автономного округа — Югры. Климат Ханты-Мансийского региона континентальный. За последние 10 лет в районе исследований среднегодовая температура воздуха составляла  $-3.6^{\circ}\text{C}$ . Самым холодным месяцем является январь (средняя температура  $-22^{\circ}\text{C}$ ), а самым теплым — июль (средняя температура  $+16.9^{\circ}\text{C}$ ). При этом в течение зимнего периода наблюдаются значительные изменения

усредненных по декадам среднесуточных температур (рис. 1). Безморозный период составляет 98 дней, а вегетационный — 131 день. Среднегодовое количество осадков — 492 мм с максимумом в июле—сентябре (239 мм). Продолжительность сохранения снежного покрова составляет 201 день, а его максимальная высота (77–85 см) наблюдается в третьей декаде марта.

Объектом исследований являлись молодняки сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), в которых вблизи газового факела четвертой дожимной насосной станции Покачевского месторождения нефти по стандартной методике была заложена постоянная пробная площадь. Древоустой естественного возобновления произрастает на участке вырубленного спелого сосняка. На пробной площади выделено семь секций (I–VII) шириной 10 м и длиной 60 м каждая, которые располагаются перпендикулярно радиусу к факелу. Ближние границы секций I, III и VII находятся на расстоянии 70 м, 90 м и 130 м от факела соответственно. Тип леса — сосняк лишайниковый, древоустой однопородный, чистый 10С, возраст 12–15 лет, III–IV классов бонитета, густота — 2900–6400 шт/га, средние диаметры и высоты отличаются на разных секциях (2.5–5.6 см и 1.3–2.3 м соответственно) [27].

Температура среды на секции VII соответствует фоновой. Разность температур воздуха в тепловом

поле факела между секциями I и VII на высоте 1.3 м от уровня земли составляет до 1.5°C, а почвы – до 6°C [28]. Приведенные значения характерны для общей конфигурации теплового поля. В связи с мозаичностью микрорельефа и неоднородностью растительности в пределах секции, температура на разных участках не одинакова и изменяется в течение суток и всего вегетационного периода. Тенденция к увеличению температуры с приближением к факелу достоверна, поэтому влияние теплового поля изучалось с помощью закладки секций, расположенных на различном расстоянии от него.

В исследованиях ПА использовали хвою предыдущего года формирования. В период с 15.08.2004 г. по 30.05.2005 г. образцы хвои отбирали 1–2 раза в месяц на высоте 1.5 м с боковых ветвей обращенной к факелу средней части кроны пяти модельных (средних по диаметру и высоте) деревьев на секциях I, III и VII. Образцы хранили в течение 24–26 ч в термостате при температуре, соответствующей температуре воздуха в момент сбора. С целью уменьшения неизбежного, ввиду большого объема собираемого материала, влияния дефолиации на состояние остающейся хвои, образцы отбирали равномерно из разных частей побегов. Для анализов использовали метод средней пробы. Каждое измерение проводили в трех биологических повторностях. Пигменты экстрагировали ацетоном (80%) из гомогената хвои при температуре 4–6°C. Содержание пигментов определяли с помощью измерения оптической плотности фильтрованных экстрактов на спектрофотометре СФ-46 (“ЛОМО”, Россия) при длинах волн 470, 646.8 и 663.2 нм [29], а их количество оценивали пересчетом на массу абсолютно сухой хвои. Для оценки соотношения количеств ССК и ФС I и ФС II хлоропластов использовали отношение  $Xл\ a/Xл\ b$ , а при изучении особенностей строения ПА – отношение суммарного содержания хлорофиллов ( $Xл\ (a + b)$ ) к Кар ( $Xл\ (a + b)/Кар$ ).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью стандартных пакетов прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и Excel (Microsoft, 2007). Использовали корреляционный и регрессионный анализы. На графиках динамик измеренных и расчетных показателей приведены средние величины и стандартные ошибки. При корреляционном анализе сезонных динамик изменения параметров пигментного комплекса с изменением температуры приземного воздуха использовали значения средних декадных температур, а при отборе проб в начале декады – данные о температуре за предшествующую декаду.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ сезонных изменений  $Xл\ a$  в хвое (рис. 2) позволяет выделить три основных этапа. На пер-

вом (середина августа – середина сентября) величина показателя максимальна, затем в конце сентября она резко уменьшается и наступает второй этап, который продолжается до первой декады мая. В этот период значение  $Xл\ a$  минимально, относительно стабильно и совпадает на секциях III и VII, а на секции I достоверно возрастает и проявляет два максимума – в ноябре и феврале, которые по величине не достигают летних значений. В конце мая наступает следующий (третий) этап, на котором  $Xл\ a$  в хвое возрастает до значений августа на секции I, а на секциях III и VII наблюдается тенденция к его восстановлению до летних величин. Относительное сходство сезонных динамик  $Xл\ a$  у деревьев на разных секциях, несмотря на отличия абсолютных величин, подтверждается высокими значениями их парных корреляций ( $r = 0.74–0.81$ ,  $P < 0.05$ ). При этом сезонные изменения  $Xл\ a$  на всех секциях коррелируют с динамикой температур воздуха ( $r = 0.58–0.67$ ,  $P < 0.05$ ).

Сезонные изменения  $Xл\ b$  в хвое (рис. 3) в целом аналогичны наблюдаемым динамикам  $Xл\ a$  по срокам наступления этапов и основным закономерностям. Величина этого показателя в течение всего периода исследований, как правило, выше на секции I, минимальна на секции VII и имеет промежуточные (или совпадающие с секцией VII) значения на секции III. Кроме того, по сравнению с  $Xл\ a$ , восстановление уровня  $Xл\ b$  на секции I на втором этапе более полное и в периоды зимних максимумов его значения совпадают с показаниями августа. Промежуточное положение сезонных изменений показателя на секции III подтверждается результатами корреляционного анализа, согласно которым динамики на секциях I и III достоверно не коррелируют, но существуют связи между секциями I и VII ( $r = 0.59$ ,  $P < 0.05$ ), а также III и VII ( $r = 0.67$ ,  $P < 0.05$ ). Следует отметить, что величины корреляционной связи  $Xл\ b$  в хвое с температурой воздуха на секциях I и III одинаковы ( $r = 0.5$ ,  $r = 0.45$ ,  $P < 0.05$ ) и несколько выше на секции VII ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.05$ ).

Сезонные изменения величины отношения  $Xл\ a/Xл\ b$  (рис. 4) также рассматриваются с выделением трех этапов трансформации ФСА хвои, при этом их общие закономерности на разных секциях не совпадают. Наиболее плавно (с наименьшими амплитудами варьирования) величины  $Xл\ a/Xл\ b$  изменяются на секции I, на которой первый этап (август–середина сентября) характеризуется периодом стабильности, сменяемым понижением (до середины октября), после чего наступает второй этап, когда уровень  $Xл\ a/Xл\ b$  в хвое устойчиво низкий. В мае происходит его восстановление до летних значений (третий этап). На секции VII значения показателя в течение всего периода исследований менее устойчивы при общем слабом положительном линейном тренде. Например, в период с 14 декабря по 10 января на-

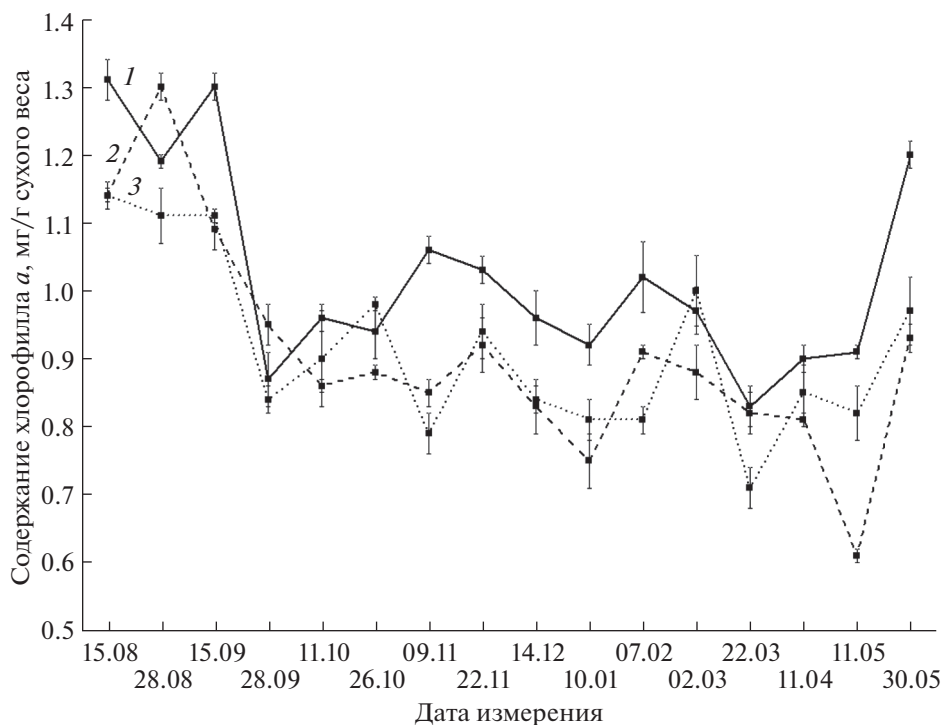


Рис. 2. Сезонная динамика Хл a в хвое *Pinus sylvestris* L. на секциях I (1), III (2) и VII (3).

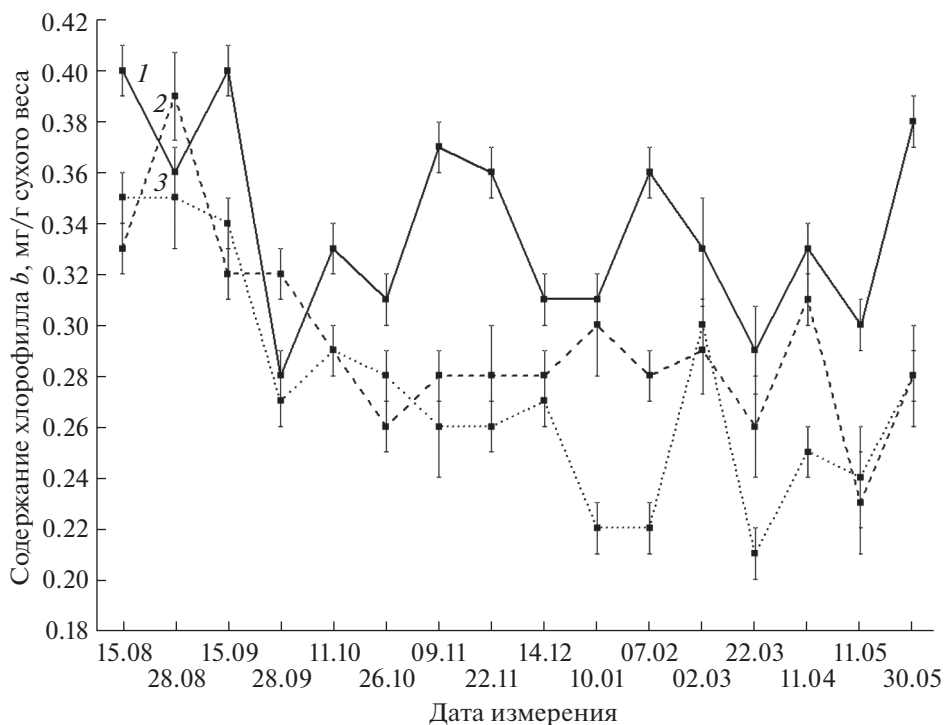


Рис. 3. Сезонная динамика Хл b в хвое *Pinus sylvestris* L. на секциях I (1), III (2) и VII (3).

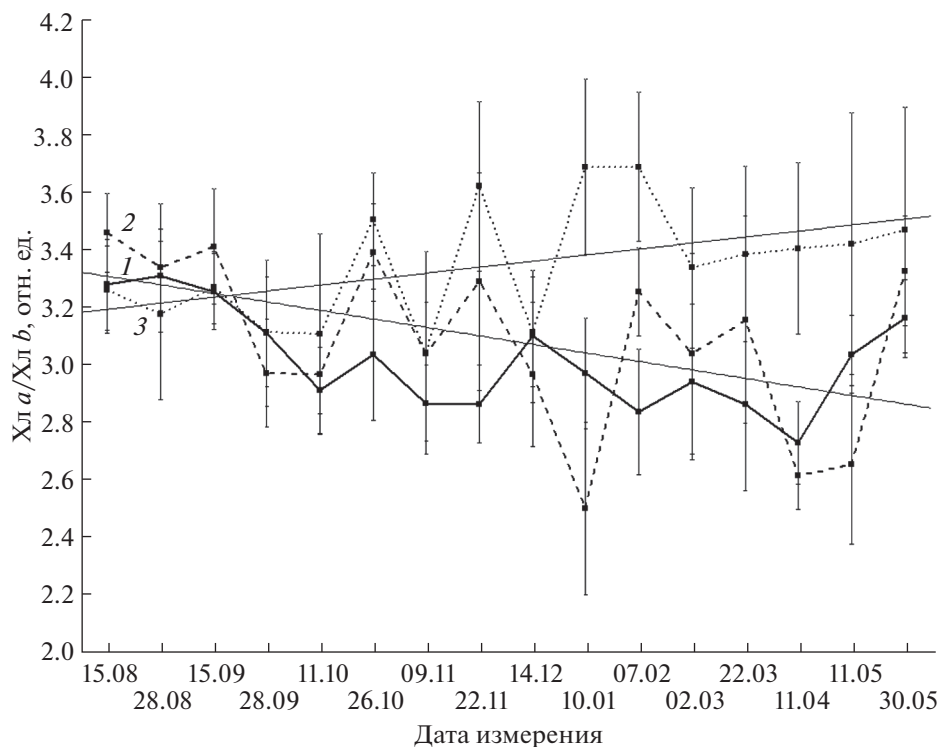


Рис. 4. Сезонная динамика отношения Хл  $a$ /Хл  $b$  в хвое *Pinus sylvestris* L. на секциях I (1), III (2) и VII (3).

блюдается резкое увеличение Хл  $a$ /Хл  $b$  в хвое (на 20% относительно величины в декабре). На секции III варьирование Хл  $a$ /Хл  $b$  выше, а линейный тренд его значений отрицателен. В течение зимы значения Хл  $a$ /Хл  $b$ , как правило, являются промежуточными между соответствующими значениями для секций I и VII, а на третьем этапе в мае наблюдается их восстановление до уровня августа. Следует отметить, что на относительно слабое сходство сезонных динамик Хл  $a$ /Хл  $b$  в хвое деревьев на разных секциях указывает отсутствие достоверных парных корреляционных связей между ними. При этом на ближней к факелу секции существует достаточно высокая связь ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.05$ ) значений Хл  $a$ /Хл  $b$  с температурой воздуха, которая значительно слабее на секциях III и VII ( $r = 0.43$  и  $0.3$  соответственно,  $P < 0.05$ ).

Величина Кар в хвое возрастает в сентябре (рис. 5), затем этот показатель на секциях I и III стабилизируется до начала февраля и сохраняется до середины мая, после чего снижается в конце мая до наблюдавшегося в августе уровня.

На секции VII Кар в хвое варьирует в течение всей зимы, а в мае также наблюдается аналогичное другим секциям снижение этого показателя. В течение всего периода исследований величина Кар в хвое на ближней к факелу секции I, как правило, выше, чем на фоновой секции VII. При этом сезонная динамика показателя на секции VII коррелирует с секциями I и III ( $r = 0.71$  и  $0.64$  соот-

ветственно;  $P < 0.05$ ), однако парной корреляции между секциями I и III не наблюдается. Следует отметить также, что величина Кар в хвое не коррелирует с температурой воздуха ни на одной из секций.

В сезонных динамиках отношения Хл  $(a + b)$ /Кар в хвое (рис. 6) явно выделяются три характерных, как и для Хл  $a$  и Хл  $b$ , этапа (снижение—относительная стабилизация—возрастание). При этом величина данного показателя на всех секциях значительно уменьшается в течение августа—сентября, после чего сохраняется на относительно стабильном низком уровне до первой декады мая, а в конце мая проявляет тенденцию к восстановлению до значений августа. Следует отметить, что на ближней к факелу секции I наблюдались периоды достоверного возрастания величины Хл  $(a + b)$ /Кар в хвое в ноябре и феврале, обусловленные относительным увеличением Хл  $b$  на фоне стабильных значений размеров пула каротиноидов. На секциях III и VII Хл  $(a + b)$ /Кар в течение зимы варьируют незначительно. Минимальные значения этого показателя достигаются на всех секциях в начале мая. Особо следует отметить высокие значения линейных парных корреляций сезонных динамик этой характеристики ФСА на всех трех секциях I, III и VII ( $r = 0.91$ – $0.96$ ,  $P < 0.05$ ), а также их достоверную связь с температурой воздуха ( $r = 0.6$ ,  $0.69$  и  $0.66$  соответственно;  $P < 0.05$ ).



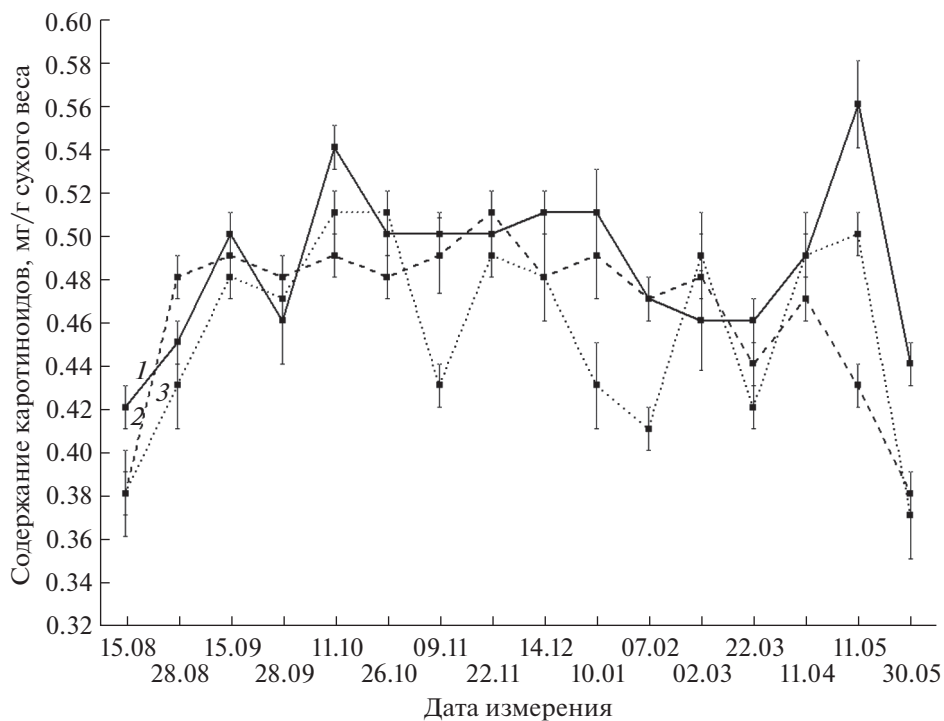


Рис. 5. Сезонная динамика Кар в хвое *Pinus sylvestris* L. на секциях I (1), II (2) и III (3).

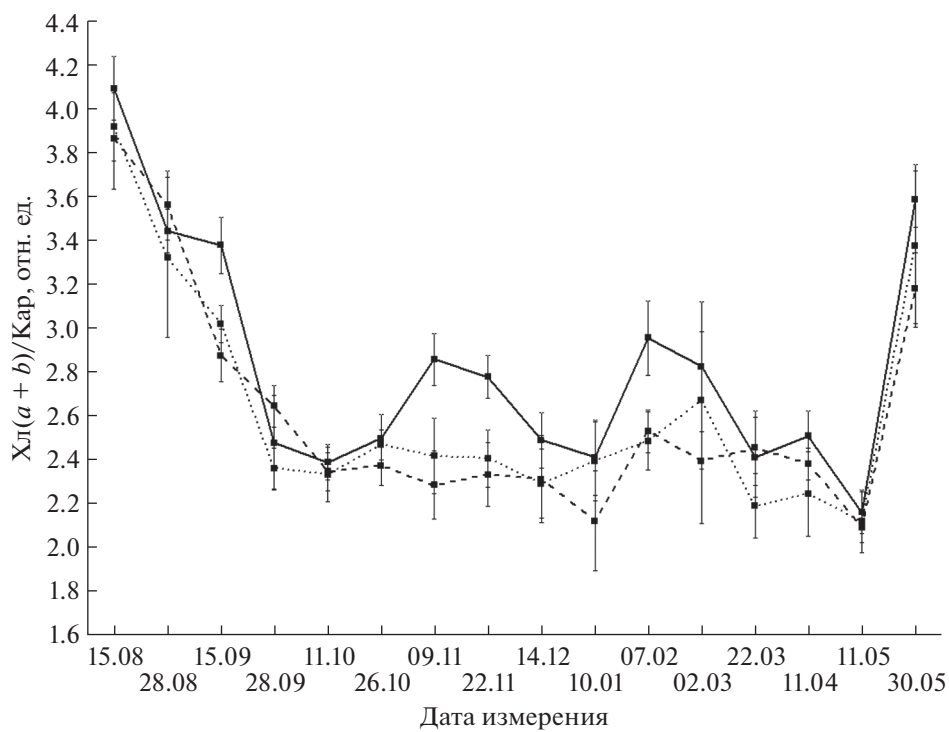


Рис. 6. Сезонная динамика отношения Хл (a + b)/Кар в хвое *Pinus sylvestris* L. на секциях I (1), II (2) и III (3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ сезонных изменений Хл *a* и Хл *b* в хвое сосны в изучавшийся период показал, что их общая направленность одинакова на всех секциях (уровень значений максимален в последний месяц лета и минимален зимой) и соответствует известной [1]. Частичное восстановление величин Хл *a* и Хл *b* происходит в конце мая и наиболее выражено вблизи факела на секции I. При этом наиболее высокое содержание хлорофиллов соответствует активному состоянию ФСА хвои на завершающем этапе вегетации и в начале сезона роста следующего года. Осенью происходит закономерное снижение содержания хлорофиллов в хвое, связанное с наступлением низких температур, переходом к зимнему состоянию и торможением биохимических процессов. Выход из зимнего покоя начинается весной после локального минимума в конце марта.

Совокупность известных сведений о последовательных сезонных изменениях ПА хвои, структурных перестройках ФСА на уровне клеток и хлоропластов, а также о трансформации флуоресцентных характеристик Хл *a* в осенне-зимний период указывает на возможность существования в хвое вечнозеленых растений при низких температурах активных адаптационных процессов, включая биосинтез отдельных пигментов. Следует отметить, что уровень значений зимних температур в районе исследований не постоянен (в отдельные месяцы средняя температура изменяется на 10–15°C и более), что является, по-видимому, фактором, способным влиять на общее состояние ФСА. На это указывают факты наличия корреляционных связей сезонных динамик большинства показателей состояния ПА хвои с температурой среды, а также существование локальных по времени увеличений и уменьшений значений этих показателей, в том числе в середине зимы. Содержание зеленых пигментов в хвое сосны вблизи факела (секция I) в среднем выше в течение всего изучаемого периода и с удалением от него уменьшается. Данная закономерность является одним из основных подтверждений первой гипотезы. Кроме того, на секции I зимой наблюдается статистически значимое частичное восстановление пулов Хл *a* и Хл *b* в хвое. Это свидетельствует о повышенной активности ФСА хвои на секции I по сравнению с другими, и, соответственно, о существенном влиянии факела на состояние ПА. Наибольшие величины Хл *b* в хвое на секции I, наименьшие на секции VII и промежуточные на секции III в зимний период свидетельствуют о том, что, во-первых, влияние факела распространяется на расстояние не менее 100 м, и, во-вторых, что это влияние на секции III меньше, чем на секции I. Наличие нескольких подъемов и спадов на кривых сезонных динамик содержания Хл *a* и Хл *b* в

хвое на секции I, а также достоверных, но менее выраженных изменений этих показателей на секциях III и VII зимой, указывает на продолжение в этот период процессов сезонной трансформации состояния ПА хлоропластов.

На удаленных от факела секциях средний уровень величин отношения Хл *a*/Хл *b* в хвое выше, чем на ближней к нему секции. Сезонные динамики этого показателя указывают на уменьшение в хлоропластах относительного количества ССК по сравнению с количеством ФС I и ФС II зимой. Данный эффект наиболее выражен на фоновой секции и наименее – вблизи факела. На секции I Хл *a*/Хл *b* в хвое зимой устойчиво низкое, в том числе за счет частичного восстановления пула Хл *b*, обеспечивающего более высокий уровень количества ССК. Таким образом, на фоне общей зимней депрессии ПА хвои, степень его деградации максимальная за пределами зоны влияния теплового поля факела на секции VII, наименьшая – на секции I, а на секции III – промежуточная. Причем на всех секциях соотношение количеств ССК и фотосистем регулируется преимущественно за счет изменения пула Хл *b*. Отличие величин парных корреляций сезонных динамик хлорофиллов, наблюдаемых на отдельных секциях, подтверждает несоответствие в изучаемый период параметров адаптационных процессов в ФСА хвои на разном удалении от факела.

Увеличение Кар в хвое зимой соответствует известным данным, полученным в ряде исследований состояния ПА вечнозеленых растений [30], и объясняется участием каротиноидов в защите молекул хлорофиллов от фотодеструкции в этот период. Их роль особенно возрастает в условиях снижения интенсивности физиолого-биохимических процессов в клетках хвои при низких температурах. Следует отметить, что корреляционный анализ сезонных динамик содержания хлорофиллов и Кар в хвое не выявил достоверной связи между ними на всех секциях. Кроме того, в отличие от Хл *a* и Хл *b*, не установлено корреляций Кар с температурой среды. Эти факты указывают на относительную независимость регуляции величин пулов данных групп пигментов ФСА.

Сравнительно устойчивый повышенный уровень Кар в хвое в период сентябрь–апрель наблюдается только на ближних к факелу секциях, а на секции VII в сезонной динамике существуют отдельные подъемы и спады. Эта особенность объясняется, по-видимому, отличающимся от наблюдаемого на секциях I и III характером проявления процесса регуляции размеров каротиноидного комплекса на фоновом участке, где влияние теплового поля факела отсутствует.

Уменьшение в осенне-зимний период Хл (*a* + *b*)/Кар в хвое наблюдалось также другими исследователями [11]. Согласно полученным данным на-

чало уменьшения этого параметра соответствует снижению среднесуточной температуры в октябре до значений ниже  $5^{\circ}\text{C}$ . Общее сходство сезонных динамик этого показателя на разных секциях, подтверждаемое высокой степенью их корреляции между собой, свидетельствует о важности связанных с соотношением  $\text{Хл } (a + b)/\text{Кар}$  адаптационных механизмов для перехода ПА хлоропластов к зимнему покою. В этом состоянии величина  $\text{Хл } (a + b)/\text{Кар}$  составляет 2.4–2.8 и обеспечивает, по-видимому, необходимую сохранность ФСА хвои на уровне первичных звеньев трансформации световой энергии. Наличие локальных максимумов в ноябре и феврале на секции I дополнительно подтверждает высказанное выше утверждение о большей активности ФСА хвои зимой вблизи факела. Эти относительные максимумы возникают в результате увеличения  $\text{Хл } a$  и  $\text{Хл } b$  (на фоне относительно стабильного Кар), указывающего на смещение в эти месяцы баланса процессов синтеза и распада хлорофиллов в сторону синтеза.

Результаты анализа особенностей сезонных динамик содержания отдельных пигментов и их соотношений указывают на непрерывность адаптационных реакций ФСА хвои в течение всего осенне-зимнего периода и их зависимость от удаления от факела, что доказывает справедливость второй гипотезы. Кроме того, они позволяют выделить ряд основных закономерностей трансформации ПА хлоропластов хвои сосны в течение изучавшегося периода, а также высказать ряд предположений о природе процессов и механизмов, объясняющих эти закономерности. Сезонное понижение температуры среды приводит к замедлению, но не к полному прекращению физиолого-биохимических процессов, которое характерно для состояния ФСА зимой. При этом в результате фотоокисления хлорофиллов, снижается их содержание до определенного уровня, который поддерживается за счет защитных функций комплекса каротиноидов, а также биосинтеза отдельных пигментов. Величина соотношения хлорофиллов ССК и фотосистем хлоропластов варьирует при фоновых условиях среды вокруг среднего значения, в том числе в условиях низких температур, так как отражает работу систем контроля содержания зеленых пигментов. Количество каротиноидов в ССК и ФС возрастает зимой, что обеспечивает сохранение ПА на уровне, соответствующем минимально активному состоянию ФСА хвои. Регуляция Кар происходит относительно независимо от содержания хлорофиллов, однако она сопряжена, по-видимому, с поддержанием в определенном диапазоне значений величины отношения  $\text{Хл } (a + b)/\text{Кар}$ . Влияние газового факела, в первую очередь связанное с повышением температуры воздуха, обеспечивает более высокую активность ПА хлоропластов за счет реализации возможностей адаптационного потен-

циала ФСА хвои, включая регуляцию размеров пулов отдельных пигментов.

Анализ полученных результатов позволяет заключить следующее. (1) Сезонная трансформация ПА хлоропластов хвои сосны обыкновенной, наблюдаемая в период “конец лета–осень–зима–весна” связана с уменьшением температуры среды ниже физиологического оптимума активной вегетации и представляет собой совокупность последовательно протекающих во времени процессов адаптации ФСА хвои к изменению условий среды. Многократность наблюдений в изучаемый период позволяет дополнить известные сведения об особенностях изменений состояния ПА. Также установлено наличие локальных по времени максимумов и минимумов в сезонной динамике его отдельных показателей в течение зимы, связанное, по-видимому, с регуляцией содержания хлорофиллов и каротиноидов при изменении температуры среды.

(2) Тепловое поле факела влияет на протекающие адаптационные процессы, определяющие закономерности сезонных динамик показателей состояния ПА хвои деревьев сосны обыкновенной на разном удалении от его источника. Его действие приводит к изменениям сезонных динамик всех изученных показателей состояния ФСА хвои. Активность ФСА хвои в течение всего изучаемого периода выше вблизи факела и уменьшается по мере удаления от него. В осенне-зимний период вблизи факела (секция I), где температура выше фоновой на  $1\text{--}2^{\circ}\text{C}$ , снижение содержания хлорофиллов меньше, чем на максимальном удалении от него (секция VII). На среднем расстоянии от факела (секция III) эти эффекты выражены слабее. При этом отношение  $\text{Хл } a/\text{Хл } b$  на секции I устойчиво ниже, чем на VII, что указывает на увеличение соотношения количеств ССК и фотосистем в хлоропластах. Величина  $\text{Хл } (a + b)/\text{Кар}$  на секции I выше, чем на секциях III и VII и имеет два достоверных максимума, что связано, по-видимому, с повышенной сохранностью пула зеленых пигментов за счет защиты хлорофиллов от фотодеструкции вблизи факела. Полученные в ходе исследований результаты подтверждают правильность обеих выдвинутых рабочих гипотез.

(3) Отличие сезонных изменений содержания хлорофиллов и Кар в хвое, а также наличие корреляций сезонных динамик величин  $\text{Хл } a$  и  $\text{Хл } b$  с температурой воздуха независимо от расстояния до факела и отсутствие такой связи у пула Кар, указывают на различие механизмов их регуляции. При этом, по-видимому, количество хлорофиллов определяется балансом процессов распада и синтеза, результат которого зависит от влияния факторов среды, включая температуру, реализации защитных функций каротиноидами, скорости синтеза хлорофиллов и активности ФСА хвои

в целом. Данный баланс определяет соотношение количества хлорофиллов фотосистем и ССК в хлоропластах, которое в фоновых условиях среды варьирует относительно среднего уровня в течение года. При этом в осенне-зимний период в фотосинтезирующих клетках дополнительно синтезируются каротиноиды, что увеличивает степень защищенности хлорофиллов от фотодеструкции. Регуляция Кар, по-видимому, осуществляется в соответствии с величиной  $Xл(a + b)/Кар$ , которая достигает минимума и поддерживается на низком уровне в период с осени до конца весны.

Авторы выражают благодарность ведущему инженеру Уральского государственного лесотехнического университета Г. Н. Новоселовой за неоценимую помощь в проведении лабораторных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной программы Уральского отделения Российской академии наук на 2018–2020 гг. (грант № 18-4-4-10) и в рамках госзадания Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Ботанического сада Уральского отделения Российской академии наук”.

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. Кривошеева А.А., Шавнин С.А., Калинин В.А., Венедиктов П.С. Влияние промышленных загрязнений на сезонные изменения содержания хлорофилла в хвое сосны обыкновенной // Физиология растений. 1991. Т. 38. С. 163.
2. Ensminger I., Sveshnikov D., Campbell D.A., Funk C., Jansson S., Lloyd J., Shibistova O., Quist G. Intermittent low temperatures constrain spring recovery of photosynthesis in boreal Scots pine forests // Global Change Biology. 2004. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00781.x>
3. Яцко Я.Н., Дымова О.В., Головки Т.К. Пигментный комплекс зимне- и вечнозеленых растений в подзоне средней тайги европейского Северо-Востока // Ботан. журн. 2009. Т. 94. С. 1812.
4. Тужилкина В.В. Фотосинтетические пигменты хвои ели сибирской в среднетаежных лесах европейского северо-востока России // Сибирский лесной журнал. 2017. № 1. С. 65. <https://doi.org/10.15372/SJFS20170107>
5. Yatsko Y.N., Dymova O.V., Golovko T.K. Violaxanthin cycle pigment de-epoxidation and thermal dissipation of light energy in three boreal species of evergreen conifer plants // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 169. <https://doi.org/10.1134/S1021443711010249>
6. Ottander C., Campbell D., Öquist G. Seasonal Changes in Photosystem II Organization and Pigment Composition in *Pinus sylvestris* // Planta. 1995. V. 197. P. 176. <https://doi.org/10.1007/BF00239954>
7. Wang K.-Y., Kellomäki S., Zha T. Modifications in photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in 20-year-old pine trees after a four-year exposure to carbon dioxide and temperature elevation // Photosynthetica. 2003. V. 41. P. 167. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000011948.00870.db>
8. Тужилкина В.В. Пигментный комплекс хвои сосны в лесах Европейского Северо-востока // Лесоведение. 2012. № 4. С. 16.
9. Kalitaho L., Rech J., Jahns P. The roles of specific xanthophylls in light utilization // Planta. 2007. V. 225. P. 423. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0356-3>
10. Öquist G., Huner N.P.A. Photosynthesis of overwintering evergreen plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2003. V. 54. P. 329. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.072402.115741>
11. Sofronova V.E., Dymova O.V., Golovko T.K., Chepalov V.A., Petrov K.A. Adaptive changes in pigment complex of *Pinus sylvestris* needles upon cold acclimation // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 433. <https://doi.org/10.1134/S1021443716040142>
12. Ходасевич Э.В., Арнаутова А.И., Мышковец С.Н. Ультраструктурная организация хлоропластов в связи с обратимой деградацией фонда пигментов у хвойных. // Физиология растений. 1978. Т. 25. С. 810.
13. Martin B., Öquist G. Seasonal and experimentally induced changes in the ultrastructure of chloroplasts of *Pinus sylvestris* // Physiol. Plantarum. 1979. V. 46. P. 42. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb03183.x>
14. Маслова Т.Г., Мамушина Н.С., Зубкова Е.К., Буболо Л.С., Тютерева Е.В. Структурно-функциональная характеристика фотосинтетического аппарата листа зимнезеленых растений в ходе круглогодичной вегетации // Ботан. журнал. 2015. Т. 100. С. 1142. <https://doi.org/10.1134/S0006813615110022>
15. Овсянников А.Ю., Семкина Л.А. Сезонные изменения активности фотосистемы II и локализации хлоропластов в клетках хвои растений рода *Picea* (Pinacea) // Ботан. журн. 2014. Т. 99. С. 971.
16. Öquist G., Martin B. Inhibition of photosynthetic electron transport and formation of inactive chlorophyll in winter stressed *Pinus sylvestris* // Physiol. Plantarum. 1980. V. 48. P. 33. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1980.tb03215.x>
17. Öquist G.; Ogren E. Effects of winter stress on photosynthetic electron transport and energy distribution between the two photosystems of pine as assayed by chlorophyll fluorescence kinetics // Photosynthetic Research. 1985. V. 7. P. 19. <https://doi.org/10.1007/BF00032919>
18. Öquist G., Martensson O., Martin B., Malmberg G. Seasonal effects on chlorophyll-protein complexes isolated from *Pinus sylvestris* // Physiol. Plantarum. 1978. V. 44. P. 187. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1978.tb08616.x>
19. Новицкая Ю.Е. Сезонная и возрастная динамика основных фракций липидов в хвое сосны обыкновенной // Физиолого-биохимические исследования

- ния сосны обыкновенной на Севере. Петрозаводск. 1987. С. 39.
20. *Öquist G.* Seasonally induced changes in acid lipids and fatty acids of chloroplast thylakoids of *Pinus sylvestris* // *Plant Physiol.* 1982. V. 69. P. 869. <https://doi.org/10.1104/pp.69.4.869>
  21. *Гаевский Н.А., Сорокина Г.А., Гольд В.М., Миролюбская И.В.* Сезонные изменения фотосинтетического аппарата древесных и кустарниковых растений // *Физиология растений.* 1991. Т. 38. С. 685.
  22. *Шавнин С.А., Фомин А.С.* Сезонные изменения флуоресценции хлорофилла хвои сосны обыкновенной // *Физиология растений.* 1993. Т. 40. С. 209.
  23. *Leverenz J.W.* The effects of illumination sequence, CO<sub>2</sub> concentration, temperature and acclimation on the convexity of the photosynthetic light response curve // *Physiol. Plant.* 1988. V. 74. P. 332. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb00639.x>
  24. *Huner N.P.A., Elfman B., Krol M., McIntosh A.* Growth and development at cold-hardening temperatures. Chloroplast ultrastructure, pigment content, and composition // *Can. J. Bot.* 1984. V. 62. P. 53. <https://doi.org/10.1139/b84-009>
  25. *Strand M., Öquist G.* Inhibition of photosynthesis by freezing temperatures and high light levels in cold-acclimated seedlings of Scots pine (*Pinus Sylvestris* L.). Effects on the light-limited and light-saturated rates of CO<sub>2</sub> assimilation // *Physiol. Plant.* 1985. V. 64. P. 425. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1985.tb08517.x>
  26. *Бардин М.Ю., Ранькова Э.Я., Платова Т.В., Самохина О.Ф., Егоров В.И., Николаева А.М., Громов С.А., Алексеев Г.В., Радионов В.Ф., Александров Е.И., Деметьева Т.В., Коршунова Н.Н., Лавров А.С., Стерин А.М., Хохлова А.В. и др.* Доклад об особенностях климата на территории Российской Федерации за 2018 год; [http://www.meteorf.ru/upload/pdf\\_download/o-klimat-rf-2018.pdf](http://www.meteorf.ru/upload/pdf_download/o-klimat-rf-2018.pdf)
  27. *Shavnin S.A., Yusupov I.A., Montile A.A., Golikov D.Yu., Montile A.I.* Effect of increased ambient temperature on the growth rate of young pine forests in the impact zone of a petroleum gas flare // *Russian Journal of Ecology.* 2009. V. 40. P. 1. <https://doi.org/10.1134/S1067413609010019>
  28. *Шавнин С.А., Юсупов И.А., Артемьева Е.П., Голиков Д.Ю.* Влияние повышения температуры среды на формирование наземной растительности вблизи газового факела // *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал.* 2006. № 1. С. 21.
  29. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in enzymology* / Ed. Colowick S.P., Kaplan N.O. San Diego: Academic Press, 1987. V. 148. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
  30. *Sudachkova N.E., Milyutina I.L., Romanova L.I.* Adaptive responses of scots pine to the impact of adverse abiotic factors on the rhizosphere // *Russian Journal of Ecology.* 2009. V. 40. P. 387. <https://doi.org/10.1134/S1067413609060022>

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

УДК 581.1

РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *Phlojodicarpus sibiricus*

© 2021 г. М. Т. Ханды<sup>a, b, \*</sup>, Д. В. Кочкин<sup>c, d</sup>, С. В. Томилова<sup>c, d</sup>,  
А. Г. Ключин<sup>d</sup>, Б. А. Галишев<sup>e</sup>, А. М. Носов<sup>c, d</sup>

<sup>a</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова”, Якутск, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
“Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии”  
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

<sup>c</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

<sup>d</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева” Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>e</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
“Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина”, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: handy\_89@mail.ru

Поступила в редакцию 08.05.2020 г.

После доработки 23.07.2020 г.

Принята к публикации 23.07.2020 г.

Изучены особенности роста и качественного состава вторичных метаболитов в двух линиях суспензионной культуры клеток вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. — исчезающего вида, эндемика Восточной Сибири. Лучшими ростовыми характеристиками обладала суспензионная культура клеток листового происхождения: индексы роста по различным критериям (сухая и сырая биомасса клеток, концентрация клеток)  $I = 10-14$ ; удельная скорость роста  $\mu = 0.3-0.4 \text{ сут}^{-1}$ ; максимальное накопление сухой биомассы  $M = 9.6 \text{ г/л}$ , экономический коэффициент  $Y = 0.29$ . Культура клеток гипокотильного происхождения имела более низкие показатели роста:  $I = 3.6-4.9$ ,  $\mu = 0.12-0.18 \text{ сут}^{-1}$ ,  $M = 6.6 \text{ г/л}$ ,  $Y = 0.16$ . Отличия в росте исследованных культур коррелируют со степенью агрегированности клеток: суспензионная культура клеток листового происхождения состоит преимущественно из агрегатов мелкого размера (от 10 до 30 клеток), тогда как культура гипокотильного происхождения представлена крупными агрегатами (не менее 50 клеток в агрегате). Проведено аппаратное выращивание мелкоагрегированной суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* листового происхождения в двух типах лабораторных биореакторов — барботажном и с механическим перемешиванием. Установлено, что при выращивании в барботажном биореакторе наблюдается улучшение основных ростовых характеристик (индекс роста по сухой биомассе  $I = 12.7$ ; продуктивность по сухой биомассе  $P = 0.78 \text{ г/л} \cdot \text{сут}$ ,  $\mu = 0.18 \text{ сут}^{-1}$ ,  $M = 15.8 \text{ г/л}$ ,  $Y = 0.49$ ). При использовании биореактора с механическим перемешиванием зафиксировано снижение всех ростовых показателей, что очевидно связано с повреждающим действием на клетки перемешивающих устройств. Проведено фитохимическое исследование состава вторичных метаболитов в исследуемых культурах клеток в сопоставлении с корнями интактного растения *Ph. sibiricus*. Установлены значительные различия состава фенольных соединений в клетках *in vitro* и в корнях растения. В культурах клеток *Ph. sibiricus* преобладали полярные (гидрофильные) соединения, относящиеся к фенольным производным — гликозиды кумаринов и бензофуранов. В корнях главными компонентами были более гидрофобные метаболиты — эфиры пиранокумарина келлактона. Полученные результаты подтверждают разрабатываемую в наших работах концепцию о различиях вторичного метаболизма в клетках растений *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** *Phlojodicarpus sibiricus*, вздутоплодник сибирский, суспензионная культура клеток, биореакторы, кумарины

DOI: 10.31857/S0015330321020068

ВВЕДЕНИЕ

Исследование вторичного метаболизма в настоящее время является одной из наиболее акту-

альных задач современной физиологии и биохимии растений. Принципиально новые подходы для изучения этого процесса открывают использование культур клеток высших растений. Помимо возможности исследования различных факторов, влияющих на образование вторичных метаболитов (регуляторы роста, элиситоры, стрессовые

**Сокращения:** УЭЖХ ЭР МС — ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением.

воздействия и др.), использование клеток *in vitro* позволяет изучать процесс формирования соединенный специализированный обмен в дифференцированных пролиферирующих клетках, лишенных организменных систем контроля. Сопоставление специфики вторичного метаболизма в интактных растениях (где он распределен, как правило, по разным органам растений и протекает в специализированных клетках) и в клетках *in vitro* позволяет не только определять механизмы и системы регулирования этого процесса, но и выяснять функции вторичных метаболитов в жизнедеятельности растения [1].

Прикладным аспектом исследования вторичного метаболизма в клетках высших растений *in vitro* является биотехнологическое использование культур клеток в качестве возобновляемого высококачественного сырья для получения биологически активных соединений растительного происхождения, в частности для создания новых и безопасных лекарственных средств и их использования в терапии различных заболеваний [1]. Перспективным направлением в этой области является изучение редких и эндемичных видов растений, используемых в народной медицине и природные ресурсы которых недоступны или ограничены. Несомненный интерес с этой точки зрения представляет флора Сибири, где особо выделяются природные популяции лекарственных растений Якутии. В этом регионе многие ценные виды растений имеют ограниченный ареал и их запасы быстро сокращаются. К числу таких растений относится вздутоплодник сибирский *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. (семейство Зонтичные, Umbelliferae), который занесен в Красные книги Якутии, Амурской области и Забайкальского края [2–4].

Корни вздутоплодника сибирского используют для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых неврологических расстройств, нарушений функций желудка и легких. Основные лечебные эффекты *Ph. sibiricus* обеспечиваются наличием в нем фенольных соединений, а именно кумаринов (пирано- и гидроксикумаринов). Известно, что некоторые кумарины обладают спазмолитическим, антикоагулянтным, гиполипидемическим, седативным, нейропротективным, противоопухолевым, бактериостатическим свойствами, проявляют антиоксидантную активность [5].

Для *Ph. sibiricus* наиболее специфичными вторичными метаболитами являются пренилированные кумарины, которые в основном представлены пиранокумаринами (келлактон, виснадин, дигидросамидин, суксдорфин, птериксин и другие) и в меньшей степени фуранокумарины (пеуценидин). В составе корневищ и корней *Ph. sibiricus* обнаружены также и “простые” кумарины (различные производные гидроксикумарина — умбеллиферон, скополетин) [5–9].

Вздутоплодник сибирский, являясь фармакопейным растением, использовался как сырье для получения спазмолитического препарата “Фловерин” (смесь дигидросамидина и виснадина), и комплексного препарата, обладающего сердечно-сосудистым действием, “Сафинора”. В настоящее время производство данных препаратов приостановлено из-за сокращения природного сырья [10].

В связи с растущим интересом к *Ph. sibiricus* как основы создания фармпрепаратов и биологически активных добавок, а также невозможностью использования его природных популяций, изучение специфики вторичного метаболизма в клетках *in vitro* этого вида имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Таким образом, цель настоящей работы — исследование ростовых и биосинтетических (образование вторичных метаболитов) характеристик суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* при выращивании в колбах и в разных типах биореакторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использованы суспензионные культуры клеток вздутоплодника сибирского, которые были получены из каллусных культур листового и гипокотильного происхождения в 2019 году [11].

Для выращивания использовали среду Мурашиге и Скуга (MS), приготовленную по прописи [12] с добавлением инозитола (0.1 г/л), 3% сахарозы и регуляторов роста — 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) (1.0 мг/л) и 6-бензиламинопурина (БАП) (0.5 мг/л) (“Merck”, Германия).

Культивирование проводили в колбах объемом 250 мл (35 — 40 мл суспензии в колбе) на ротационном шейкере (100 об/мин) в темноте при  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Цикл выращивания составлял 21 сут. Для посева использовали соотношение инокулюм : свежая среда, равное 1 : 4 (для суспензионной культуры клеток гипокотильного происхождения) и 1 : 10 (для суспензионной культуры клеток листового происхождения).

Для аппаратного выращивания применяли биореакторы с различным типом перемешивающего устройства:

1) Микробиологический биореактор с механической мешалкой, общим объемом 7.5 л (“New Brunswick”, MF-107, США). Перемешивающее устройство — типа “морской винт” (оригинальная конструкция лаборатории биологии культивируемых клеток ИФР РАН, материал — фторпласт, диаметр 60 мм, 4 лопасти, 100 об/мин).

2) Барботажный соплоконусный биореактор, общим объемом 21 л (собственная разработка лаборатории биологии культивируемых клеток ИФР РАН).

Перемешивающее устройство – барботер с одним отверстием диаметром 6 мм.

В обоих аппаратах использовали одинаковый тип трубчатого аэратора с микроотверстиями для мелкодисперсной подачи воздуха в питательную среду. Скорость подачи воздуха для аэрации – от 0.17 до 0.25 л на 1 л питательной среды в минуту (скорость постепенно повышали из-за уменьшения объема суспензии после отбора проб, в случае барботажного биореактора – это сумма воздуха на барботаж и аэрацию вместе взятые).

Для инокуляции в биореакторы использовали двухнедельную культуру, выращенную в колбах. Исходная плотность сухой биомассы составляла около 1 г/л. Культивирование проводили при температуре  $26 \pm 0.1^\circ\text{C}$  в темноте.

Жизнеспособность культур определяли с помощью окрашивания клеток прижизненным красителем феносафранином (0.1% раствор) (“Merck”, Германия) путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Для вычисления концентрации клеток применяли подсчет клеток в гемоцитометре Фукса-Розенталя после инкубации суспензии в 20% растворе хромовой кислоты при  $60^\circ\text{C}$  в течение 25–30 мин. Для определения сырой и сухой биомассы в 1 л среды фиксированный объем суспензии (не менее 10 мл в двух биологических повторностях) фильтровали под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера [13]. Биомассу высушивали в сушильном шкафу при  $50^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

Микрофотографии клеток сделаны с помощью цифровой камеры ToprCam SCMOS 0.3 Мпикс (Китай).

На основании полученных результатов рассчитывали параметры роста суспензионных культур клеток, такие как индекс роста (I), удельная скорость роста ( $\mu$ ), время удвоения биомассы ( $\tau$ ), максимальное накопление сухой биомассы ( $M_{\max}$ ), экономический коэффициент (Y), продуктивность по биомассе (P).

Для расчетов использовали следующие формулы [12]:

$I = X_{\max}/X_0$ , где  $X_{\max}$  и  $X_0$  – максимальное и начальное значения критерия роста соответственно (сухая биомасса, сырая биомасса, концентрация клеток).

$\mu$  ( $\text{сут}^{-1}$ ) =  $\ln X_2 - \ln X_1 / (t_2 - t_1)$ , где  $X_2$  и  $X_1$  – значения критерия роста (концентрация клеток, содержание сырой/сухой биомассы в литре среды) в момент времени  $t_2$  и  $t_1$  соответственно (рассчитывается для экспоненциальной фазы роста).

$$\tau$$
 ( $\text{сут}$ ) =  $\ln 2 / \mu$ .

$Y = (X_{\max} - X_0) / S_0$ , где  $X_{\max}$  и  $X_0$  – максимальная и начальная концентрации сухой биомассы (г/л),

соответственно;  $S_0$  – начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде (г/л среды).

$P$  (г/л · сут) =  $(X_i - X_0) / (t_i - t_0)$ , где  $X_0$  и  $X_i$  – количество сухой биомассы в начале культивирования и в момент времени  $t_i$ , соответственно.

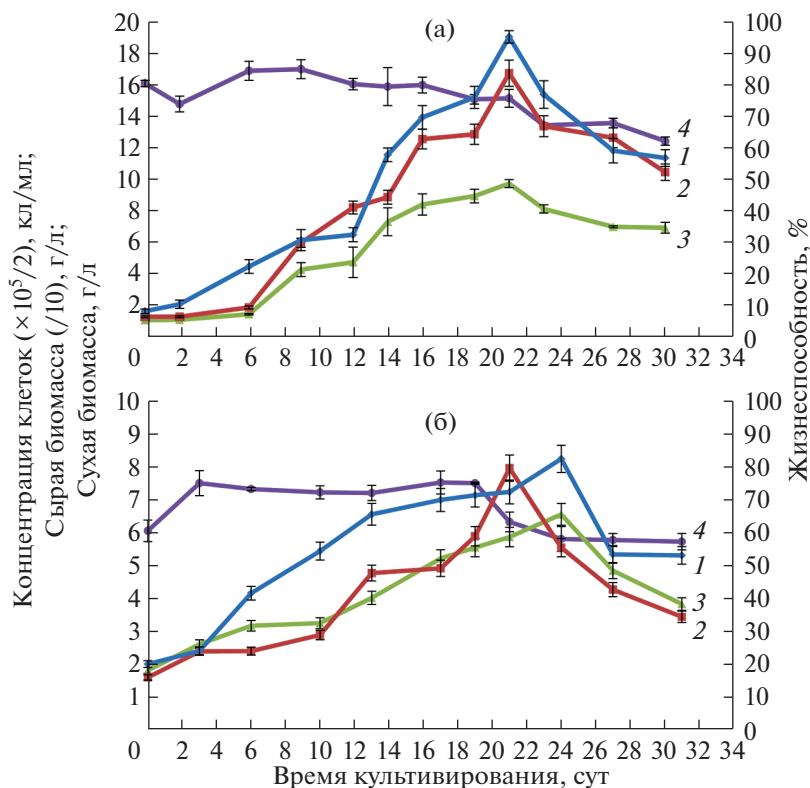
Для качественного анализа вторичных метаболитов в биомассе суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* использовали ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ ЭР МС). В качестве образца сравнения использовали корни интактных растений *Ph. sibiricus* (сбор 2017 года, Олекминский район, Якутия), предоставленные Ю.А. Аргыловым.

Общую экстракцию проводили из измельченного воздушно-сухого растительного материала (40–100 мг) 70% (по объему) водным этиловым спиртом 3 раза в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ-12, “Сапфир”, Россия), после чего центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин (МЦФ “ПЭ-6926”, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом при температуре  $45^\circ\text{C}$ . Полученный экстракт суспендировали в 5% (по объему) растворе уксусной кислоты в дистиллированной воде и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (“Supelco”, США). Патрон последовательно промывали 5% (по объему) раствором уксусной кислоты в дистиллированной воде и 70% этанолом. Полученный раствор упаривали под вакуумом при  $45^\circ\text{C}$ . Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1 : 1, по объему). Объем инъекции составлял 1–2 мкл.

УЭЖХ ЭР МС анализ проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (“Waters”, США), оснащенном гибридным квадрупольным время-пролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (“Waters”, США). Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов (диапазон  $m/z$  100–2000). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации –  $120^\circ\text{C}$ , температура десольвации –  $250^\circ\text{C}$ , напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 л/ч.

Условия хроматографического разделения: колонка ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; “Waters”, Ирландия), температура колонки –  $40^\circ\text{C}$ , скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Компоненты подвижной фазы: 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). В работе использовали два разных режима градиентного элюирования. При этом в ходе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (рас-





**Рис. 1.** Кривые роста суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* листового (а) и гипокотильного (б) происхождения: 1 – концентрация клеток ( $\times 10^5/2$ ), кл/мл; 2 – сырая биомасса (/10), г/л; 3 – сухая биомасса, г/л; 4 – жизнеспособность клеток.

творитель Б, % по объему): градиентный режим “А”: 0–1 мин – 15%, 1–5 мин – 15→30%, 5–15 мин – 30 → 38%, 15–15,5 мин – 38 → 45%, 15,5–23 мин – 45%, 23–23,5 мин – 45 → 95%; градиентный режим “Б”: 0–15 мин – 5 → 30%, 15–17 мин – 30 → 95%, 17–20 мин – 95%. Обработку полученных результатов производили с помощью программы Mass-Lynx (“Waters”, США).

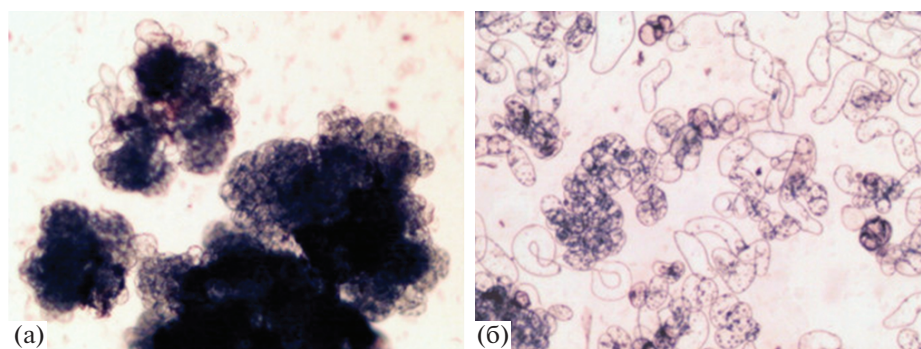
Определение ростовых и физиологических характеристик (содержание сырой и сухой биомассы, жизнеспособность и концентрацию клеток) проводили в двух биологических повторностях. На графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки ростовых и физиологических характеристик суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* при выращивании в колбах использовали жизнеспособность, концентрацию клеток, накопление сырой и сухой биомассы. Полученные результаты представлены на рис. 1 и табл. 1 и 2. При анализе кривых роста было отмечено наличие лаг-фазы в течение 2 суток для суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* листового происхождения и отсутствие лаг-фазы для суспензионной

культуры клеток гипокотильного происхождения. Жизнеспособность клеток в течение цикла выращивания находилась на уровне 70–80% и снижалась до 50–60% после 19–21 сут. Из представленных результатов по производным параметрам роста следует, что суспензионную культуру клеток листового происхождения можно отнести к хорошо растущим культурам. Индексы роста по всем критериям (сухая и сырая биомасса клеток, концентрация клеток) превышает 10, удельная скорость роста  $\mu$  находится в пределах 0,3–0,4 сут<sup>-1</sup>; максимальное накопление сухой биомассы  $M$  около 10 г/л. Экономический коэффициент  $Y$  при выращивании этой культуры равен 0,29, из чего следует, что почти 30% сахарозы питательной среды расходуется на построение биомассы клеток. В то же время суспензионная культура клеток гипокотильного происхождения при аналогичных условиях культивирования имела существенно худшие показатели роста. В среднем ростовые параметры этой культуры были в 2–3 раза ниже, чем культуры листового происхождения ( $I = 3,6–4,9$ ,  $\mu = 0,12–0,18$  сут<sup>-1</sup>,  $M = 6,6$  г/л,  $Y = 0,16$ ).

Для ростовых процессов исследуемых культур клеток провели оценку их степени агрегированности. Суспензионная культура клеток из каллусов листового происхождения имела преимущественно



**Рис. 2.** Микрофотографии суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus*, полученных из каллуса гипокотильного происхождения (а) и каллуса листового происхождения (б) (увеличение – 360х).

но более мелкие агрегаты, которые включали от 10 до 30 меристемоподобных клеток, и большое количество одиночных меристемоподобных, паренхимоподобных, удлинённых и аномальных клеток. Для суспензионной культуры из каллусов гипокотильного происхождения показано наличие большого количества крупных плотных агрегатов, состоящих, как минимум, из 30–50 клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типа. Микрофотографии суспензий представлены на рис. 2.

Для аппаратного выращивания использовали хорошо растущую мелкоагрегированную суспензионную культуру клеток листового происхождения. Были применены два типа биореакторов – с механическим перемешиванием общим объемом 7.5 л) и барботажный общим объемом 21 л. Ростовые характеристики при культивировании в разных типах биореакторов представлены на рис. 2 и в табл. 3 и 4.

Из представленных результатов следует, что аппаратное выращивание клеток в барботаж-

ном биореакторе приводит к стабильному росту культуры с длительностью лаг-фазы около 3 суток и улучшению ее основных ростовых показателей (индекс роста по сухой биомассе  $I = 12.7$ ; максимальное накопление сухой биомассы  $M = 15.8$  г/л продуктивность по сухой биомассе  $P = 0.78$  г/(л · сут), экономический коэффициент  $Y = 0.49$ ). Напротив, при использовании биореактора с механическим перемешиванием отмечено ухудшение ростовых параметров (индекс роста по сухой биомассе – 7.6; удельная скорость роста по сухой биомассе –  $0.13$  сут<sup>-1</sup>; максимальное накопление сухой биомассы – 8.9 г/л.). Наблюдаемое снижение ростовых характеристик обусловлено повреждающим действием на клетки механических перемешивающих устройств этого типа биореактора. Качественный фитохимический анализ вторичных метаболитов в исследуемых линиях суспензионных культур клеток и корней вздутоплодника сибирского был проведен методом УЭЖХ ЭР МС. Хроматографический анализ суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* был разделен на две стадии. Первая стадия

**Таблица 1.** Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* листового происхождения

Показатель роста	Производные параметры роста					
	$I$	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$\tau$ , сут	$M_{\max}$ , г/л	$Y$	$P$ , г/(л · сут)
Концентрация клеток	12.4	0.30	2.35			
Сырая биомасса	14.2	0.40	1.73	9.6	0.29	0.46
Сухая биомасса	10.0	0.38	1.82			

**Таблица 2.** Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* гипокотильного происхождения

Показатель роста	Производные параметры роста					
	$I$	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$\tau$ , сут	$M_{\max}$ , г/л	$Y$	$P$ , г/(л · сут)
Концентрация клеток	4.08	0.18	3.78			
Сырая биомасса	4.93	0.17	4.16	6.6	0.16	0.27
Сухая биомасса	3.60	0.12	5.62			

**Таблица 3.** Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* листового происхождения при выращивании в барботажном биореакторе

Показатель роста	Производные параметры роста					
	<i>I</i>	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$\tau$ , сут	$M_{\max}$ , г/л	<i>Y</i>	<i>P</i> , г/(л · сут)
Сырая биомасса	14.7	0.20	3.51	15.8	0.49	0.78
Сухая биомасса	12.7	0.18	4.10			

**Таблица 4.** Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* листового происхождения при выращивании в биореакторе с механическим перемешиванием

Показатель роста	Производные параметры роста					
	<i>I</i>	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$\tau$ , сут	$M_{\max}$ , г/л	<i>Y</i>	<i>P</i> , г/(л · сут)
Сырая биомасса	6.9	0.13	5.5	8.9	0.26	0.33
Сухая биомасса	7.6	0.13	5.2			

включала поиск и идентификацию в спиртовых экстрактах из биомассы суспензионных культур ацилированных производных келлактона – основных биологически активных веществ вздутоплодника сибирского (для сравнения использовали спиртовой экстракт из корней *Ph. sibiricus*). На второй стадии фитохимического исследования была выполнена предварительная идентификация обнаруженных вторичных метаболитов других структурных типов.

На первой стадии УЭЖХ ЭР МС анализ экстрактов из корней и биомассы двух суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* был выполнен в градиентном режиме “А”. Этот режим разделения позволяет проводить анализ соединений достаточно широкого диапазона полярности [14]. Результаты представлены на рис. 3.

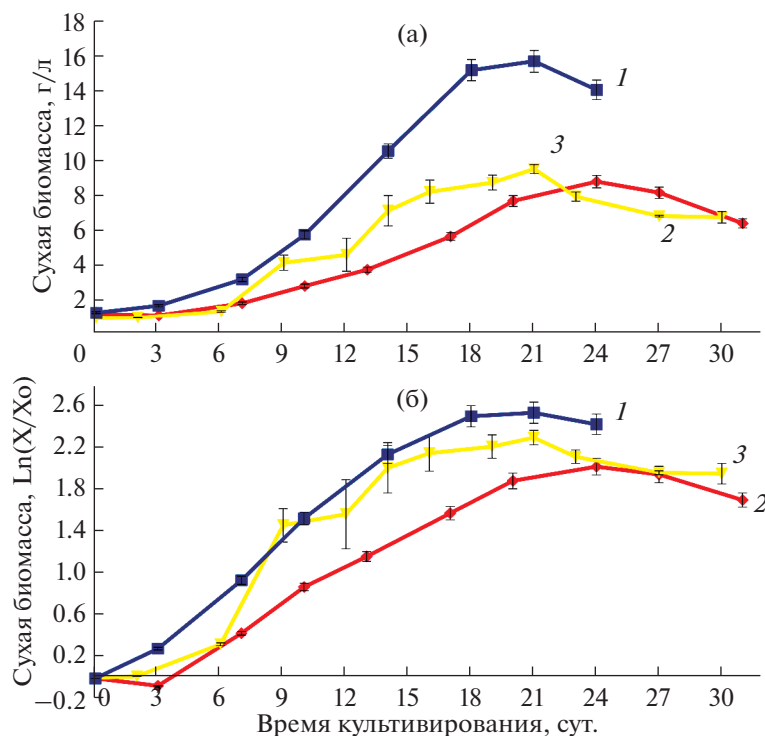
Выявлено, что профили вторичных метаболитов в культурах клеток и корнях интактных растений вздутоплодника сибирского имели значительные отличия. В суспензионных культурах клеток *Ph. sibiricus* в основном преобладали более полярные соединения (элюируются с хроматографической колонки в пределах 1–8 мин). В корнях вздутоплодника сибирского основными компонентами являлись более гидрофобные соединения (элюируются с колонки в пределах 11–20 мин). Сравнение результатов масс-спектрометрии обнаруженных соединений в экстрактах из корней *Ph. sibiricus* с данными литературы [5] позволяет заключить, что все они представляют собой эфиры ангулярного пиранокумарина келлактона с различными органическими кислотами. Два основных метаболита корней *Ph. sibiricus* (соединения 2 и 3, элюируются с колонки на 13.1 и 13.5 мин соответственно) идентифицированы как виснадин и дигидросамидин. В образцах биомассы суспензионных

культур клеток *Ph. sibiricus* эти соединения обнаружить не удалось.

Для детальной идентификации полярных метаболитов (в градиентном режиме “А” элюируются с хроматографической колонки в пределах 1–8 мин), обнаруженных в суспензионных культурах клеток *Ph. sibiricus*, провели УЭЖХ ЭР МС анализ соответствующих экстрактов с использованием программы элюирования “Б”. Запись хроматограмм проводили в режиме детектирования отрицательных ионов [15]. Хроматограммы (полный ионный ток) экстрактов из биомассы двух суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus*, записанные при детектировании отрицательных ионов, представлены на рис. 4.

Показано, что основными (судя по интенсивности сигналов соответствующих хроматографических пиков) во всех образцах были шесть соединений, которые элюировались с колонки в пределах 4.8–15.2 мин. В порядке увеличения гидрофобности эти соединения обозначены номерами 7–12 (рис. 5). Состав полярных вторичных метаболитов в биомассе суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* характеризовался значительным сходством.

Предварительную структурную идентификацию обнаруженных соединений проводили путем сравнения их масс-спектрометрического и относительного хроматографического поведения с данными литературы [5, 16–18]. Результаты идентификации компонентов № 7–12 представлены в таблице 5. Все идентифицированные компоненты являются фенольными производными различных структурных типов. Компоненты 7, 11 и 12 относятся к группе кумаринов: компонент 7 – гексозид (скорее всего – глюкозид) ангулярного пиранокумарина келлактона [5]; компоненты 11 и 12 – производные простого пренилированного кумарина остхенола или 7-деметилсуберозина



**Рис. 3.** Кривые роста по накоплению сухой биомассы суспензионной культуры *Ph. sibiricus* листового происхождения в нормальной (а) и в полулогарифмической (б) системах координат при выращивании различных типов систем: 1 – барботажный биореактор; 2 – биореактор с механическим перемешиванием, 3 – колбы.

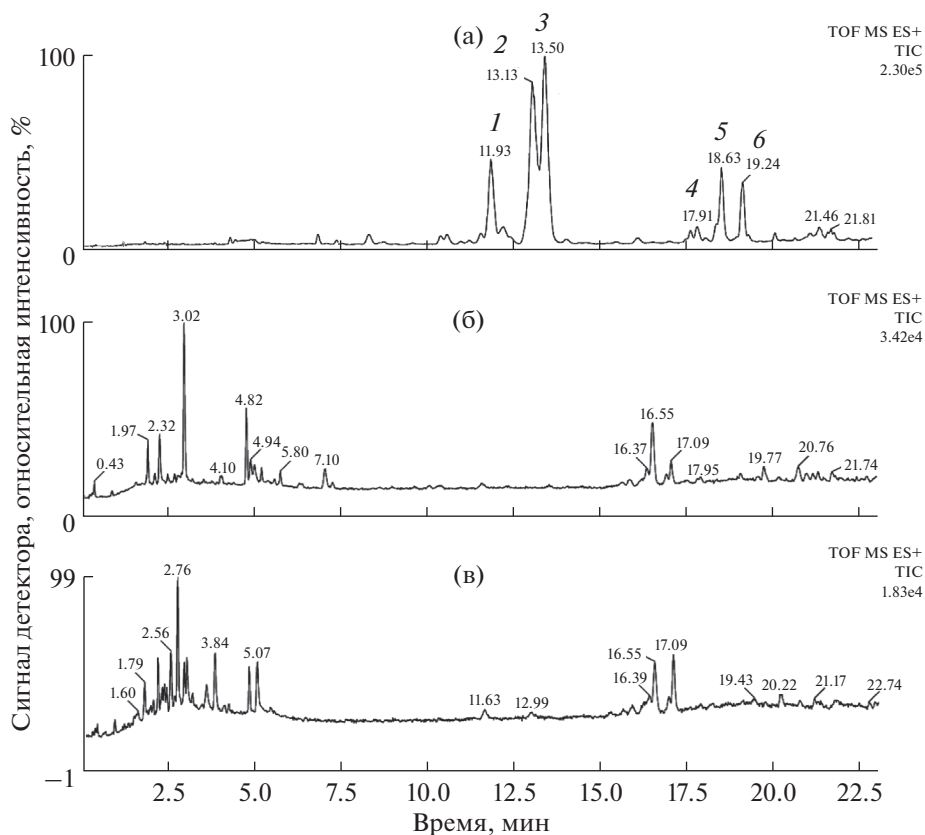
(изомерные кумарины, которые трудно различить на основании только данных масс-спектрометрии) [19]. Компоненты 8 и 10, вероятнее всего, относятся к группе гликозидов бензофуранов [16]. Компонент 9 – идентифицирован как гликозилированное производное изомера матаирезинола – лигнана дибензилбутиролактонного типа [18]. Из идентифицированных соединений для интактных растений вздутоплодника сибирского характерным считается только гликозид келлактона (компонент 7) [5]. Однако судя по интенсивности сигнала соответствующего хроматографического пика, соединение 7 является “минорным” (в количественном отношении) фенольным вторичным метаболитом в культивируемых *in vitro* клетках *Ph. sibiricus*. Стоит отметить, что в настоящей работе идентификация соединений основана почти исключительно на результатах масс-спектрометрии. Поэтому для более точного структурного описания обнаруженных веществ требуются дальнейшие исследования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

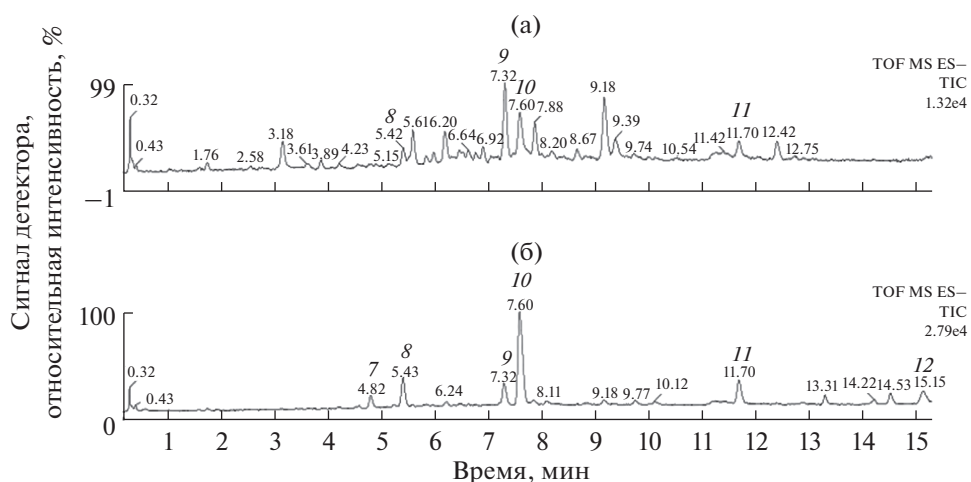
Исследование факторов, определяющих ростовые и биосинтетические свойства культур клеток высших растений, имеет как фундаментальное, так и прикладное значение. Традиционно считается, что эпигенетические свойства экспланта (исполь-

зование различных органов растения для инициации культур клеток) играют менее существенную роль для этих характеристик, чем генетические особенности (вид растения) или условия культивирования. Полученные в настоящей работе результаты не в полной степени согласуются с этой точкой зрения. Анализ ростовых характеристик двух суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus*, которые были получены из каллусов, инициированных из разных эксплантов (лист или гипокотиль стерильных растений), показал существенные отличия. Ростовые параметры суспензионной культуры клеток, полученной из каллусов листового происхождения, были в два – три раза выше, чем у культуры, инициированной из каллусов гипокотильного происхождения. Любопытно, что используемые для получения суспензионных культур каллусные линии *Ph. sibiricus* обладали противоположными свойствами – худший рост был характерен для каллусной культуры клеток листового происхождения [11].

Сопоставление основных физиологических характеристик исследуемых суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* позволяет предположить, что наблюдаемые изменения их ростовых параметров обусловлены различиями в степени их агрегированности: культура клеток листового происхождения состояла из мелких клеточных агрегатов, гипокотильного – из крупных. Поскольку обе



**Рис. 4.** УЭЖХ ЭР МС хроматограммы (режим полного ионного тока, регистрация положительных ионов; программа градиентного элюирования “А”) спиртовых экстрактов из корней (а) и биомассы суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* гипокотильного (б) и листового (в) происхождения: 1 – pteryxin; 2 – visnadin; 3 – dihydrosamidin; 4 – khellactone 3-isovaleryl/2-methylbutyryl-4-isobutyryl ester; 5 – khellactone 3-isovaleryl/2-methylbutyryl-4-senecieryl/angeloyl ester; 6 – khellactone 3,4-diisovaleryl/2-methylbutyryl ester/khellactone isovaleryl-2-methylbutyryl ester.



**Рис. 5.** УЭЖХ ЭР МС хроматограммы (режим полного ионного тока, регистрация отрицательных ионов; программа градиентного элюирования “Б”) спиртовых экстрактов из биомассы суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* листового (а) и гипокотильного (б) происхождения: 7–12 – хроматографические пики идентифицированных вторичных метаболитов (табл. 4).

**Таблица 5.** Результаты УЭЖХ ЭРМС анализа (регистрация отрицательных ионов; градиентный режим “Б”) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* гипокотильного происхождения

Номер пика*	$t_R$ , мин**	Масс-спектры, $m/z$ ***		Результаты идентификации
		[M–H] <sup>–</sup>	Другие ионы	
7	4.8	423.11	847.25 [2M – H] <sup>–</sup> 491.10 [M–H + HCOONa] <sup>–</sup> 486.10 [M–H + HCOONH <sub>4</sub> ] <sup>–</sup>	Khellactone-Hex
8	5.4	397.10	795.22 [2M–H] <sup>–</sup> 465.09 [M–H + HCOONa] <sup>–</sup> 460.12 [M–H + HCOONH <sub>4</sub> ] <sup>–</sup>	Изомер 6-Carboxyethyl-7-methoxy-5-hydroxybenzofuran 5-Hex
9	7.3	605.17	673.16 [M–H + HCOONa] <sup>–</sup> 561.19 [M–H–CO <sub>2</sub> ] <sup>–</sup> 357.12 [M–H–Hex–Mal] <sup>–</sup> 339.12 [M–H–Hex–Mal–18] <sup>–</sup>	Изомер matairesinol-Hex-Mal
10	7.6	483.10	967.21 [2M–H] <sup>–</sup> 469.12 [M–H–14] <sup>–</sup> 439.09 [M–H–CO <sub>2</sub> ] <sup>–</sup>	Изомер 6-Carboxyethyl-7-methoxy-5-hydroxybenzofuran 5-Hex-Mal
11	11.8	–	955.26 [2M–H] <sup>–</sup> 433.15 [M–H–CO <sub>2</sub> ] <sup>–</sup> 229.07 [M–H–Hex–Mal] <sup>–</sup> 545.12 [M–H + HCOONa] <sup>–</sup> 540.13 [M–H + HCOONH <sub>4</sub> ] <sup>–</sup>	7-demethylsuberosin/Osthenol-Hex-Mal
12	15.1	229.07	–	7-demethylsuberosin/Osthenol

Примечание: \* – нумерация пиков соответствует таковой на рис. 5; \*\* – время удерживания на хроматографической колонке, мин (градиентный режим “Б”); \*\*\* – данные масс-спектров (указаны значения  $m/z$  для обнаруженных ионов); Hex – остаток гексозы; Mal – остаток малоновой кислоты.

суспензионные культуры клеток *Ph. sibiricus* были получены одновременно и в идентичных условиях, можно предположить, что наблюдаемые различия в их степени агрегированности обусловлены характеристиками (в том числе, эпигенетическими) исходных каллусных культур клеток.

Характеристика линий, полученных из разных органов одного растения, является важным критерием при отборе перспективных штаммов для биотехнологического использования культур клеток. Выращивание суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* листового происхождения в барботажном биореакторе показало улучшение ростовых показателей, по сравнению с культивированием в колбах. Напротив, при выращивании клеток в биореакторе с механическим перемешиванием отмечено снижение ростовых показателей. Подобные результаты были получены при работе с культурами клеток других видов (диоскореи *Dioscorea deltoidea* Wall., женьшеня *Panax japonicus var repens*, стефании *Stephania glabra* Roxb [20, 21]). При этом улучшение ростовых характеристик в барботажном биореакторе предположительно связано с

большей интенсивностью аэрации клеток, а ухудшение роста при использовании биореактора с механическим перемешиванием – с повреждающим действием на клетки перемешивающих устройств. Таким образом, при аппаратурном культивировании суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* предпочтительной системой ожидаемо оказался барботажный биореактор.

В ходе исследования фитохимического состава в суспензионных культурах клеток вздутоплодника сибирского были отмечены значительные различия в составе фенольных соединений в клетках *in vitro* и в корнях интактного растения. В суспензионных культурах клеток *Ph. sibiricus* в основном преобладали полярные (гидрофильные) соединения, тогда как в корнях главными компонентами были более гидрофобные метаболиты. Основные метаболиты корней *Ph. sibiricus*, такие как виснадин и дигидросамидин, в биомассе суспензионных культур клеток обнаружены не были.

Все идентифицированные полярные компоненты суспензионных культур клеток вздуто-

плодника сибирского относились к фенольным производным. При этом большинство обнаруженных соединений в клетках *in vitro* (за исключением гликозида келлактона [22]) не характерны для интактных растений *Ph. sibiricus*.

Некоторые из обнаруженных соединений – эфир гексозида пренилированного кумарина остхенола/7-деметилсуберозина, малонильные производные гликозидов кумаринов – могут быть отнесены к весьма редким фенольным производным растений. Другие из обнаруженных соединений – гликозиды бензофуранов – достаточно широко распространены среди разных таксонов [16, 22–26], однако сообщений об их присутствии у видов *Phlojodicarpus* spp. в доступной литературе обнаружить не удалось.

Любопытно, что характерные для интактного растения пренилированные кумарины (виснадин, дигидросамидин и другие эфиры келлактона) были идентифицированы в исходных каллусных культурах *Ph. sibiricus* [11], но в длительно выращиваемых суспензионных культурах клеток они не были обнаружены.

Изложенные результаты вполне согласуются с известными в литературе данными об изменении (по сравнению с интактными растениями) вторичного метаболизма в культивируемых *in vitro* клетках растений. Подобные тенденции были отмечены при образовании стероидных гликозидов в культурах клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea* Wall.) и якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.). В обеих культурах происходило накопление только способствующих пролиферации клеток фураностаноловых гликозидов, тогда как для интактных растений более характерны спиростаноловые формы стероидных гликозидов [1, 27].

Работы по выращиванию суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* и исследованию их ростовых характеристик выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00097).

Работы по анализу фитохимических характеристик культур клеток *Ph. sibiricus* выполнены при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019).

Работы по аппаратурному выращиванию суспензионных культур клеток *Ph. sibiricus* и идентификации обнаруженных вторичных метаболитов выполнены при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

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. *Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V.* Isoprenoid Production via Plant Cell Cultures: Biosynthesis, Accumulation and Scaling-Up to Bioreactors // Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology / Eds. Paek K.Y., Murthy H., Zhong J.J. Dordrecht: Springer, 2014. P. 563. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3\\_23](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23)
2. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Данилова Н.С. Москва: Реарт, 2017. 409 с.
3. *Сенчик А.В., Маликова Е.И.* Красная книга Амурской области: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов [2-е изд.]; <http://www.amurohota.ru/files/RedBookAmur2019.pdf>
4. Красная книга Забайкальского края: Растения / Научный редактор Попова О.А. Новосибирск: Дом мира, 2017. 384 с.
5. *Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C.* Khellactone Derivatives and Other Phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV Profile, and Antiobesity Potential of Dihydrosamidin // Molecules. 2019. V. 24. P. 2286. <https://doi.org/10.3390/molecules24122286>
6. *Antonova O.K., Shemeryankin B.V.* Coumarins of the roots of *Phlojodicarpus sibiricus* // Chemistry of Natural Compounds. 1981. V. 17. P. 588. <https://doi.org/10.1007/BF00574388>
7. *Nikonov G.K., Vandyshev V.V.* Visnadin – A new component of the plant genus *Phlojodicarpus* // Chemistry of Natural Compounds. 1969. V. 5. P. 101. <https://doi.org/10.1007/BF00633290>
8. *Babilev F.V., Nikonov G.K.* Coumarins of the roots of *Phlojodicarpus villosus* Turcz. // Chemistry of Natural Compounds. 1965. V. 1. P. 278. <https://doi.org/10.1007/BF00563704>
9. *Gantimur D., Semenov A.A.* Coumarins from *Phlojodicarpus sibiricus* // Chemistry of Natural Compounds. 1981. V. 17. P. 41. <https://doi.org/10.1007/BF00566431>
10. *Васильева О.Д.* Вздуплоплодник сибирский *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. в Якутии (Биология, интродукция, охрана): Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИБПК СО РАН, 2005. 15 с.
11. *Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Клошин А.Г., Носов А.М.* Получение и фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. / Биотехнология. 2020.
12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. V. 15. P. 473.
13. *Носов А.М.* Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2012. С. 386.

14. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 649. <https://doi.org/10.1134/S102144371705003X>
15. Liigand P., Kaupmees K., Haav K., Liigand J., Leito I., Girod M., Antoine R., Krive A. Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte // Analytical Chemistry. 2017. V. 89. P. 5665. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00096>
16. Wei S.-P., Luan J.-Y., Lu L.-N., Wu W.-J., Ji Z.-Q. A new benzofuran glucoside from *Ficus tikoua* Bur. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 4946. <https://doi.org/10.3390/ijms12084946>
17. Xu M. J., Wu B., Ding T., Chu J. H., Li C. Y., Zhang J., Wu T., Wu J., Liu S. J., Liu S. L., Ju W. Z., Li P. Simultaneous characterization of prenylated flavonoids and isoflavonoids in *Psoralea corylifolia* L. by liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2012. V. 26. P. 2343. <https://doi.org/10.1002/rcm.6361>
18. Liu X.-T., Wang X.-G., Yang Y., Xu R., Meng F.-H., Yu N.-J., Zhao Y.-M. Qualitative and Quantitative Analysis of Lignan Constituents in Caulis Trachelospermi by HPLC-QTOF-MS and HPLC-UV // Molecules. 2015. V. 20. P. 8107. <https://doi.org/10.3390/molecules20058107>
19. Sasaki H., Taguchi H., Endo T., Yosioka I. The Constituents of *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt et Miq. Structure of a New Coumarin Glycoside, Ostheno-7-O- $\beta$ -gentiobioside // Chem. and Pharm. Bull. 1980. V. 28. P. 1847.
20. Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Ivanov I.M., Sukhanova E.S., Nosov A.M. Features of respiration and formation of steroidal glycosides in *Dioscorea deltoidea* cell suspension culture grown in flasks and bioreactors // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 557. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040160>
21. Titova M.V., Reshetnyak O.V., Osipova E.A., Shumilo N.A., Oreshnikov A.V., Osip'yants A.I., Nosov A.M. Submerged cultivation of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers cells in different systems: Specific features of growth and accumulation of alkaloid stepharine // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 645. <https://doi.org/10.1134/S0003683812070046>
22. Murray R.D.H. The Naturally Occurring Coumarins. In Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Eds. Murray R.D.H., Herz W., Falk H., Kirby G.W., Moore R.E. Vienna: Springer, 2002. P. 1. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6172-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6172-2_1)
23. Sarker S.D., Nahar L. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 106 / Eds. Kinghorn A.D., Falk H., Gibbons S., Kobayashi J.I. Cham: Springer International Publishing, 2017. P. 241. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-59542-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59542-9_3)
24. He R., Zhang Y., Wu L., Nie H., Huang Y., Liu B., Deng S., Yang R., Huang S., Nong Z., Li J., Chen H. Benzofuran glycosides and coumarins from the bark of *Streblus indicus* (Bur.) Corner. / Phytochemistry. 2017. V. 138. P. 170. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.01.011>
25. Matsuo Y., Yamaguchi E., Hakamata R., Ootomo K., Takatori K., Fukaya H., Mimaki Y. Benzofuran and coumarin derivatives from the root of *Angelica dahurica* and their PPAR- $\gamma$  ligand-binding activity / Phytochemistry. 2020. V. 173. e112301. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112301>
26. Mi J., Peng, Y., Zhang H., Wang X., Huo Y., Wang Z., Liu Y., Gao Y., Zhang H. A new benzofuran derivative glycoside and a new coumarin glycoside from roots of *Heracleum dissectum* Ledeb. / Medicinal Chemistry Research. 2018. V. 27. P. 470. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2073-9>
27. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Суханова Е.С., Ключин А.Г., Иванов И.М., Носов А.М. Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. — продуцента стероидных гликозидов // Биотехнология. 2016. Т. 32. С. 21.