

СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 3, 2022

ОБЗОРЫ

Сердечные гликозиды: распространение, свойства и специфика образования в культурах клеток и органов растений <i>in vitro</i> <i>С. В. Томилова, А. В. Куташов, А. М. Носов</i>	227
Газотрансмиттер монооксид углерода: синтез и функции у растений <i>Ю. Е. Колупаев</i>	246
Фотопериод-зависимые механизмы инициации цветения <i>Arabidopsis thaliana</i> L. и <i>Zea mays</i> L. <i>А. В. Щенникова</i>	261
Генетические аспекты засухоустойчивости полиплоидных растений на примере пшеницы <i>Triticum aestivum</i> L. <i>С. В. Осипова, Р. М. Островская, А. В. Третьякова</i>	272
Современные представления об аденилатциклазах растений <i>Л. А. Ломоватская, О. В. Кузакова, А. С. Романенко</i>	286

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Влияние ауксинов и цитокининов на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток <i>Tribulus terrestris</i> L. <i>А. Г. Ключин, С. В. Томилова, Д. В. Кочкин, Б. А. Галишев, А. М. Носов</i>	297
Физиологический (интеграционный) подход при использовании параметров флуоресценции хлорофилла листьев растений <i>Т. В. Нестеренко, А. А. Тихомиров, В. Н. Шихов</i>	306
Стресс-протекторное действие фураностаноловых гликозидов на культивируемые клетки люцерны в условиях гипотермии и гиперосмотического стресса <i>Л. А. Волкова, В. В. Урманцева, А. Б. Бургутин, А. М. Носов</i>	317
Изменение активности генов транскрипционных факторов <i>TaNAC69</i> , <i>TaDREB1</i> , <i>TabZIP60</i> у растений мягкой пшеницы при водном дефиците и гипотермии <i>Е. А. Заикина, Х. Г. Мусин, А. Р. Кулуев, В. И. Никонов, А. М. Дмитриев, Б. Р. Кулуев</i>	327

УДК 581.1

СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, СВОЙСТВА И СПЕЦИФИКА ОБРАЗОВАНИЯ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

© 2022 г. С. В. Томилова^{a, b, *}, А. В. Киташов^{a, c}, А. М. Носов^{b, c}^aУниверситет МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Шэньчжэнь, Китай^bФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия^cФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

*e-mail: lanatomilova@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.12.2021 г.

После доработки 05.12.2021 г.

Принята к публикации 05.12.2021 г.

Одной из отличительных особенностей растительного организма является вторичный метаболизм (образование веществ специализированного обмена). Данные по полным сиквенсам растительных геномов свидетельствуют, что от 15 до 25% всех генов задействованы в осуществлении этого процесса (биосинтез обслуживающих его ферментов, транспортеров, трансфакторов), при этом до сих пор неясны многие аспекты вторичного метаболизма, в том числе его физиологические функции. Перспективным подходом к решению фундаментальных и прикладных задач в области специализированного обмена является использование культур клеток и органов высших растений. Механизмы образования вторичных метаболитов в растительных системах *in vitro* с разным уровнем дифференцировки клеток могут существенно отличаться от таковых в интактном растении, что, при сопоставлении этих биологических систем, можно эффективно использовать для изучения принципов регуляции, организации и функционирования вторичного метаболизма. К настоящему времени известно более 100000 соединений специализированного обмена (алкалоиды, изопреноиды, фенольные соединения, ряд “минорных” групп вторичных метаболитов), которые, как правило, являются биологически активными веществами. Это обуславливает их практическую значимость и широкое применение в медицине: на сегодняшний день около трети всех лекарственных субстанций имеют растительное происхождение. На фоне острого дефицита лекарственного растительного сырья, использование культур клеток и органов растений в качестве источника биологически активных веществ весьма перспективно. Сердечные гликозиды являются одной из важнейших групп вторичных метаболитов, которая уже более двух веков используется в медицине для лечения кардиологических заболеваний. Сейчас интерес к ним существенно возрастает в связи с обнаружением новых свойств — в том числе антивирусной и противоопухолевой активности. В представленном обзоре проведен анализ основных результатов работ, посвященных изучению образования сердечных гликозидов в культурах клеток и органов растений-продуцентов этих соединений.

Ключевые слова: вторичный метаболизм, биологически активные вещества, сердечные гликозиды, карденолиды, буфаденолиды, культуры клеток и органов высших растений

DOI: 10.31857/S0015330322030162

ВВЕДЕНИЕ

Высшие растения производят большое количество разнообразных химических соединений, которые не задействованы в их первичном обмене. Традиционно этот процесс называют вторичным метаболизмом или специализированным обменом, наличие которого является отличительной особенностью растительных организмов [1]. Данные по полным сиквенсам растительных геномов свидетельствуют, что около 15–25% генов

кодируют ферменты, транспортеры, факторы транскрипции и другие белковые продукты, участвующие в биосинтезе вторичных метаболитов, при этом до сих пор неясны многие принципы его регуляции и организации, а главное — физиологические функции вторичных метаболитов [2]. Большинство исследователей считают, что данные соединения — это “биохимические инструменты” взаимодействия растительных организмов с окружающей средой. Вторичные метаболиты

ты играют важную роль в стресс-реакциях и специализированных адаптациях растений при действии биотических и абиотических стрессоров (в системах защиты от вредителей и патогенов, при гипо- и гипертермии, водном дефиците, засолении); участвуют в процессах размножения (привлечение опылителей); во взаимодействии растений между собой и с другими организмами в экосистеме [1, 2]. Справедливость этой концепции подтверждена для ряда классов соединений специализированного обмена (например, многих фенольных соединений – антоцианов, изофлавоноидов) или некоторых “функциональных” групп вторичных метаболитов (например, фитоалексинов). В то же время, для большинства вторичных метаболитов строгих доказательств этой концепции практически нет [1].

Одним из перспективных подходов к изучению функционального значения вторичного метаболизма считается использование культур клеток или органов высших растений. В этой экспериментальной биологической системе могут синтезироваться различные по химической природе вещества, однако механизмы образования вторичных метаболитов в растительных системах *in vitro* с разным уровнем дифференцировки клеток могут существенно отличаться от таковых в интактном растении. Сопоставление специализированного обмена в системах интактное растение – культура органов – культура клеток является эффективным подходом для изучения принципов регуляции, организации и функционирования вторичного метаболизма [2, 3].

Практическое значение исследования специализированного обмена в культурах клеток и органов растений обусловлено тем, что вторичные метаболиты, как правило, обладают значительной и разнонаправленной биологической активностью. Большинство лекарственных и ядовитых растений являются таковыми именно за счет присутствия в них вторичных соединений. В настоящее время физиологически активные вещества растений часто рассматривают как основные составляющие лекарств, пищевых добавок, косметических и парфюмерных средств. Около трети всех лекарственных субстанций, используемых в медицинской практике, имеют растительное происхождение [4, 5].

Многие ценные лекарственные растения часто относятся к редким и эндемичным видам. При этом для большинства интактных растений (дикорастущих и плантационных) характерен нестабильный химический состав и высокая вероятность естественного и антропогенного загрязнения получаемого из них лекарственного сырья, зависящие от условий произрастания. В связи с этим поиск экологически чистого возобновляемого растительного сырья с высоким содержанием целевых веществ не-

зависимо от климатических и погодных условий является весьма актуальной проблемой.

Самым многочисленным классом веществ вторичного обмена растений являются изопреноиды, которых к настоящему времени насчитывают более 40000 индивидуальных соединений [2]. Их классифицируют по числу изопреновых единиц, участвующих в построении молекулы, и разделяют на моно-, сескви-, ди-, сестер-, три- и тетрапреноиды [2, 6]. Наиболее важной группой с точки зрения медицинского использования являются тритерпеноиды, к которым относятся тритерпеновые, стероидные и сердечные гликозиды, обуславливающие уникальные свойства таких растений как женьшень, солодка, маралий корень, диоскорея, наперстянка, строфант, ландыш и др. [2, 7].

Одной из наиболее интересных групп тритерпеноидов по праву считаются сердечные гликозиды, которые используются для лечения кардиологических заболеваний свыше 200 лет [7, 8]. До сегодняшнего дня растительное сырье является основным источником этих соединений (наперстянка – дигитоксин и дигоксин, строфант – строфантин К и G, ландыш – конваллязид и конваллятоксин) [8, 9]. При этом содержание данной группы веществ в интактном растении – это непостоянная величина, которая зависит от климатических условий, срока вегетации, и даже времени суток, в которое производится сбор [9]. В настоящее время интерес к сердечным гликозидам существенно возрастает в связи с обнаружением их новых свойств – в том числе антивирусной и противоопухолевой активности [10].

Изучение культуры клеток высших растений как источника сердечных гликозидов началось более 50 лет назад. Исследованием этой проблемы занимались многие группы ученых, которые использовали в качестве объекта преимущественно культуру клеток, тканей и органов разных видов рода *Digitalis* (наперстянка), хотя имеются сообщения и о культурах клеток других родов растений-продуцентов данных соединений. В большинстве случаев образования сердечных гликозидов в клетках *in vitro* не происходило. При этом в некоторых работах было зафиксировано наличие этих соединений в “молодых” культурах клеток (2–5 циклов выращивания после получения), однако в процессе дальнейшего длительного выращивания культур их содержание, как правило, снижалось. Образование сердечных гликозидов в культурах клеток можно было инициировать различными способами регуляции и воздействия, однако эффективность подобных методик часто уменьшалась с возрастом культур [11, 12].

В представленном обзоре проведен анализ накопленного опыта в этой области исследований и приведены основные результаты работ, посвя-

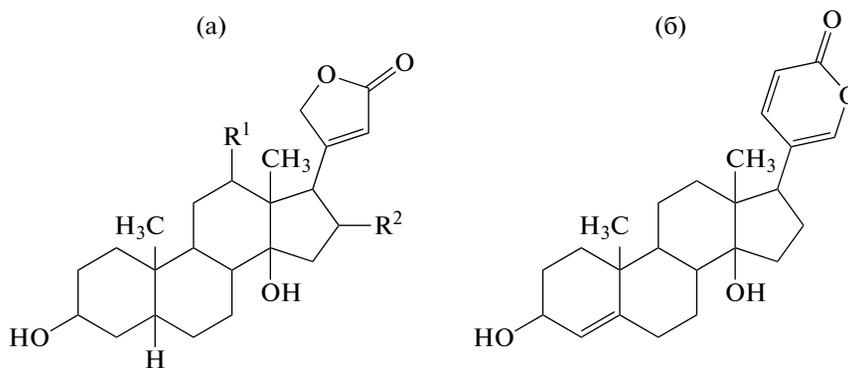


Рис. 1. Химические структуры агликонов карденолидов (а) и буфадиенолидов (б) [7].

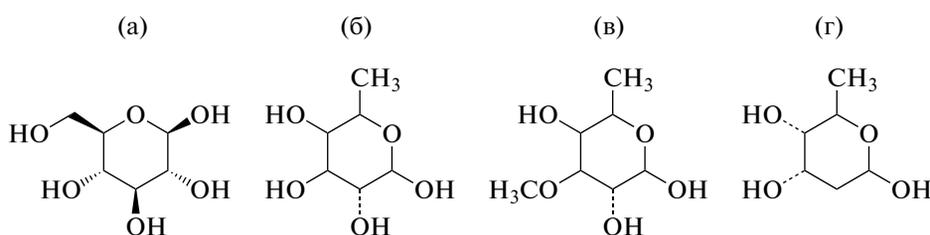


Рис. 2. Химические структуры некоторых сахаров, входящих в молекулы сердечных гликозидов [13]: а – D-глюкоза; б – D-фруктоза; в – D-дигалактоза; г – D-дигитоксоза.

ценных изучению образования сердечных гликозидов в культурах клеток и органов *in vitro* разных семейств растений-продуцентов данной группы изопреноидов.

СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ КАК ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЦЕННАЯ ГРУППА ИЗОПРЕНОИДОВ

Сердечные гликозиды (кардиогликозиды) – это гликозиды тритерпеновых соединений, агликоном которых являются производные циклопентанопергидрофантрена, имеющие в положении С-17 ненасыщенное лактонное кольцо, и оказывающие специфическое действие на сердечную мышцу. Данная группа включает два типа соединений в зависимости от строения ненасыщенного лактонного кольца агликона (рис. 1): карденолиды имеют пятичленное лактонное кольцо; буфадиенолиды – шестичленное [7].

Сахарная цепь присоединена в положении С-3 и содержит до пяти углеводных остатков, которые помимо обычных сахаров (глюкоза, рамноза) включают различные редкие 6-дезоксид-, 2,6-дидезоксид- и 6-дезоксид-3-метоксигексозы, такие как D-фукоза, D-дигалактоза и D-дигитоксоза [12] (рис. 2).

Биосинтез сердечных гликозидов, в основном, происходит по классическому мевалонатному (MVA) пути образования изопреноидов, то есть

предшественником для их синтеза является мевалоновая кислота [7, 14]. Важным открытием было то, что атомы углерода С-22 и С-23 лактонного кольца не являются производными мевалоновой кислоты, для их формирования предшественник прогестерона прегнан должен конденсироваться с такими соединениями как ацетил-КоА или малонил-КоА. Этот процесс был обозначен как “прегнановый путь”. Кроме того, описан альтернативный путь биосинтеза сердечных гликозидов с участием кислотного эквивалента прегненолона – норхолановой кислоты [10]. В процессе формирования этой группы соединений задействованы около 20 различных ферментов и три клеточных компартмента – митохондрии, эндоплазматический ретикулум и цитозоль [7, 14].

Сердечные гликозиды были обнаружены, по крайней мере, в 20 семействах высших растений, при этом семейство *Aposynaceae* является лидером по количеству видов, содержащих карденолиды. Наиболее известными продуцентами этих соединений считаются разные виды наперстянок *Digitalis* spp., относящиеся к семейству *Plantaginaceae* (ранее входили в семейство *Scrophulariaceae*) [7, 10]. В отличие от карденолидов, буфадиенолиды распространены менее широко – они преимущественно встречаются в растениях шести семейств, таких как, *Hyacinthaceae*, *Crassulaceae*, *Iridaceae*, *Melianthaceae*, *Ranunculaceae* и *Santalaceae* [15]. Следует отметить, что сердечные гликозиды так-

же найдены у насекомых (светлячки рода *Photinus*), земноводных (жабы рода *Bufo*, от которых и произошло название “буфадиенолиды”), пресмыкающихся (ужеобразные змеи рода *Rhabdophis*) и млекопитающих (выделены из плазмы крови и гипоталамуса человека) [15, 16].

*Механизмы биологической
активности сердечных гликозидов*

Карденолиды и буфадиенолиды длительное время применяли в медицине в качестве эффективных кардиотонических лекарственных средств [8, 17]. Помимо сердца, данные соединения способны оказывать влияние на гладкие мышцы и центральную нервную систему [8]. Сердечные гликозиды – это сильные яды и только использование в очень малых дозах делает их относительно безопасными. В настоящее время, помимо применения этих соединений в терапии сердечно-сосудистых нарушений, в них увидели перспективных агентов для лечения различных видов рака, муковисцидоза, вирусных заболеваний и эффективных нейропротекторов [10, 17].

Большинство механизмов действия сердечных гликозидов связаны со способностью ингибировать активность мембранносвязанной Na^+, K^+ -АТФазы [8, 17]. Эти соединения являются аллостерическими высокоспецифичными ингибиторами данного фермента [10, 17]. Характерный эффект гликозидов на сердце связан главным образом со структурой агликона и наличием в нем ненасыщенного лактонного кольца. Стероидная часть молекулы (агликон) считается фармакофором и необходима для распознавания рецепторами [10, 17]. Лактонное кольцо в положении С-17 β содержит два атома кислорода, которые создают высокий отрицательный потенциал и, таким образом, увеличивают направленность образования водородных связей [18]. Добавление сахаров к стероидному агликону влияет на фармакодинамические и фармакокинетические свойства соединений (степень растворимости, проницаемость через клеточные мембраны, способность связываться с белками крови и тканей, активность, токсичность) [10, 17, 18].

Сердечные гликозиды активируют сигнальные свойства Na^+, K^+ -АТФазы, что улучшает соотношение инотропности и токсичности и делает их одними из лучших лекарственных средств для лечения сердечных заболеваний. Сердечные гликозиды, в частности дигоксин и дигитоксин, более двух столетий являлись основными препаратами для коррекции сердечно-сосудистых нарушений, но идентификация ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, блокаторов ангиотензиновых рецепторов и β -адреноблокаторов значительно сократила их клиническое применение [17].

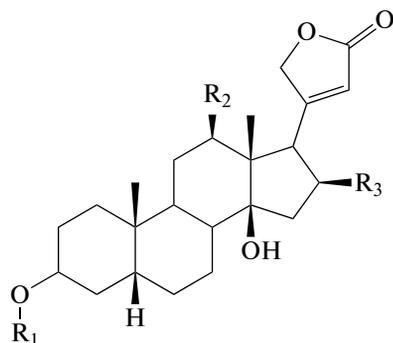
Тем не менее, некоторые исследования показали, что дигоксин в низких концентрациях значительно снижает смертность и госпитализацию у амбулаторных пациентов с хроническими систолической и диастолической сердечными недостаточностями. Поэтому, следует ли считать дигоксин препаратом прошлого для лечения сердечных заболеваний – это все еще предмет дискуссии [17, 19].

Обычные для сердечных гликозидов дозировки (0.25–3.0 мг на прием) длительное время были серьезным препятствием для применения их в терапии различных заболеваний, в частности, в качестве противоопухолевых средств [10]. Активность этих соединений против рака известна уже более 50 лет (самые ранние сведения датируются 1967 г.), но изначально эта идея не получила развития из-за опасений, связанных с их высокой токсичностью [10, 20]. В настоящее время новое направление – применение сердечных гликозидов в онкологии – активно развивается [10, 21].

*Новые направления использования сердечных
гликозидов в медицинской практике*

В 1979 г. обратили внимание на то, что растения рода *Digitalis* оказывают лечебное действие при раке груди у женщин, но потребовалось почти 15 лет, прежде чем выяснили, что сердечные гликозиды могут быть использованы в онкотерапии в тех же малых дозах, что и в кардиологии. С тех пор был проведен ряд экспериментов по изучению их антипролиферативного действия на разные линии раковых клеток [10, 22–26].

Сейчас известно, что сердечные гликозиды оказывают альтернативное действие на нормальные и раковые клетки. При низких концентрациях в незлокачественных клетках они стимулируют пролиферацию и предотвращают апоптоз [10, 17, 27]. Подобные цитопротекторные свойства могут быть полезны при лечении нейродегенеративных заболеваний и больных с ишемическим инсультом [17, 28]. С другой стороны, сердечные гликозиды избирательно индуцируют гибель раковых клеток, а также повышают их чувствительность к облучению, что усиливает терапевтический потенциал данных соединений. Таким образом, открывается возможность увеличения эффективности лечения онкологических больных с помощью сочетания облучения с приемом карденолидов и буфадиенолидов [10, 29, 30]. В США запатентованы два препарата – Anvirzel (водный экстракт из *Nerium oleander* L., который содержит олеандрин и другие сердечные гликозиды) и PBI-05204 (CO_2 -экстракт из *N. oleander*), которые с успехом прошли клинические испытания и разрешены к применению в качестве противоопухолевых средств [31–33].



- $R_1 = R_2 = R_3 = H$: Дигитоксигенин
 $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OH$: Гитоксигенин
 $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$: Дигоксигенин
 $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = OH$: Дигинатигенин
 $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = OCHO$: Гиталоксигенин

Рис. 3. Агликоны карденолидов *Digitalis* spp. [13].

В настоящее время отмечен также противовирусный эффект сердечных гликозидов в отношении вирусов герпеса (HSV-1, HSV-2), цитомегаловируса (HCMV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) [34–36]. Также сообщалось о потенциальном применении этих соединений для лечения муковисцидоза. Глубокое воспаление легких при данном заболевании в основном связано с перепроизводством интерлейкина-8. Показано, что дигитоксин в наномолярных концентрациях способен подавлять гиперсекрецию интерлейкина-8 в клетках эпителия легких [37].

Указанные биологические активности растительных сердечных гликозидов подчеркивают их потенциальный мультитерапевтический эффект. При этом следует отметить, что эндогенные соединения этого типа в организме человека участвуют в формировании многочисленных патологических состояний, таких как гипертоническая болезнь, почечная и сердечная недостаточность и др. [16].

РАСТЕНИЯ-ПРОДУЦЕНТЫ СЕРДЕЧНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Обладая разнообразием химических форм, сердечные гликозиды распространены по различным ботаническим семействам покрытосеменных растений (порядка 20), таким как *Apocynaceae* (роды *Adenium*, *Acokanthera*, *Strophanthus*, *Apocynum*, *Cerbera*, *Thevetia*, *Nerium*, *Carissa*, *Urechites*, *Gomphocarpus*, *Calotropis*, *Pachycarpus*, *Asclepias*, *Xyris*, *Smalobium*, *Cryptostegia*, *Periploca*), *Asparagaceae* (роды *Bowiea* и *Rohdea*), *Asteraceae* (род *Saussurea*), *Brassicaceae* (роды *Erysimum* и *Cheiranthus*), *Celastraceae* (роды *Euonymus* и *Lophopetalum*), *Combretaceae* (род *Terminalia*), *Crassulaceae* (род *Kalanchoe*), *Convallariaceae* (род *Convallaria*), *Euphorbiaceae* (роды *Mallotus* и *Trewia*), *Fabaceae* (роды *Coronilla* и *Securigera*), *Hyacinthaceae* (роды *Urginea* и *Ornithogalum*), *Iridaceae* (роды *Homeria* и *Moraea*), *Moraceae* (роды *Antiaris*, *Antiaropsis*, *Naucleopsis*, *Maquira*), *Malvaceae* (роды *Corchorus* и *Reevesia*),

Melanthaceae (роды *Bersama* и *Melianthus*), *Plantaginaceae* и *Scrophulariaceae* (род *Digitalis*), *Ranunculaceae* (роды *Adonis* и *Helleborus*), *Solanaceae* (род *Nierembergia*), *Santalaceae* (род *Thesium*) [7, 10, 15]. Многие виды растений-производителей этих соединений произрастают в тропических регионах и в прошлом использовались жителями Африки, Азии и Южной Америки для приготовления ядов для стрел. В целом карденолиды и буфадиенолиды являются мощной химической защитой растений от различных животных [10, 15].

Род *Digitalis* (наперстянка) хорошо известен в медицине, начиная с XVIII века, благодаря наличию в этих растениях большого спектра (более 100 структур) карденолидов. Сердечные гликозиды наперстянки можно сгруппировать по агликонам — производные дигитоксигенина, дигоксигенина, гитоксигенина, гиталоксигенина, дигинатигенина, олеандригенина, узаригенина, ксисмалогенина и канаригенина (рис. 3). Они все имеют 14β-гидроксильную группу, метильный заместитель в положении C-10 и большинство 5β-конфигурацию [12]. Предполагается, что 5β-карденолиды образуются через прогестерон, который был обнаружен у высших растений в 2010 г. [38]. В положении 3β к агликону присоединены сахара, содержащие до пяти углеводных единиц, которые могут состоять из глюкозы, рамнозы и различных редких дезокси-сахаров, 2,6-дидезоксигексоз (дигитоксоза) и 6-дезокси-3-метоксисахаров (цимароза, дигиталоза). Наиболее известными соединениями *Digitalis* spp., применяемыми в медицинской практике, считаются дигоксин и дигитоксин (рис. 4) [12].

Семейство *Apocynaceae* имеет максимальное количество родов (около 55) растений-производителей карденолидов. Сюда входят рода *Strophanthus*, *Apocynum*, *Cerbera*, *Thevetia*, *Nerium* и др. Довольно часто в это семейство включают подсемейство *Asclepiadoideae*, которое в ряде случаев рассматривают как отдельное семейство. К семейству *Asclepiadaceae* относят роды *Gomphocarpus*, *Calotropis*, *Asclepias*, *Cryptostegia*, *Periploca*, *Pergularia* и др. [7, 10].

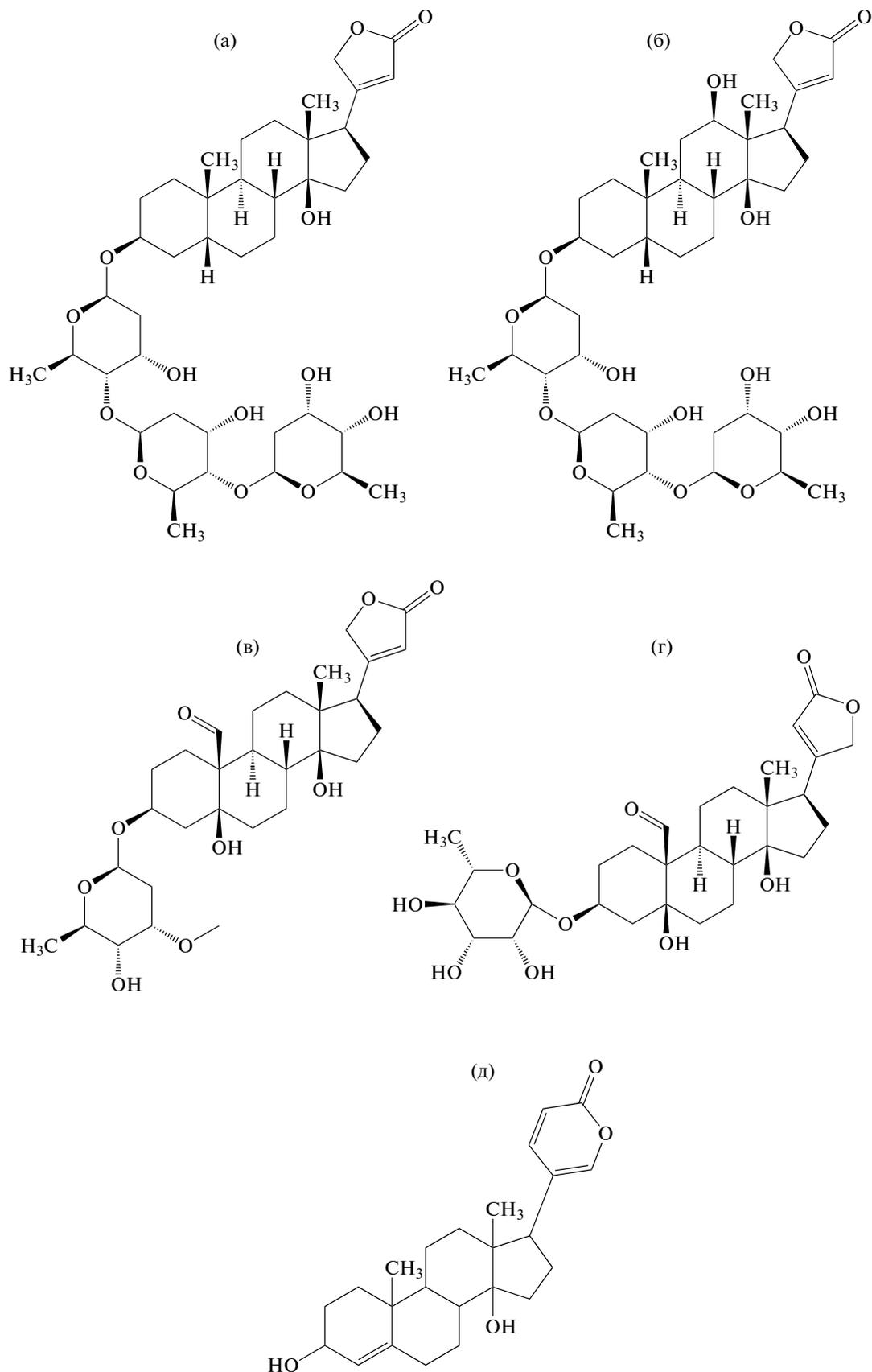


Рис. 4. Химические структуры некоторых наиболее известных сердечных гликозидов [7, 10]: а – дигитоксин, б – ди-гтоксин, в – К-строфантин, г – конваллятоксин, д – сцилларенин – агликон сцилларена А.

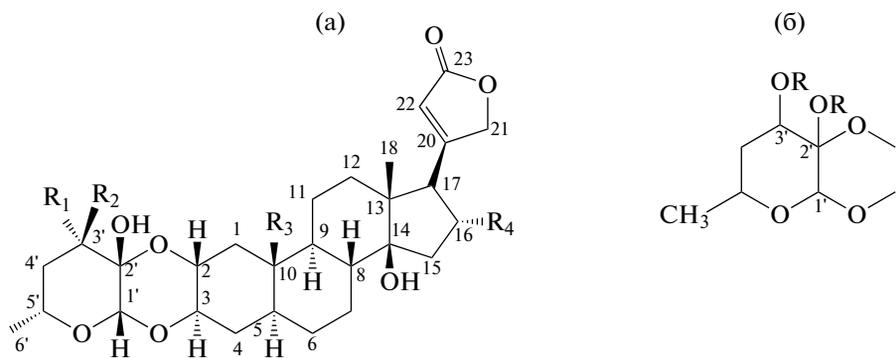


Рис. 5. Химическая структура двусвязанных карденолидов (а) и 4,6-дидезоксигексосулозного фрагмента (б) [43].

Растения рода *Strophanthus* (строфант) являются довольно известным продуцентом сердечных гликозидов, применяемых в кардиологической практике. Очищенные кардиогликозиды из семян *S. kombe* Oliv. используются в качестве инъекционного раствора под названием строфантин-К для лечения сердечной недостаточности, также существует препарат строфантин-Г (убаин) из семян *S. gratus* Baill [39, 40]. В отличие от липофильных карденолидов *Digitalis* spp. сердечные гликозиды *Strophanthus* spp. являются гидрофильными и обычно используются как препараты для внутривенного введения. Основными соединениями *Strophanthus* spp. считаются К-строфантозид, К-строфантин, убаин и цимарин (рис. 4). Стоит отметить, что убаин также является главным сердечным гликозидом африканского растения *Acokanthera schimperi* (A.DC.) Schweinf [40].

Nerium oleander L. (олеандр обыкновенный) является источником противоопухолевых препаратов Anvirzel и PBI-05204, основным компонентом которых считается карденолид олеандрин [31, 33]. Олеандр — это одно из самых ядовитых растений, практически все его части токсичны, благодаря наличию в них сердечных гликозидов. Основными соединениями *N. oleander* являются олеандрин, олеандригенин и одорозид [41].

Растения *Thevetia* spp. производят ряд биологически активных веществ, относящихся к сердечным гликозидам, таких как нерифолин, теветоксин, перувозид и теветин А и В [40]. Особенно интересным соединением считается перувозид, так как он используется в Европе как заменитель дигоксина при аллергических реакциях у пациентов. Стоит отметить, что концентрация в растении этих веществ достаточно низкая, поэтому выделение является сложной и дорогостоящей процедурой [42].

Важной особенностью растений семейства *Asclepiadaceae* является то, что они производят карденолиды, которые устойчивы к кислотному гидролизу [40, 43]. Данные свойства объясняются

двойным прикреплением углеводной группы через ацетальные и гемиацетальные связи в положениях 3β и 2α соответственно к карденолидному агликону. Структура сахара основана на 4,6-дидезоксигексосулозе (рис. 5) (впервые предложена для гомфозиды из *Asclepias fruticosa* L.) и показано, что она присутствует в калактине, калотропине, процерозиде, сириобиозиде, десглюкоксириозиде и эриокарпине [43]. Тот же углевод, но в измененной форме, встречается также в ушаридине, калотоксине, ушарине, ворушарине, сириозиде, асклепине, и ряде других карденолидов [44]. Подобные специфические (маркерные) соединения активно продуцируют растения из родов *Asclepias*, *Calotropis*, *Gomphocarpus*, *Pergularia*. Помимо специфических двусвязанных сердечных гликозидов в растениях семейства *Asclepiadaceae* содержатся также стандартные соединения с одинарным прикреплением углеводной группы [40, 45].

Сердечные гликозиды *Convallaria majalis* L. (семейство *Convallariaceae*) широко используются в клинической кардиологической практике (инъекционные препараты коргликард и коргликон). Основными карденолидами являются конваллятоксин, конваллязид и конваллятоксол, которые по свойствам близки к гликозидам *Strophanthus* spp. (рис. 4) [8, 40].

Буфадиинолиды менее широко распространены в растениях по сравнению с карденолидами. Наиболее известные продуценты этой группы соединений встречаются в семействах *Asteraceae*, *Crossulaceae*, *Hyacinthaceae*, *Ranunculaceae* [15].

Большая часть буфадиинолидов была выделена из видов рода *Urginea* (семейство *Hyacinthaceae*) [15]. Например, *Urginea maritima* (L.) Baker. распространена на побережье Средиземного моря и используется в медицине с давних времен из-за ее мощного эффекта, подобного растениям рода *Digitalis* [40]. К основным соединениям, встречающимся в растениях *Urginea* spp., можно отнести сцилларен, сциллирозид, сциллиглаузид, просцилларидин, дезацетилсциллирозидин и сцилли-

розилин, которые обладают различными лекарственными, родентицидными и репеллентными свойствами (рис. 4). Наиболее используемый источник этих соединений – луковицы растений [15, 40].

Значительное количество буфадиенолидов обнаружено в растениях *Kalanchoe* spp., относящихся к семейству *Crassulaceae*. В традиционной медицине виды рода *Kalanchoe* используются для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, а также в качестве иммуносупрессивных соединений [46]. Растения вида *Helleborus niger* L. (семейство *Ranunculaceae*) также содержат сердечные гликозиды буфадиенолидного типа, основным из которых является хеллебрин [47]. Стоит отметить, что из растений *Saussurea involucrata* Matsum. & Koidz. (семейство *Asteraceae*) было выделено как минимум три буфадиенолида, такие как буфоталин, теллоцинобуфагин и гамабуфоталин [48].

КАРДЕНОЛИДЫ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ РОДА *Digitalis*

Digitalis (наперстянка) – род травянистых растений семейства *Plantaginaceae*, включающий в себя более 20 видов, многие из них являются редкими и исчезающими, а также эндемичными для Средиземноморского региона, Турции, Греции и Кавказа. Растения наперстянки широко распространены по различным географическим зонам и встречаются на Балканах, в России, Венгрии, Италии, Германии, Испании, Румынии, Турции, Японии, Индии и США. Это наиболее известный продуцент карденолидов для медицины, данные соединения присутствуют во всех видах *Digitalis* spp., кроме *D. sceptrum* (L.f.) Loudon [11, 12]. Основным местом биосинтеза и хранения сердечных гликозидов в растениях рода *Digitalis* являются листья, а именно мезофилл. Кроме того, сообщалось, что в клетках ткани листа *D. purpurea* L. большинство соединений этой группы локализовано в митохондриях и хлоропластах. Корни растений обычно не способны продуцировать карденолиды, хотя они их содержат. Сердечные гликозиды в наперстянках могут быть первичного (с глюкозой на конце сахарной цепи, в основном депонируются в вакуолях) и вторичного (без глюкозы) типа. Вторичные карденолиды гликозилируются в цитозоле и активно транспортируются в вакуоль, присоединенная глюкоза способна увеличивать полярность соединения, что предотвращает его пассивный перенос через клеточные мембраны. Первичные карденолиды после их синтеза либо депонируются в вакуолях, либо загружаются в ситовидные трубки и транспортируются по флоэме в органы-“накопители”, такие как корни или цветки [49]. Помимо сердечных гликозидов в наперстянках найдены дигитанолы (представляют собой C_5 – C_6 ненасыщенные C_{21} -прегнаны, некоторые из них обладают

14 β -гидроксильной функцией и боковой цепью сахаров, типичными для карденолидов), стероидные гликозиды, антрахиноны, фенилэтаноиды и флавоноиды [11–13].

Многие экспериментальные работы с культурами клеток *Digitalis* spp. оказались не слишком успешными в отношении получения значительного количества карденолидов [11, 50]. В каллусных культурах клеток наперстянок дигитоксин и дигоксин в первом цикле выращивания чаще всего не детектировались. Однако в ряде случаев содержание этих веществ в начале культивирования (сразу после получения культуры клеток) могло быть выше, чем в проростках интактных растений, но в процессе длительного субкультивирования клеток (более года) происходило постепенное снижение вплоть до полного исчезновения целевых соединений, что свидетельствовало об отсутствии их синтеза в дедифференцированных клетках *in vitro*. В свою очередь, увеличение содержания карденолидов в течение первого цикла выращивания культуры можно объяснить либо присутствием нескольких карденолид-продуцирующих клеток в популяции, либо их продукцией клетками экспланта, которые еще остаются в дифференцированном состоянии на ранней стадии формирования культуры клеток [51].

Влияние степени дифференцировки клеток на образование карденолидов

Связь между клеточной и морфологической дифференцировкой и формированием сердечных гликозидов была подтверждена результатами целого ряда исследований с различными видами культур *in vitro* наперстянок [11, 50]. Фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток *Digitalis* spp. (*D. purpurea* L., *D. lanata* Ehrh., *D. cariensis* Boiss. ex Jaub. et Spach, *D. mertonensis* Buxt. and Darl., *D. grandiflora* Mill., *D. lutea* L.) показал, что содержание карденолидов там было крайне низким (около 0.5–2.0 нг/мг сухого веса), но при формировании дифференцированных микроглобул, эмбриоидов и проростков оно могло значительно увеличиваться (до 80–100 нг/мг сухого веса). При этом индукция корневых культур *in vitro* была менее эффективна для получения сердечных гликозидов [52].

С использованием каллусной культуры растений рода *Digitalis* с эмбриогенными структурами также была выявлена положительная корреляция между дифференцировкой и синтезом карденолидов [53, 54]. Из эмбриогенных клеточных культур *D. lanata* были изолированы и идентифицированы 5 сердечных гликозидов, таких как одорозид Н, одоробозид G, глюкодигифукозид, веродоксин и строспезид. Однако ни один из стандартных карденолидов взрослого растения, например, ланатозид А и С или дигоксин, в них не были обнаруже-

ны. Спектр сердечных гликозидов в эмбрионных культурах клеток скорее похож на то, что встречается в проростках или молодых растениях наперстянки, поэтому подобная система может быть интересна для исследования биохимических механизмов индукции или подавления биосинтеза этой группы вторичных метаболитов [55].

При изучении влияния света и фитогормонов на формирование дигитоксина в культуре клеток *D. purpurea* было отмечено, что его содержание в недифференцированных зеленых клетках было значительно ниже, чем у зеленой культуры побегов и примерно таким же, как у недифференцированных неокрашенных клеток, растущих в темноте [56]. Однако при культивировании с ИУК, “зеленые” клетки содержали примерно в 6 раз больше дигитоксина, чем непигментированные клетки. Кроме того, было показано, что “белые” культуры побегов без хлоропластов, выращенные в темноте, имели концентрацию соединения близкую к “зеленым” культурам побегов с развитой хлоропластной системой. Было выдвинуто предположение, что наличие хлоропластов не является определяющим признаком для синтеза сердечных гликозидов, но их формирование, очевидно, связано с дифференцировкой побегов, так как увеличение степени дифференциации приводило к наибольшей стимуляции образования дигитоксина [56].

Высокое содержание карденолидов было определено в культуре органов *in vitro*, которая имела сформированные листья, тогда как в культуре корней в большинстве случаев оно было как минимум в 2–5 раз ниже [57]. Концентрация соединений в подобных органах культурах повышалась при добавлении в питательные среды ряда предшественников синтеза (гликохолат натрия, ацетат холестерина, прогестерон) [58]. Известно также, что индукция дифференцировки у *D. purpurea* побеговых культур из каллуса приводила к образованию карденолидов *de novo*, тогда как для корневых культур подобный эффект не отмечен [59]. В целом, можно сказать, что у различных культур *in vitro* растений рода *Digitalis* способность образовывать сердечные гликозиды проявлялась в разной степени, но связь органогенеза с формированием этих соединений в наперстянках очевидна [11, 50, 56].

Использование биотрансформации для получения карденолидов

Наиболее эффективным способом получения карденолидов в культурах клеток *Digitalis* spp. оказалась биотрансформация натуральных и полусинтетических субстратов, таких как дигитоксин и β -метилдигитоксин. Значительное количество работ в этой области было проведено на суспензионных культурах клеток *D. lanata* Ehrh. Наибо-

лее ценными соединениями для медицины являются дигоксин и его производные, поэтому основные исследования были направлены на получение данных веществ. Дигоксин отличается от дигитоксина только дополнительной гидроксильной группой в положении С-12. Оказалось, что суспензионные культуры клеток *D. lanata* способны вполне успешно осуществлять реакцию 12 β -гидроксилирования, что позволило получить деацетилланатозид С из дигитоксина и β -метилдигоксин из β -метилдигитоксина. В ходе исследований была разработана система промышленного культивирования суспензионной культуры клеток *D. lanata* с использованием биореакторов объемами от 20 до 300 л. Однако, несмотря на полученные положительные результаты, в настоящее время в доступной литературе нет публикаций о применении подобного подхода для масштабного получения сердечных гликозидов. При этом представленные работы свидетельствуют о том, что основные ферментативные системы биосинтеза карденолидов активно функционируют в клетках *in vitro* наперстянок, но очевидно для их работы требуется соблюдение конкретных условий и/или наличие в среде определенных субстратов [60–62].

Оптимизация синтеза сердечных гликозидов в культурах клеток

Начиная с 80-х годов XX века, был выполнен целый ряд работ по оптимизации синтеза сердечных гликозидов в культурах клеток разных видов наперстянки. Содержание дигитоксина увеличивалось в каллусных культурах *D. purpurea*, которые выращивали в присутствии ИУК и фенобарбитала, способного повышать ферментативную активность цитохрома P450, участвующего в синтезе прегненолона и локализованного в митохондриях. Было отмечено, что присутствие ИУК стимулировало увеличение объемной фракции митохондрий и пластид (хлоропластов), тогда как при добавлении фенобарбитала повышалось только объемное соотношение митохондрий, а объемная фракция пластид снижалась. Так как при данных ультраструктурных изменениях в клетках возрастало содержание дигитоксина, это дало основание предполагать, что развитие митохондриальной системы клетки является положительным фактором для биосинтеза карденолидов [63].

На суспензионной культуре *D. lanata* было изучено влияние гиббереллинов, а именно гиббереллиновой кислоты GA₃, на формирование сердечных гликозидов. В исследовании было отмечено, что GA₃ стимулировала накопление карденолидов в темноте в культурах *in vitro*, имеющих определенную степень дифференциации (органогенез – развитие побегово-листных и корневых культур) [64].

К увеличению содержания сердечных гликозидов в каллусной культуре клеток *D. trojana* Ivanina в отсутствие дифференцировки приводила предварительная обработка салициловой кислотой с последующим использованием высоких температур в качестве стрессового фактора [65].

В ряде работ сообщалось, что исключение CaCl_2 из культуральной среды индуцировало заметное повышение продукции карденолидов в каллусных и суспензионных культурах *Digitalis* spp. [66–69]. Исходя из этого появилось предположение, что накопление сердечных гликозидов может зависеть от уровня внеклеточного кальция. Для подтверждения этой гипотезы были использованы LaCl_3 (ингибитор кальциевых каналов) и EGTA — хелатор ионов кальция. После инкубации суспензионной культуры клеток *D. thapsi* L. с LaCl_3 или EGTA отмечалось усиление синтеза дигитоксина и он был сопоставим с культурой клеток, выращенной на питательной среде без ионов кальция [68]. Связаны ли данные эффекты именно с изменением уровня внеклеточного кальция или здесь работают исключительно стресс-индуцируемые механизмы защиты и адаптации — пока ответить сложно, но более вероятным в этом случае представляется второй вариант.

Для каллусных культур эндемичных видов наперстянок Турции (*D. davisiana* Heywood, *D. lamarkii* Ivanina, *D. trojana* Ivanina, *D. cariensis* Boiss. ex Jaub. et Spach) при удалении из сред солей кальция и магния также наблюдалось увеличение накопления карденолидов [69]. В некоторых работах было показано, что повышение содержания MnSO_4 в среде культивирования стимулировало образование целевых соединений в культурах клеток [66, 70]. В одной из работ [66] было даже описано применение LiCl для увеличения накопления карденолидов в суспензионной культуре клеток *D. thapsi*. Стоит отметить, что в питательных средах для культивирования клеток и органов растений литий не применяют, так как он не является эссенциальным элементом для растительного организма, но в литературе есть сведения, что в естественных условиях *D. thapsi* растет на почвах с повышенным содержанием этого металла, и он был обнаружен в листьях растения. При добавлении LiCl в культуральную среду суспензионной культуры *D. thapsi* был обнаружен стимулирующий эффект на производство карденолидов, при этом не отмечено ухудшения ростовых характеристик культуры [66].

Суммируя полученные различными группами исследователей данные о влиянии изменения состава питательных сред на синтез сердечных гликозидов в культурах клеток наперстянок, можно сказать, что в некоторых случаях этот подход приводил к увеличению образования целевых соединений, но определенных закономерностей в выборе

эффективных факторов установить не удалось. Вероятно, при наличии в культуре клеток хотя бы незначительных количеств карденолидов, их накопление можно повысить, модифицируя состав питательных сред, при этом данных о том, насколько длительно может сохраняться этот эффект, практически нет. Кроме того, до настоящего времени остается открытым вопрос — возможно ли такими способами индуцировать синтез карденолидов при изначальном отсутствии в растительных клетках *in vitro* детектируемых количеств этой группы вторичных метаболитов.

В ряде исследований на фоне изменения минерального состава сред отмечена активация образования и накопления пероксида водорода (H_2O_2), при которой наблюдалось изменение окислительно-восстановительного состояния клеток, что в свою очередь, также стимулировало синтез сердечных гликозидов. АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул при индукции различных защитных механизмов у растений, в том числе влиять на производство вторичных метаболитов. Показано, что при добавлении H_2O_2 в культуральную среду каллусных и суспензионных культур клеток *Digitalis* spp. через 6–24 ч инкубации наблюдалось увеличение накопления карденолидов, что свидетельствует о функционировании стресс-индуцированных механизмов запуска вторичного метаболизма [68, 71].

Для интенсификации синтеза сердечных гликозидов в каллусной культуре клеток *D. purpurea* использовали воздействие УФ-облучением. В работе было отмечено, что УФ-облучение ускоряло процессы роста и повышало тканевую дифференцировку каллусной культуры. Максимальное содержание дигитоксина было обнаружено в клеточной линии, полученной после 1 ч воздействия ультрафиолета, и этот показатель оказался выше в 3.5 раза, чем концентрация данного соединения в интактном растении [9].

Другие группы вторичных метаболитов в культурах клеток Digitalis spp.

В большинстве работ с культурами клеток и органов *Digitalis* spp. исследователи акцентировали свое внимание на обнаружении исключительно сердечных гликозидов и не пытались провести анализ соединений различных структурных классов [11]. Однако в литературе есть ряд сведений о наличии в дедифференцированных растительных клетках *in vitro Digitalis* spp. фенольных соединений и некоторых групп стероидов. В каллусных культурах клеток *D. lanata* и *D. purpurea* были обнаружены прогестерон, изофукостерин, 24-метилениклоартенол, стероидные гликозиды (производные гитогенина и тигогенина), антрахиноны и фенилэтанойды [50, 72–74].

В настоящее время культуры клеток разных видов рода *Digitalis* можно считать модельным объектом для изучения синтеза и накопления сердечных гликозидов.

КАРДЕНОЛИДЫ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЕЙСТВ

Существует целый ряд растений, имеющих медицинскую ценность, культуры клеток которых исследовали на содержание карденолидов. При этом полученные на них результаты довольно схожи с теми, которые были отмечены при работе с культурами клеток *Digitalis* spp.

Имеются сообщения [75–78] о получении каллусных и суспензионных культур клеток разных видов *Strophanthus* spp. (строфант, семейство *Apocynaceae*), но сердечных гликозидов там обнаружено не было. В связи с полным отсутствием в этих культурах клеток целевых соединений, они были использованы для изучения процессов биотрансформации дигитоксигенина. Было отмечено, что суспензионные культуры клеток разных видов строфанта способны к гидроксильрованию, эпимеризации, изомеризации и гликозилированию, но они не продуцируют соединения при отсутствии в среде определенного субстрата [75–78].

На суспензионной культуре клеток *Nerium oleander* L. (олеандр обыкновенный, семейство *Apocynaceae*), как в случае с культурами клеток растений *Digitalis* spp. и *Strophanthus* spp., также активно исследовали процессы биотрансформации сердечных гликозидов. Была продемонстрирована способность клеток *in vitro* к окислению, изомеризации и гликозилированию 5 β H-стероидных агликонов по положению C-3 [79]. Стоит отметить, что в каллусных и суспензионных культурах олеандра были обнаружены карденолиды (олеандрин, олеандригенин, одорозид), характерные для интактного растения. Увеличение накопления олеандрина в суспензионной культуре наблюдали при снижении концентрации азота и повышении количества фосфатов в питательной среде, показана также стимуляция синтеза соединения при добавлении прогестерона и холестерина, а также при использовании УФ. Содержание олеандрина в культуре клеток после различных воздействий было сопоставимо с интактным растением, где его концентрация находилась на уровне около 0.1% [80–83]. Исследователями отмечено, что экстракт каллусной культуры олеандра сохраняет видоспецифическую цитотоксическую активность, свойственную растению, что делает дедифференцированные клетки *in vitro* *N. oleander* потенциальным источником для получения ценных карденолидов [82].

В 80-х годах XX века были получены культуры клеток *Thevetia* spp. (семейство *Apocynaceae*) с целью изучения образования сердечных гликозидов в них. В каллусных культурах *T. peruviana* K.Schum., *T. neriifolia* Juss. и *T. thevetioides* Kunth. были обнаружены теветин, нерифолин, перувозид и дигитоксигенин, но их содержание на протяжении всего культивирования оставалось достаточно низким и с увеличением возраста каллуса отмечалось их полное исчезновение. При этом модификации питательных сред и добавление предшественников синтеза, таких как холестерин и прогестерон, как правило, не вызывали образования карденолидов в каллусных культурах, возраст которых был свыше шести месяцев [42, 84]. В свою очередь, для суспензионных культур клеток *T. peruviana* было показано, что даже после 2 лет культивирования сердечные гликозиды встречались во всех штаммах, однако их концентрация оставалась на крайне низком уровне [85]. При этом содержание перувозида в суспензионной культуре *T. peruviana* удавалось повысить за счет применения метилжасмоната [86]. На культурах клеток *Thevetia* spp. также исследовали процесс биотрансформации карденолидов и было показано, что они способны осуществлять реакции гликозилирования, дегликозилирования, деацетилирования и окисления субстратов [87]. Стоит отметить, что в каллусных и суспензионных культурах *T. peruviana* помимо сердечных гликозидов было отмечено присутствие фенольных (флавоноиды и лейкоантоцианидины) и тритерпеновых (олеаноловая и урсоловая кислоты) соединений [88–90].

Карденолиды были найдены в каллусных и суспензионных культурах клеток растений *Calotropis* spp. (*C. gigantea* (L.) Ait., *C. procera* Ait., семейство *Asclepiadaceae*). Полученные культуры клеток использовали для исследования влияния оптимизации питательной среды, плотности инокулюма при пересадке, значений pH и температуры на повышение накопления целевых веществ. В ряде случаев был отмечен определенный позитивный эффект на синтез соединений, но выявить конкретные закономерности и механизмы авторам не удалось [91, 92].

В 1987 г. появилось сообщение, что из листьев и культуры клеток *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult. (семейство *Asclepiadaceae*) был выделен новый карденолид – криптозин, который вызывал дозозависимую положительную инотропию. Культура клеток накапливала данное соединение, но его количество там было значительно ниже, чем в листе интактного растения [93].

Для изучения формирования сердечных гликозидов в системе *in vitro* была получена каллусная культура клеток *Pergularia tomentosa* L. (семейство *Asclepiadaceae*). Фитохимический анализ показал присутствие карденолида галакинозида в

культурах клеток листового, корневого и семенного происхождения при культивировании с использованием α -НУК [94]. Кроме того, было отмечено, что при добавлении в среду выращивания прогестерона происходило увеличение концентрации данного соединения в каллусах примерно в 2–2.5 раза.

Как возможный источник сердечных гликозидов была изучена культура клеток *Coronilla varia* L. (семейство *Fabaceae*). В исследовании показано, что идентичный листьям интактного растения комплекс соединений в культуре клеток сохранялся в течение 7 культивирований, но впоследствии синтез некоторых веществ снижался или полностью прекращался [95]. В свою очередь для суспензионной культуры *Securigera securidaca* (L.) Deg. & Dorf. (семейство *Fabaceae*) было отмечено начало формирования сердечных гликозидов только в конце 6 цикла культивирования и их содержание там было выше, чем у семян интактного растения [96].

Таким образом, можно заключить, что в ряде культур клеток были обнаружены карденолиды, но в основном их содержание оказывалось либо исходно достаточно низким, либо постепенно снижалось в процессе длительного культивирования до исчезающе малых количеств, что соответствует данным полученным при работе с культурами клеток *Digitalis* spp.

БУФАДИЕНОЛИДЫ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ОРГАНОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

По сравнению с изучением карденолидов в культурах клеток и органов высших растений, информации по формированию буфадиенолидов в системах *in vitro* крайне мало. В основном встречаются только единичные сообщения о получении культур клеток некоторых потенциальных продуцентов этих соединений.

В 70-х годах XX века был проведен эксперимент по изучению влияния экстрактов культур клеток высших растений, содержащих сердечные гликозиды, на дыхание, частоту сердечных сокращений и кровяное давление у кроликов. Было отмечено, что экстракт из культуры клеток *Urginea maritima* (L.) Baker (семейство *Hyacinthaceae*) вызывал выраженную вазодилатацию и брадикардию, которые приводили к смерти животных. В экстракте, проанализированном методом ТСХ, были обнаружены соединения, которые потенциально отнесли к сердечным гликозидам [97]. Последующие химические анализы каллусной и суспензионной культур клеток *U. maritima* не выявляли наличия в них типичных буфадиенолидов интактного растения (сцилларен А, просцилларидин А и сцилларидин А), поэтому было высказано предположение, что кардиоактивность в

этих культурах клеток может быть связана с соединениями не буфадиенолидной природы [98].

В 90-х годах XX века были исследованы три хромосомные расы (диплоиды, триплоиды и тетраплоиды) *Urginea indica* Kunth. (семейство *Hyacinthaceae*) на способность продуцировать буфадиенолиды в различных культурах *in vitro*. Исследователями было отмечено, что в каллусных и суспензионных культурах клеток всех трех генотипов не фиксировалось наличие целевых соединений, несмотря на то, что были протестированы разные регуляторы роста для их культивирования [99]. Кроме того, буфадиенолиды также не детектировались в ризогенных каллусах и на различных стадиях развития эмбриоидов. В низких количествах эти соединения были обнаружены в побеговых культурах, присутствие просцилларидина А и сцилларена А в значительных концентрациях было зафиксировано в регенерированных луковицах. Этот факт дал основание предположить, что способность накапливать целевые вещества может быть связана с дифференцировкой луковиц в интактном растении [99].

Имеется сообщение о получении каллусной культуры *Charybdis congesta* Speta (ранее *Urginea congesta* (семейство *Hyacinthaceae*)) и исследовании влияния регуляторов роста на синтез буфадиенолидов в ней. При выращивании культуры клеток на питательной среде с α -НУК и БАП содержание просцилларидина А, сцилларозида, сцилларена А и дезацетилсцилларозида было выше, чем в интактном растении, но насколько постоянно и длителен был этот эффект в работе не приведено [100].

В настоящее время показано, что некоторые химически модифицированные некардиоактивные буфадиенолиды могут вызывать гибель злокачественных клеток человека, не оказывая при этом отрицательного действия на нормальные клетки [101, 102]. Повышенный интерес к этому свойству буфадиенолидов побудил исследователей синтезировать новые соединения, которые могли бы помочь установить взаимосвязь между структурой-активностью и структурой-токсичностью [102, 103]. Стоит отметить, что некоторые новые буфадиенолиды, полученные путем биотрансформации известных соединений, показали более мощную активность против раковых клеток, чем их предшественники [102, 104, 105].

Буфоталин, телоцинобуфагин, цинобуфагин и гамабуфоталин – это цитотоксические буфадиенолиды, выделенные из *Chan'Su* (препарат на основе яда жаб *Bufo gargarizans*, применяемый в традиционной китайской медицине как кардиотонический и противоопухолевый) [102, 106]. Исследование биотрансформации цинобуфагина суспензионными культурами клеток *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (семейство *Apocynaceae*) и *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. (семейство *Campanulaceae*)

Таблица 1. Культуры клеток высших растений, продуцирующие сердечные гликозиды

Вид растения	Тип культуры клеток	Обнаруженные соединения	Литературный источник
<i>Digitalis</i> spp.	Каллус	Дигитоксин	[9, 52, 56, 63, 65, 69, 71]
	Каллус или суспензия с эмбрионными структурами	Одорозид Н, одоробиозид G, глюкодигифукозид, веродоксин, строспезид	[53–55]
	Суспензия	Дигитоксин	[52, 66–68]
<i>Nerium oleander</i>	Каллус	Олеандрин, олеандригенин, одорозид	[80, 82]
	Суспензия		[81, 83]
<i>Thevetia peruviana</i>	Суспензия	Теветин, нерифолин, перувозид, дигитоксигенин	[85, 86]
<i>Calotropis</i> spp.	Каллус	Карденолиды	[92]
	Суспензия		[91]
<i>Cryptolepis buchanaui</i>	Каллус	Криптозин	[93]
<i>Pergularia tomentosa</i>	Каллус	Галакинозид	[94]
<i>Securigera securidaca</i>	Суспензия	Карденолиды (секуридазид)	[96]
<i>Charybdis congesta</i>	Каллус	Просцилларидин А, сциллирозид, сцилларен А, дезацетилсциллирозид	[100]

привело к получению 4 и 2 новых соединений соответственно [106, 107]. В результате биотрансформации трех биоактивных буфадиенолидов – буфоталина, телоцинобуфагина и гамабуфоталина – суспензионной культурой *Saussurea involucrata* Matsum. & Koidz. (семейство *Asteraceae*) было получено 11 новых соединений, большинство из которых проявляли значительную цитотоксическую активность в отношении клеточных линий гепатомы человека и рака молочной железы [102]. Стоит сказать, что в интактных растениях *C. roseus* и *P. grandiflorum* не отмечено образования буфадиенолидов, тогда как в *S. involucrata* были найдены буфоталин, телоцинобуфагин и гамабуфоталин [48, 108, 109].

Следует отметить, что число работ по изучению образования сердечных гликозидов буфадиенолидного типа в культурах клеток и органов высших растений очень невелико и полученных в ходе исследований результатов недостаточно для выяснения определенных закономерностей их формирования. Несмотря на это, исходя из опубликованных данных, можно предполагать, что синтез этой группы соединений в дедифференцированных клетках растений имеет тенденции, схожие с образованием карденолидов в культурах клеток *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Основная масса данных литературы, касающихся изучения образования сердечных гликозидов в системе *in vitro*, получена на культурах кле-

ток и органов разных видов рода *Digitalis*. Гораздо реже встречаются сообщения, относящиеся к культурам *in vitro* других растений-продуцентов этой группы тритерпеноидов.

Образование сердечных гликозидов в каллусных и суспензионных культурах клеток в значимых количествах было показано лишь в немногих работах (табл. 1). В большинстве случаев карденолиды и буфадиенолиды в дедифференцированных клетках *in vitro* были найдены либо в следовых количествах, либо их присутствие показать не удалось. Кроме того, можно отметить тенденцию к снижению содержания сердечных гликозидов в ходе длительного (более года) выращивания культур клеток. Различные способы воздействия на растительные клетки *in vitro* (изменение состава питательных сред, добавление предшественников синтеза целевых соединений, использование различных физических и химических стрессовых факторов) могут интенсифицировать накопление сердечных гликозидов, но, как правило, с увеличением “возраста” культуры (для длительно выращиваемых культур клеток) эффективность подобных методик снижается. Многие культуры клеток способны к биотрансформации различных натуральных и полусинтетических субстратов (дигитоксин, β-метилдигитоксин), что свидетельствует о возможности адекватного функционирования ряда ферментов и систем образования сердечных гликозидов в клетках *in vitro*.

Значительно чаще формирование карденолидов и буфадиенолидов зафиксировано в культурах дифференцированных клеток (культуры мик-

сотрофных клеток, микроглобул, соматических эмбриоидов) и культурах органов растений (культуры корней, побегово-лиственные культуры, регенерированные луковицы), что может быть напрямую связано с системой локализации процессов биосинтеза и накопления вторичных метаболитов в интактных растениях. Правда, пока это подтверждено работами, проведенными лишь на нескольких видах растений родов *Digitalis* и *Urginea* и вопрос, действительно ли для активного биосинтеза сердечных гликозидов необходимы процессы дифференцировки и морфогенеза — или это особенность только нескольких родов растений — пока остается в значительной степени открытым.

В нескольких работах исследователи пытались найти в клетках *in vitro* растений-продуцентов сердечных гликозидов не только целевые соединения, но провести скрининг содержания разных групп вторичных метаболитов. Практически во всех случаях было обнаружено присутствие различных веществ специализированного обмена (в культурах клеток *Digitalis* spp. — антрахиноны, фенилэтаноиды, стероидные гликозиды; в каллусных и суспензионных культурах *Thevetia peruviana* — флавоноиды и тритерпеновые гликозиды). Это подтверждает формирующийся новый взгляд на специфику вторичного метаболизма в культурах клеток высших растений, согласно которому, в дедифференцированных клетках *in vitro* происходит активное формирование веществ вторичного обмена, но их качественный состав и количественное содержание, как правило, существенно отличаются от таковых в интактном растении.

Обнаруженные закономерности в сопоставлении с данными об образовании сердечных гликозидов в интактных растениях позволяют сделать ряд заключений о специфике формирования и физиологической роли этих соединений. В частности, о сложной пространственной и временной организации их синтеза; об отсутствии функциональной роли для дедифференцированных пролиферирующих клеток; о возможных факторах управления биосинтезом — гормональных (салицилат, метилжасмонат), сигнальных (перекись водорода, УФ, Ca^{2+}), стрессовыми воздействиями. Найденные закономерности подтверждают идею об экологических функциях сердечных гликозидов в жизнедеятельности растений.

Говоря о практическом применении карденолидов и буфадиенолидов, можно отметить появление информации об их использовании для лечения не только сердечно-сосудистых патологий, но и высокой эффективности в качестве противоопухолевых агентов, нейропротекторов и противовирусных соединений. Культуры клеток и органов растений *in vitro* в качестве экологически чистого возобновляемого растительного сырья

считаются сейчас одним из приоритетных направлений растительной биотехнологии. Исходя из анализа доступной литературы по образованию сердечных гликозидов в растительных системах *in vitro*, дедифференцированные клетки в качестве потенциальных продуцентов этой группы тритерпеноидов использовать нецелесообразно. Для биотехнологического получения карденолидов и буфадиенолидов, по-видимому, более эффективно использовать культуры дифференцированных клеток и органов растений. Однако, как было сказано выше, универсальность этого подхода для разных видов растений пока не очевидна.

Достаточно перспективным для промышленного получения сердечных гликозидов может быть использование биотрансформации, однако имеющиеся успешные примеры подобного способа, согласно доступным источникам, пока не нашли практического применения. Возможно, это обусловлено дороговизной производства биомассы культур клеток растений, и в связи с этим получение новых и ценных “биотрансформированных” соединений экономически невыгодно. Стоит отметить, что дополнительные фундаментальные исследования в этой области могли бы улучшить ситуацию с промышленным получением экологически чистых биологически активных веществ растительного происхождения.

Наконец, культуры клеток *Digitalis* spp., *Thevetia* spp. и, возможно, ряда других родов растений-продуцентов карденолидов и буфадиенолидов, могут оказаться достаточно перспективными для получения фармацевтически ценных вторичных метаболитов, не относящихся к группе сердечных гликозидов, например, стероидных и тритерпеновых гликозидов, антрахинонов, флавоноидов, фенилэтаноидов.

Подводя итог, можно отметить, что сердечные гликозиды являются одной из наиболее интересных групп тритерпеноидов, исследование которой имеет как фундаментальную, так и практическую значимость. Получить их образование в ощутимых количествах в дедифференцированных культурах клеток растений является сложной задачей — в отличие, к примеру, от близких по структуре стероидных гликозидов. Причина этого явления пока остается открытой, и для ответа на этот вопрос необходимо расширение направлений исследований — изучение культур *in vitro* разных видов растений (не только *Digitalis* spp.), анализ широкого спектра различных групп вторичных метаболитов (не только сердечных гликозидов), сопоставление имеющихся и вновь полученных результатов с физиологическими особенностями функционирования вторичного метаболизма в разнообразных системах — от дедифференцированной клетки *in vitro* до интактного растения.

Работа выполнена 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. Wink M. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites // Annu. Plant Rev. 2010. V. 40. P. 1. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch1>
2. 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. Dordrecht: Springer, 2014. P. 563. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_23
3. 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. <https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
4. Хотим Е.Н., Жигальцов А.М., Кумара А. Некоторые аспекты современной фитотерапии // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2016. Т. 3. С. 136.
5. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Гананольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15. С. 56.
6. Brahmkshatriya P.P., Brahmkshatriya P.S. Terpenes: chemistry, biological role, and therapeutic applications // Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes / Eds. Ramawat K.G., Merillon J.M. Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. P. 2665. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_120
7. Kreis W., Muller-Uri F. Biochemistry of sterols, cardiac glycosides, brassinosteroids, phytoecdysteroids and steroid saponins // Annu. Plant Rev. 2010. V. 40. P. 304. <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch6>
8. Матюшин А.И. Биохимическая фармакология сердечных гликозидов // Биохимическая фармакология / Под ред. П.В. Сергеева, Н.Л. Шимановского. Москва: ООО "Медицинское информационное агентство", 2010. С. 358.
9. Величко Н.А., Смольникова Я.В. Получение сердечных гликозидов из клеточной культуры *Digitalis purpurea* L. Красноярск: Краснояр. гос. аграр. ун-т., 2014. 98 с.
10. Krishna A.B., Manikyam H.K., Sharma V.K., Sharma N. Plant cardenolides in therapeutics // International Journal of Indigenous Medicinal Plants. 2015. V. 48. P. 1871.
11. Verma S.K., Das A.K., Cingoz G.S., Gurel E. In vitro culture of *Digitalis* L. (foxglove) and the production of cardenolides: an up-to-date review // Ind. Crops Prod. 2016. V. 94. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.031>
12. Kreis W. The foxgloves (*Digitalis*) revisited // Planta Med. 2017. V. 83. P. 962. <https://doi.org/10.1055/s-0043-111240>
13. Clemente E.S., Muller-Uri F., Nebauer S.G., Segura J., Kreis W., Arrillaga I. *Digitalis* // Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops / Ed. Kole C. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2011. P. 73. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21201-7_5
14. Kreis W., Muller-Uri F. Cardenolide aglycone formation in *Digitalis* // Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: new concepts and experimental approaches / Eds. Bach T.J., Rohmer M. New York: Springer-Verlag, 2013. P. 425. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4063-5_29
15. Steyn P.S., van Heerden F.R. Bufadienolides of plant and animal origin // Nat. Prod. Rep. 1998. V. 15. P. 397. <https://doi.org/10.1039/A815397Y>
16. Федорова О.В., Коростовцева Л.С., Шапиро Дж.И., Базров А.Я. Эндогенные кардиотонические стероиды: клинические перспективы // Артериальная гипертензия. 2008. Т. 14. С. 220. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2008-14-3-220-232>
17. Prassas I., Diamandis E.P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides // Nat. Rev. Drug Discovery. 2008. V. 7. P. 926. <https://doi.org/10.1038/nrd2682>
18. Melero C.P., Medarde M., Feliciano A.S. A short review on cardiotonic steroids and their aminoguanidine analogues // Molecules. 2000. V. 5. P. 51. <https://doi.org/10.3390/50100051>
19. Ahmed A., Pitt B., Rahimtoola S.H., Waagstein F., White M., Love T.E., Braunwald E. Effects of digoxin at low serum concentrations on mortality and hospitalization in heart failure: a propensity matched study of the DIG trial // Int. J. Cardiol. 2008. V. 123. P. 138. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.12.001>
20. Shiratori O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies // Japanese Journal of Cancer Research Gann. 1967. V. 58. P. 521.
21. Mijatovic T., Quaquebeke E.V., Delest B., Debeir O., Darro F., Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy // Biochem. Biophys. Acta. 2007. V. 1776. P. 32. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.06.002>
22. Stenkvist B., Bengtsson E., Eriksson O., Holmquist J., Nordin B., Westman-Naeser S. Cardiac glycosides and breast cancer // Lancet. 1979. V. 10. P. 563. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)90996-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(79)90996-6)
23. Ueda J.Y., Tezuka Y., Banskota A.H., Tran Q.L., Tran Q.K., Saiki I., Kadota S. Antiproliferative activity of cardenolides isolated from *Streptocaulon juvenas* // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 26. P. 1431. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1431>
24. Lopez-Lazaro M., Pastor N., Azrak S.S., Ayuso M.J., Austin C.A., Cortes F. Digitoxin inhibits the growth of

- cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients // *J. Nat. Prod.* 2005. V. 68. P. 1642. <https://doi.org/10.1021/np050226l>
25. Hallbook H., Felth J., Eriksson A., Fryknas M., Bohlin L., Larsson R., Gullbo J. *Ex vivo* activity of cardiac glycosides in acute leukaemia // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e15718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015718>
 26. Fujino T., Kuroda M., Matsuo Y., Kubo S., Tamura C., Sakamoto N., Mimaki Y., Hayakawa M. Cardenolide glycosides from the seeds of *Digitalis purpurea* exhibit carcinoma-specific cytotoxicity toward renal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma cells // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015. V. 79. P. 177. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.975183>
 27. Li J., Zelenin S., Aperia A., Aizman O. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF- κ B // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006. V. 17. P. 1848. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005080894>
 28. Wang J.K.T., Portbury S., Thomas M.B., Barney S., Ricca D.J., Morris D.L., Warner D.S., Lo D.C. Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: discovery by a brain slice-based compound screening platform // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 10461. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600930103>
 29. Verheye-Dua F.A., Bohm L. Influence of ouabain on cell inactivation by irradiation // *Strahlenther. Onkol.* 1996. V. 172. P. 156.
 30. Verheye-Dua F.A., Bohm L. Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor, ouabain accentuates irradiation damage in human tumour cell lines // *Radiat. Oncol. Invest.* 1998. V. 6. P. 109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6823\(1998\)6:3<109::AID-ROI1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6823(1998)6:3<109::AID-ROI1>3.0.CO;2-1)
 31. Pathak S., Multani A.S., Narayan S., Kumar V., Newman R.A. AnvirezolTM, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells // *Anti-Cancer Drugs*. 2000. V. 11. P. 455. <https://doi.org/10.1097/00001813-200007000-00006>
 32. Slingerland M., Cerella C., Guchelaar H.J., Diederich M., Gelderblom H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials // *Invest. New Drugs*. 2013. V. 31. P. 1087. <https://doi.org/10.1007/s10637-013-9984-1>
 33. Pan Y., Rhea P., Tan L., Cartwright C., Lee H.J., Ravoori M.K., Addington C., Gagea M., Kundra V., Kim S.J., Newman R.A., Yang P. PBI-05204, a supercritical CO₂ extract of *Nerium oleander*, inhibits growth of human pancreatic cancer via targeting the PI3K/mTOR pathway // *Invest. New Drugs*. 2015. V. 33. P. 271. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0190-6>
 34. Su C.T., Hsu J.T.A., Hsieh H.P., Lin P.H., Chen T.C., Kao C.L., Lee C.N., Chang S.Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms // *Antiviral Res.* 2008. V. 79. P. 62. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.156>
 35. Singh S., Shenoy S., Nehete P.N., Yang P., Nehete B., Fontenot D., Yang G., Newman R.A., Sastry K.J. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity // *Fitoterapia*. 2013. V. 84. P. 32. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.10.017>
 36. Cai H., Wang H.Y.L., Venkatadri R., Fu D.X., Forman M., Bajaj S.O., Li H., O'Doherty G.A., Arav-Boger R. Digitoxin analogues with improved anticytomegalovirus activity // *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. V. 5. P. 395. <https://doi.org/10.1021/ml400529q>
 37. Hanrahan J.W., Sampson H.M., Thomas D.Y. Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis // *Trends Pharmacol. Sci.* 2013. V. 34. P. 119. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.11.006>
 38. Pauli G.F., Friesen J.B., Godecke T., Farnsworth N.R., Glodny B. Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plants // *J. Nat. Prod.* 2010. V. 73. P. 338. <https://doi.org/10.1021/np9007415>
 39. Makarevich I.F., Kovalev S.V. Cardiac glycosides from *Strophanthus kombe* // *Chem. Nat. Compd.* 2006. V. 42. P. 189. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0075-9>
 40. Evans W.C., Evans D. Saponins, cardioactive drugs and other steroids // Trease and Evans' Pharmacognosy (Sixteenth Edition) / Ed. Evans W.C. Edinburgh: Saunders, 2009. P. 304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2933-2.00023-X>
 41. Kumar A., De T., Mishra A., Mishra A.K. Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity // *Pharmacogn. Rev.* 2013. V. 7. P. 131. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120512>
 42. Taha H.S., Farag S.H., Shams K.A., Abdel-Azim N.S., Seif El-Nasr M.M. *In vivo* and *in vitro* studies on *Thevetia* species growing in Egypt II. Establishment of *in vitro* tissue culture system and production of cardiac glycosides // *J. American Science*. 2011. V. 7. P. 1.
 43. Cheung H.T.A., Watson T.R., Seiber J.N., Nelson C. 7 β ,8 β -epoxycardenolide glycosides of *Asclepias eriocarpa* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1980. P. 2169. <https://doi.org/10.1039/P19800002169>
 44. Cheung H.T.A., Chiu F.C.K., Watson T.R., Wells R.J. Cardenolide glycosides of the *Asclepiadaceae*. New glycosides from *Asclepias fruticosa* and the stereochemistry of uscharin, voruscharin and calotoxin // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1983. P. 2827. <https://doi.org/10.1039/P19830002827>
 45. Abe F., Mori Y., Yamauchi T. Cardenolide glycosides from the seeds of *Asclepias curassavica* // *Chem. Pharm. Bull.* 1992. V. 40. P. 2917. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.2917>
 46. Kolodziejczyk-Czepas J., Stochmal A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use // *Phytochem. Rev.* 2017. V. 16. P. 1155. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9525-1>
 47. Yokosuka A., Inomata M., Yoshizawa Y., Iguchi T., Mimaki Y. Bufadienolides and ecysteroids from the whole plants of *Helleborus niger* and their cytotoxicity // *J. Nat. Med.* 2021. V. 75. P. 393. <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01481-6>
 48. Chik W.I., Zhu L., Fan L.L., Yi T., Zhu G.Y., Gou X.J., Tang Y.N., Xu J., Yeung W.P., Zhao Z.Z., Yu Z.L., Chen H.B. *Saussurea involucreata*: A review of the bo-

- tany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine // *J. Ethnopharmacol.* 2015. V. 172. P. 44.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.033>
49. Agrawal A.A., Petschenka G., Bingham R.A., Weber M.G., Rasmann S. Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions // *New Phytol.* 2012. V. 194. P. 28.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04049.x>
50. Rucker W. *Digitalis* spp.: *in vitro* culture, regeneration, and the production of cardenolides and other secondary products // *Medicinal and aromatic plants I. Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 4 / Ed. Bajaj Y.P.S. Heidelberg: Springer, 1988. P. 388.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-73026-9_21
51. Hagimori M., Matsumoto T., Kisaki T. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture I. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay // *Plant Cell Physiol.* 1980. V. 21. P. 1391.
<https://doi.org/10.1093/pcp/21.8.1391>
52. Nover L., Luckner M., Tewes A., Garve R., Vogel E. Cell specialization and cardiac glycoside formation in cell cultures of *Digitalis* species // *Acta Hort.* 1980. V. 96. P. 65.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1980.96.3>
53. Kuberski Ch., Scheibner H., Steup C., Dietrich B., Luckner M. Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata* // *Photochem.* 1984. V. 23. P. 1407.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80475-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80475-6)
54. Luckner M., Dietrich B. Formation of cardenolides in cell and organ cultures of *Digitalis lanata* // *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* / Eds. Neumann K.H., Barz W., Reinhard E. Heidelberg: Springer-Verlag, 1985. P. 154.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-70717-9_15
55. Seidel S., Reinhard E. Major cardenolide glycosides in embryogenic suspension cultures of *Digitalis lanata* // *Planta Med.* 1987. V. 53. P. 308.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-962722>
56. Hagimori M., Matsumoto T., Obi Y. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media // *Plant Physiol.* 1982. V. 69. P. 653.
<https://doi.org/10.1104/pp.69.3.653>
57. Lui J., Staba E. Effects of age and growth regulators on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures // *Planta Med.* 1981. V. 41. P. 90.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-971682>
58. Lui J.H., Staba E.J. Effects of precursors on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures // *Phytochem.* 1979. V. 18. P. 1913.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82701-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82701-6)
59. Hirotani M., Furuya T. Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea* // *Phytochem.* 1977. V. 16. P. 610.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)80032-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80032-0)
60. Spieler H., Alfermann A.W., Reinhard E. Biotransformation of β -methyl digitoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985. V. 23. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/BF02660109>
61. Kreis W., Reinhard E. 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. Production of deacetyllanatoside C using a two-stage culture method // *Planta Med.* 1988. V. 54. P. 143.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-962373>
62. Kreis W., Reinhard E. 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors // *J. Biotechnol.* 1992. V. 26. P. 257.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90011-w](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90011-w)
63. Bonfill M., Palazon J., Cusido R.M., Pinol M.T., Morales C. Effect of auxin and phenobarbital on the ultrastructure and digitoxin content in *Digitalis purpurea* tissue culture // *Can. J. Bot.* 1996. V. 74. P. 378.
<https://doi.org/10.1139/b96-047>
64. Ohlsson A.B., Bjork L. Effects of gibberellic acid on cardenolide accumulation by *Digitalis lanata* tissue cultures grown in light and darkness // *J. Plant Physiol.* 1988. V. 133. P. 535.
65. Cingoz G.S., Gurel E. Effects of salicylic acid on thermotolerance and cardenolide accumulation under high temperature stress in *Digitalis trojana* Ivanina // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 105. P. 145.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.023>
66. Corchete M.P., Jimenez M.A., Moran M., Cacho M., Fernandez-Tarrago J. Effect of calcium, manganese and lithium on growth and cardenolide content in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. // *Plant Cell Rep.* 1991. V. 10. P. 394.
<https://doi.org/10.1007/BF00232609>
67. Cacho M., Moran M., Fernandez-Tarrago J., Corchete P. Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. // *Plant Cell Rep.* 1995. V. 14. P. 786.
<https://doi.org/10.1007/BF00232923>
68. Paranhos A., Fernandez-Tarrago J., Corchete P. Relationship between active oxygen species and cardenolide production in cell cultures of *Digitalis thapsi*: effect of calcium restriction // *New Phytol.* 1999. V. 141. P. 51.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00317.x>
69. Sahin G., Verma S.K., Gurel E. Calcium and magnesium elimination enhances accumulation of cardenolides in callus cultures of endemic *Digitalis* species of Turkey // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 73. P. 139.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.09.007>
70. Ohlsson A.B., Berglund T. Effects of high MnSO₄ levels on cardenolide accumulation by *Digitalis lanata* tissue cultures in light and darkness // *J. Plant Physiol.* 1989. V. 135. P. 505.
71. Cingoz G.S., Verma S.K., Gurel E. Hydrogen peroxide-induced antioxidant activities and cardiotonic glycoside accumulation in callus cultures of endemic *Digitalis* species // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 82. P. 89.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.05.008>
72. Furuya T., Kojima H. 4-Hydroxydigitolitein, a new anthraquinone from callus tissue of *Digitalis lanata* //

- Phytochemistry. 1971. V. 10. P. 1607.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(71\)85033-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(71)85033-1)
73. Furuya T., Kojima H., Katsuta T. 3-methylpurpurin and other anthraquinones from callus tissue of *Digitalis lanata* // Phytochem. 1972. V. 11. P. 1073.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88455-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88455-1)
 74. Matsumoto M., Koga S., Shoyama Y., Nishioka I. Phenolic glycoside composition of leaves and callus cultures of *Digitalis purpurea* // Phytochem. 1987. V. 26. P. 3225.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82474-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82474-7)
 75. Furuya T., Kawaguchi K., Hirotani M. Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Strophanthus gratus* // Phytochem. 1988. V. 27. P. 2129.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80110-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80110-9)
 76. Kawaguchi K., Hirotani M., Furuya T. Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Strophanthus amboensis* // Phytochem. 1988. V. 27. P. 3475.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80751-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80751-9)
 77. Kawaguchi K., Hirotani M., Furuya T. Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Strophanthus intermedius* // Phytochem. 1989. V. 28. P. 1093.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80190-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80190-6)
 78. Kawaguchi K., Hirotani M., Furuya T. Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of *Strophanthus divaricatus* // Phytochem. 1991. V. 30. P. 1503.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)84197-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)84197-Z)
 79. Paper D.H., Franz G. Biotransformation of 5βH-pregnan-3βol-20-one and cardenolides in cell suspension cultures of *Nerium oleander* L. // Plant Cell Rep. 1990. V. 8. P. 651.
<https://doi.org/10.1007/BF00269985>
 80. Чмелева С.И., Бугара А.М., Омельченко А.В., Якимова О.В. Получение каллусных культур олеандра обыкновенного (*Nerium oleander* L.) и их анализ на содержание сердечных гликозидов // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия “Биология, химия”. 2009. Т. 22. С. 145.
 81. Ibrahim A., Khalifa S., Khafagi I., Youssef D., Khan I., Mesbah M. Enhancement of oleandrin production in suspension cultures of *Nerium oleander* by combined optimization of medium composition and substrate feeding // Plant Biosyst. 2009. V. 143. P. 97.
<https://doi.org/10.1080/11263500802633683>
 82. Hovhannisyann N., Mkrumyan M., Yesayan A., Aroutiounian R., Newman R.A., Grigoryan R., Sarkisyan N., Gasparyan G. Callus culture of oleander retains pharmacological activities of the plant // Nat. Prod. Indian J. 2011. V. 7. P. 137.
 83. Salama I.M., Mohamed H.M., EL-Megid A. Reflex of oleandrin production and molecular changes on the *Nerium oleander* cell suspension culture under UV-A radiation stress effect // Egypt. J. Rad. Sci. Applic. 2019. V. 32. P. 117.
<https://doi.org/10.21608/ejrsa.2019.7166.1062>
 84. Sen G., Datta P.C. Dedifferentiation and loss of thevetin in *Thevetia peruviana* callus // Planta Med. 1981. V. 41. P. 415.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-971742>
 85. Dantas-Barros A.M., Foulquier M., Cosson L., Jacquindubreuil A. Cardenolide formation in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (synonym *Thevetia nerifolia* Juss.) // Nat. Prod. Lett. 1993. V. 3. P. 37.
<https://doi.org/10.1080/10575639308043835>
 86. Zabala M.A., Angarita M., Restrepo J.M., Caicedo L.A., Perea M. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* // In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant. 2010. V. 46. P. 233.
<https://doi.org/10.1007/s11627-009-9249-z>
 87. Doller P.C., Reinhard E. Biotransformation of cardenolides. Comparative studies with cell cultures of *Thevetia nerifolia* and *Digitalis lanata* // Planta Med. 1979. V. 37. P. 277.
 88. Arias J.P., Zapata K., Rojano B., Arias M. Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2016. V. 163. P. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014>
 89. Arias J.P., Zapata K., Rojano B., Penuela M., Arias M. Cardiac glycosides, phenolic compounds and antioxidant activity from plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* // Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 2017. V. 20. P. 353.
 90. Mendoza D., Arias J.P., Cuaspud O., Arias M. Phytochemical screening of callus and cell suspensions cultures of *Thevetia peruviana* // Braz. Arch. Biol. Technol. 2020. V. 63. P. e20180735.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020180735>
 91. El-Bakry A.A., Ghazi S.M., Abdrabou H.A.A. Production of cardiac glycosides from *Calotropis procera* by cell suspension cultures // J. Appl. Sci. Res. 2011. V. 7. P. 1375.
 92. Tripathi P.K., Awasthi S., Kanojiya S., Tripathi V., Mishra D.K. Callus culture and *in vitro* biosynthesis of cardiac glycosides from *Calotropis gigantea* (L.) Ait. // In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant. 2013. V. 49. P. 455.
<https://doi.org/10.1007/s11627-012-9481-9>
 93. Venkateswara R., Rao K.S., Vaidyanathan C.S. Cryptosin — a new cardenolide in tissue culture and intact plants of *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult. // Plant Cell Rep. 1987. V. 6. P. 291.
<https://doi.org/10.1007/BF00272001>
 94. Hifnawy M.S., El-Shanawany M.A., Khalifa M.M., Youssef A.K., Bekhit M.H., Desoukey S.Y. *In vitro* and *in vivo* cultivation of *Pergularia tomentosa* for cardenolides // IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 2014. V. 9. P. 40.
<https://doi.org/10.9790/3008-09214052>
 95. Duskova J., Sovova M., Zackova P., Spurna V. Tissue culture of crownvetch (*Coronilla varia* L.) and the production of cardenolide-like substances *in vitro* // Biol. Plant. 1987. V. 29. P. 258.
<https://doi.org/10.1007/BF02892786>
 96. Tofighi Z., Ghazi saeidi N., Hadjiakhoondi A., Yassa N. Determination of cardiac glycosides and total phenols in different generations of *Securigera securidaca* sus-

- pension culture // Res. J. Pharmacogn. 2016. V. 3. P. 25.
97. Kaul B., Wells P., Staba E.J. Production of cardio-active substances by plant tissue cultures and their screening for cardiovascular activity // J. Pharm. Pharmac. 1967. V. 19. P. 760.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1967.tb08028.x>
98. Shyr S.E., Staba E.J. Examination of squill tissue cultures for bufadienolides and anthocyanins // Planta Med. 1976. V. 29. P. 86.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1097633>
99. Jha S., Sahu N.P., Mahato S.B. Callus induction, organogenesis and somatic embryogenesis in three chromosomal races of *Urginea indica* and production of bufadienolides // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 1991. V. 25. P. 85.
<https://doi.org/10.1007/BF00042178>
100. Reddy A.S., Devi P.S., Kiran S.R. *In vitro* cell culture of *Charybdis congesta* for enhanced production of secondary metabolites: proscillaridin A, scillaren A and scilliroside // Afr. J. Biotechnol. 2013. V. 12. P. 1754.
<https://doi.org/10.5897/AJB2013.12103>
101. Daniel D., Susal C., Kopp B., Opelz G., Terness P. Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives // Int. Immunopharmacol. 2003. V. 3. P. 1791.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2003.08.004>
102. Zhang X., Ye M., Dong Y., Hu H., Tao S., Yin J., Guo D. Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucreata* // Phytochem. 2011. V. 72. P. 1779.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.05.004>
103. Hilton P.J., McKinnon W., Gravett E.C., Peron J.M.R., Frampton C.M., Nicholls M.G., Lord G. Selective inhibition of the cellular sodium pump by emicymarin and 14 β anhydroxy bufadienolides // Steroids. 2010. V. 75. P. 1137.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.07.010>
104. Ye M., Qu G.Q., Guo H.Z., Guo D.A. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2004. V. 91. P. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.01.010>
105. Ye M., Han J., An D.G., Tu G.Z., Guo D.A. New cytotoxic bufadienolides from the biotransformation of resibufogenin by *Mucor polymorphosporus* // Tetrahedron. 2005. V. 61. P. 8947.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.07.012>
106. Ye M., Ning L., Zhan J., Guo H., Guo D. Biotransformation of cinobufagin by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* and *Platycodon grandiflorum* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2003. V. 22. P. 89.
[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00011-0)
107. Ye M., Dai J., Guo H., Cui Y., Guo D. Glucosylation of cinobufagin by cultured suspension cells of *Catharanthus roseus* // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. P. 8535.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02078-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02078-6)
108. Nisar A., Mamat A.S., Hatim M.I., Aslam M.S., Ahmad M.S. An updated review on *Catharanthus roseus*: phytochemical and pharmacological analysis // Indian Res. J. Pharm. Sci. 2016. V. 3. P. 631.
109. Deng Y., Ye X., Chen Y., Ren H., Xia L., Liu Y., Liu M., Liu H., Zhang H., Wang K., Zhang J., Zhang Z. Chemical characteristics of *Platycodon grandiflorum* and its mechanism in lung cancer treatment // Front. Pharmacol. 2021. V. 11. P. 609825.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.609825>

УДК 581.1

ГАЗОТРАНСМИТТЕР МОНООКСИД УГЛЕРОДА: СИНТЕЗ И ФУНКЦИИ У РАСТЕНИЙ

© 2022 г. Ю. Е. Колупаев^{a, b, *}^aИнститут растениеводства им. В. Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков, Украина^bХарьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Харьков, Украина

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

Поступила в редакцию 26.11.2021 г.

После доработки 30.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

Монооксид углерода (СО) является одной из ключевых молекул-газотрансмиттеров, задействованных в передаче разнообразных сигналов, необходимых для регуляции множества функций живых организмов. В обзоре рассматриваются особенности синтеза СО у растений, приводится краткая характеристика гемоксигеназы как основного фермента, катализирующего образование монооксида углерода. Анализируется участие СО в процессах роста и развития растений, в частности, прорастания семян, образования корней, старения. Особое внимание уделяется роли монооксида углерода в формировании адаптивных реакций на действие стрессоров различной природы. Рассмотрено участие ионов кальция, АФК и оксида азота как посредников в реализации биологических эффектов СО. Помимо этого анализируется вовлечение монооксида углерода в проявление действия других сигнальных молекул, в том числе и фитогормонов. Приводится краткая характеристика доноров СО и оценивается возможность их использования в биологических экспериментах.

Ключевые слова: газотрансмиттеры, монооксид углерода, гемоксигеназа, устойчивость, защитные реакции, сигнальные посредники, фитогормоны

DOI: 10.31857/S0015330322030071

ВВЕДЕНИЕ

Сведения о молекулах, задействованных в передаче сигналов и регуляции функций живых организмов, постоянно расширяются. В последние годы в биологии и медицине интенсивно накапливаются знания о роли газотрансмиттеров – наиболее газообразных молекул, выполняющих сигнальные функции [1, 2]. Основные характеристики газотрансмиттеров: (1) генерируются ферментативными системами, (2) проникают через клеточные мембраны, (3) не обнаружены индивидуальные рецепторы, но имеются множественные клеточные мишени и существует тесная связь с компонентами других сигнальных цепей [3]. Считается, что экзогенные газотрансмиттеры имитируют в живых организмах биологические функции эндогенных соединений.

В настоящее время газотрансмиттерами считаются газообразный водород (H_2), сероводород (H_2S), монооксид азота (NO), монооксид углерода (СО) и метан (CH_4) [2]. Из этих пяти молекул

наиболее изученными являются монооксид азота, сероводород и монооксид углерода. Однако в сигналинге растительных клеток значительный объем сведений накоплен только для NO и H_2S . В физиологии человека и животных монооксид углерода считается вторым по важности и степени изученности газотрансмиттером после NO. Его физиологические функции у млекопитающих связаны с регуляцией тонуса сосудов, противовоспалительными, антипролиферативными и антиапоптотическими эффектами [4, 5]. Физиологическая роль СО в жизни растений до сих пор изучена слабо, несмотря на то что первые упоминания о его биосинтезе у растений появились более 60 лет тому назад [6].

Эффекты NO и H_2S как сигнальных молекул связаны с регуляцией состояния и функциональной активности белков посредством посттрансляционных модификаций, которые включают в себя S-нитрозирование, нитрование по тирозину, нитрозилирование металлов и персульфидирование [7, 8]. При этом NO и H_2S могут конкурировать между собой за мишени – специфические остатки Cys. Механизмы реализации биологической активности СО существенно отличаются от

Сокращения: БВ – биливердин, СОД – супероксиддисмутаза, НО – гемоксигеназа, РТЮ – 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide.

таковых для оксида азота и сероводорода. Предполагается, что они в значительной степени обусловлены образованием координационных связей СО с металлами в активных центрах белков, в первую очередь гемсодержащих [9]. В целом же вопрос о молекулярных мишенях действия СО, связанных с проявлением им тех или иных физиологических эффектов, остается открытым. Тем не менее, к настоящему времени получены экспериментальные данные, указывающие на участие СО в регуляции функций, связанных с ростом и развитием растений [10, 11], в частности, прорастанием семян [12], образованием корней [13–15], старением листьев и плодов [16, 17], а также контролем устьичных движений [18]. Особенно интенсивно в последние годы изучается участие СО в адаптации растений к действию стресс-факторов различной природы и возможность повышения устойчивости растений с помощью доноров монооксида углерода [3, 19]. При этом, однако, представления о его функциональном взаимодействии с другими сигнальными молекулами и фитогормонами остаются весьма фрагментарными. В настоящем обзоре предпринята попытка рассмотрения места монооксида углерода в сигналинге у растений и систематизации данных о влиянии СО на некоторые физиологические процессы, в первую очередь, связанные с адаптацией к неблагоприятным факторам среды.

ОБРАЗОВАНИЕ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА У РАСТЕНИЙ

Основным ферментом, обеспечивающим синтез СО как у животных, так и у растений, считается гемоксигеназа (НО, КФ 1.14.99.3). Он катализирует стереоспецифическое превращение гема в биливердин-IX α (БВ-IX α) с высвобождением Fe²⁺ и СО [20]. Для этой реакции необходимы НАДФ·Н как источник электронов и молекулярный кислород [21]. В ходе реакции, катализируемой гемоксигеназой, образуются промежуточные продукты превращения гема – α -мезо-гидрокси-гем, вердогем и комплекс Fe-БВ-IX α [22] (рис. 1). Конечный продукт этой реакции БВ-IX α с помощью биливердинредуктазы может превращаться в билирубин, обладающий мощным антиоксидантным действием [23]. Однако это превращение типично для животных клеток. У высших растений БВ-IX α может восстанавливаться до фитохромобилина – хромофора семейства фоторецепторов фитохромов [24], которые участвуют в фотоморфогенезе [22, 25].

Гены, кодирующие гемоксигеназу, обнаружены как у высших растений, так и у красных водорослей, криптофитов и цианобактерий [20, 22, 24, 26]. Растительные гемоксигеназы представлены семейством из четырех генов. Одно подсемейство включает в себя *НО-1*-подобные гены (в том чис-

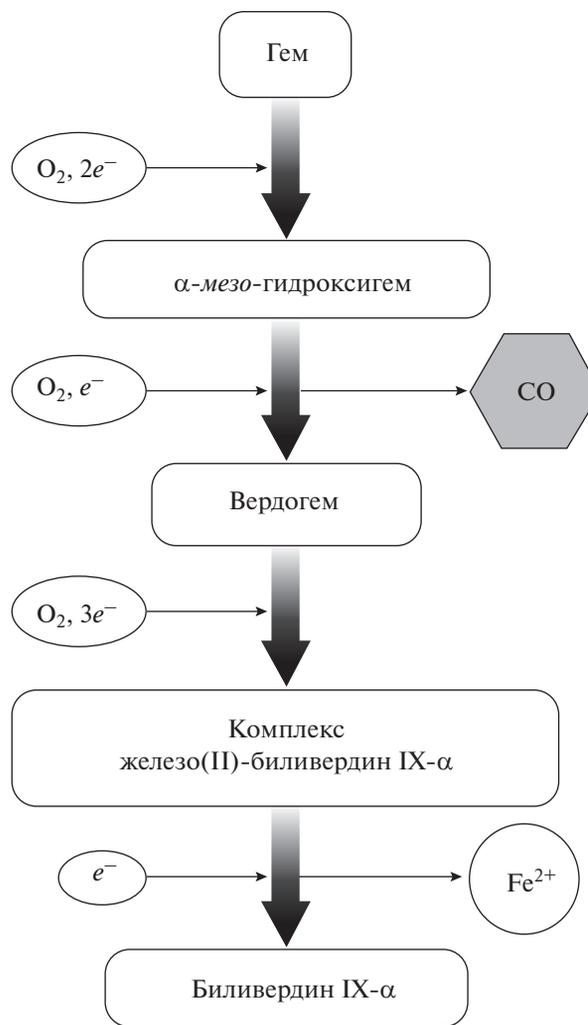


Рис. 1. Синтез СО при окислительном превращении гема. Пояснения в тексте.

ле *НО-3* и *НО-4 Arabidopsis thaliana*), другое – гены *НО-2* [25, 27]. Белок *НО-2* – единственный член подсемейства *НО2*, он не является истинной гемоксигеназой [25]. Все четыре гена семейства у *A. thaliana* транскрипционно активны [25]. Установлено, что у растений наиболее интенсивно экспрессируется *НО-1* [28]. На животных объектах показано, что *НО-1* является индуцибельной изоформой, участвующей в ответах на действие стрессоров на клеточном уровне [29]. Экспрессия гена *НО-1* у растений также может быть индуцирована действием факторов окружающей среды, в том числе осмотического стресса [30], засоления [31], тяжелых металлов [32], УФ-В [33].

В клетках растений ферментативный белок *НО-1* обнаружен в хлоропластах (преимущественно в их строме) [34] и митохондриях [20]. В частности, показана субклеточная локализация *НО-1* в митохондриях клеток листьев *Glycine max* [35].

Предполагается, что гемоксигеназа – не единственный источник монооксида углерода у растений. Так, обнаружено, что в листьях и корнях сои усиление генерации СО под влиянием засоления не коррелировало с активностью гемоксигеназы [36]. Авторы полагают, что СО может образовываться при разрушении гем-метиленовых мостиков неферментативным путем. Весьма вероятно образование СО при перекисном окислении липидов и метаболизме уреидов [36].

Пути элиминации монооксида углерода в растительных клетках остаются малоизученными. Связывание СО прочными связями с железом гемоглобинов считается одним из основных способов его инактивации [37].

УЧАСТИЕ СО В ПРОЦЕССАХ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Получены сведения об участии монооксида углерода в регуляции прорастания семян [38], образования корней [39] и формирования корневых волосков [40].

Так, показано усиление прорастания покоящихся семян гигантского лисохвоста (*Setaria faberii*) при благоприятных температурах и влажности под влиянием 1% СО [37]. В ряде работ сообщается об усилении прорастания семян с помощью СО или его доноров в неблагоприятных условиях. Например, обнаружено, что обработка семян донором СО гематином ослабляла ингибирование их прорастания и роста проростков риса в условиях солевого стресса [38] и пшеницы при действии ПЭГ 6000 [30]. Донор СО гематин также уменьшал ингибирующее действие наночастиц серебра на прорастание *Brassica nigra* [41]. Усиление прорастания семян в условиях стресса, однако, не позволяет однозначно говорить о роли СО в процессе прорастания семян, поскольку во многом может быть связано со стресс-протекторным, а не рострегулирующим действием этого газотрансмиттера.

В то же время недавние исследования показывают не только феноменологию влияния монооксида углерода на прорастание семян в нормальных условиях, но и проливают свет на его молекулярные механизмы [42]. Установлено, что обработка семян *Arabidopsis* синтетическим донором СО CORM-2 усиливала их прорастание в оптимальных условиях. Трансгенная линия *HY1-ox* с повышенным содержанием СО также отличалась усиленным прорастанием семян. В то же время у мутантов *hy1-100*, дефектных по синтезу СО, прорастание семян замедлялось. Такой же эффект вызывала обработка семян ингибитором гемоксигеназы Zn-протопорфирином-IX [42]. Авторы предложили модель, согласно которой прорастание свежесобранных семян угнетается высоким уровнем белка DOG1 (от

delay of germination), при их длительном хранении постепенно усиливается зависимый от гемоксигеназы-1 биосинтез СО. В результате сигнал СО активирует экспрессию гена *EFR12*, который кодирует белок, являющийся отрицательным регулятором экспрессии гена *DOG1* и действующий через ацетилирование гистонов. Согласно предложенной модели, прерывание покоя семян с помощью СО связано с подавлением им экспрессии *DOG1* посредством активации *ERF12* и гистондеацетилазы и снижения уровня ацетилирования гистонов в хроматине *DOG1* [42].

Описанный механизм, по-видимому, является не единственным путем влияния СО на прорастание семян. Вероятно, монооксид углерода вовлекается в реализацию действия света на прорастание семян. Активация гемоксигеназы-1 и усиление синтеза СО происходят на свету при посредничестве фитохрома В. Последующая активация монооксидом углерода гистондеацетилазы 6 приводит к угнетению экспрессии гена белка SOM, который участвует в регуляции метаболизма ключевых фитогормонов, влияющих на прорастание семян – гиббереллинов и АБК [43].

Еще одним ростовым эффектом СО является усиление образования корней. Показано феноменологически похожее на действие ИУК и оксида азота усиление роста клеток корней пшеницы под влиянием доноров СО [44, 45]. Также установлено, что СО, генерируемый гемоксигеназой, является необходимым компонентом в реализации эффектов ауксина. Увеличение количества и длины адвентивных корней под влиянием индукторов гемоксигеназы гемина и гематина обнаружено и у растений огурца [46]. В то же время под влиянием ауксина в корнях проростков огурца происходило существенное повышение активности гемоксигеназы и содержания СО [46]. Усиление образования латеральных корней, вызываемое обработкой растений метилжасмонатом, устранялось скавенджером СО гемоглобином и ингибитором гемоксигеназы Zn-протопорфирином IX, что свидетельствует о роли монооксида углерода как посредника в проявлении эффектов метилжасмоната [47].

Установлена также индукция образования корневых волосков экзогенным СО [40]. Мутант томата *ug-2* с нарушенной активностью гемоксигеназы имел недоразвитые корневые волоски, что устранялось действием экзогенного СО [40].

МОНООКСИД УГЛЕРОДА И АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ СТРЕСС-ФАКТОРОВ

Полученные к настоящему времени экспериментальные данные позволяют считать, что СО имеет не менее важное значение для адаптации

растений к действию стресс-факторов, чем более изученные сигнальные молекулы-газотрансмиттеры – NO и H₂S [48]. В ряде исследований зарегистрировано усиление экспрессии гена гемоксигеназы-1 и повышение содержания СО в ответ на действие стрессоров различной природы. Показана активация стрессорных реакций растений с помощью экзогенного СО или его доноров и снижение устойчивости в присутствии антагонистов СО.

Гипотермия. Обнаружено, что при прорастании семян бирманского винограда (*Vaccuarea ramiflora*) в условиях холода отмечалось транзитное повышение активности гемоксигеназы-1 и увеличение содержания СО [49]. В этой же работе показано, что при низких положительных температурах обработка гематином или раствором СО способствовала прорастанию семян *V. ramiflora*, усилению экспрессии генов глутатионредуктазы и аскорбатпероксидазы, повышению активности этих антиоксидантных ферментов и содержания восстановленного глутатиона [49]. Тем не менее, другие сведения об участии СО в процессах холодовой адаптации растений до сих пор отсутствуют.

Гипертермия. Показано увеличение эндогенного содержания СО в клетках табака при гипертермии [50], а также повышение их выживаемости после повреждающего прогрева при добавлении в среду донора СО гематина [51]. Установлено, что обработка проростков пшеницы донором монооксида углерода геминном повышала их выживание после потенциально летального теплового стресса [52]. При этом под влиянием донора СО происходило увеличение активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы, что способствовало сохранению целостности мембран после повреждающего прогрева.

Обезвоживание. В условиях осмотического стресса в проростках пшеницы усиливалась экспрессия гена *HO-1* и повышалось содержание СО [30], а обработка индуктором гемоксигеназы гематином способствовала прорастанию семян пшеницы в условиях засухи [30]. Под действием гематина происходило повышение активности амилазы и содержания сахаров, также отмечался рост активностей СОД, аскорбатпероксидазы и дегидроаскорбатредуктазы.

Обработка геминном или водным раствором СО усиливала развитие придаточных корней у эксплантатов огурца при засухе. Одновременно повышались активности СОД, каталазы, неспецифической пероксидазы и аскорбатпероксидазы, стабилизировался водный статус тканей и уменьшалась интенсивность окислительного стресса [53].

В некоторых работах показаны эффекты закрытия устьиц у растений при обработке индукторами гемоксигеназы, что может быть полезно при засухе. Так, выявлено закрытие устьиц у бобов при действии гематина [54]. Усиление развития боко-

вых корней растений при засухе, связанное с повышением активности гемоксигеназы и синтезом СО, также может рассматриваться как один из механизмов адаптации, который реализуется с участием СО [22].

Засоление. В корнях проростков пшеницы зафиксировано транзитное повышение активности гемоксигеназы-1 и содержания СО при действии NaCl [31, 55]. Подобный эффект обнаружен при солевом стрессе и в корнях *Brassica juncea* [56]. В корнях риса показано усиление экспрессии гена и повышение активности *HO-1* в ответ на действие высоких концентраций NaCl или NaNO₃ [57]. У проростков *Eruca sativa* под влиянием высоких концентраций хлорида натрия отмечена стимуляция экспрессии гена *HO-1* в листьях и корнях в 2.0–2.5 раза [58]. У растений сои солевой стресс также вызывал усиление генерации СО. При этом, однако, не было обнаружено прямой связи образования монооксида углерода с изменениями активности гемоксигеназы-1, что, по мнению авторов, указывает на функционирование других механизмов синтеза СО при солевом стрессе [36].

В ряде работ показано повышение солеустойчивости растений под влиянием экзогенного СО или его доноров (индукторов гемоксигеназы). Предварительная обработка водным раствором СО снижала степень повреждения корней проростков пшеницы, вызванную солевым стрессом, за счет повышения уровня пролина, обусловленного увеличением активности пирролин-5-карбоксилатсинтазы и снижением активности пролиндегидрогеназы [59]. Водный раствор СО также уменьшал ингибирование роста проростков *Cassia obtusifolia* в условиях засоления, что сопровождалось увеличением содержания свободного пролина и сахаров, повышением активности СОД, каталазы, неспецифической пероксидазы, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы [60]. Усиление прорастания семян, снижение интенсивности ПОЛ, увеличение активности антиоксидантных ферментов отмечалось и у проростков пшеницы в условиях солевого стресса при обработке гематином [61].

Обработка растений *Arabidopsis* дикого типа (Col-0) геминном уменьшала вызываемое солевым стрессом развитие водного дефицита [62]. Под влиянием донора СО также отмечалась стабилизация содержания фотосинтетических пигментов и активности антиоксидантных ферментов в условиях избыточного засоления.

Обработка экзогенным СО уменьшала проявление программируемой гибели клеток корней проростков пшеницы при действии 200 мМ NaCl [55]. Под влиянием экзогенного СО также значительно усиливалась экспрессия гена Mn-СОД и стабилизировалась общая активность СОД в условиях стресса.

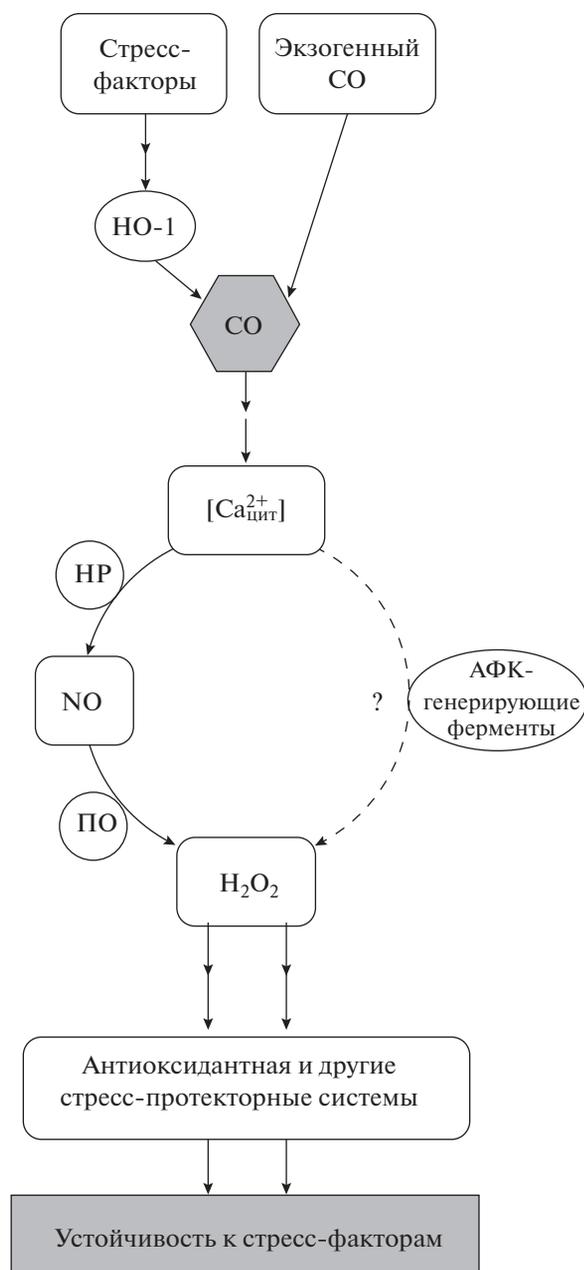


Рис. 2. Возможные связи между сигнальными посредниками при реализации стресс-протекторного действия CO на растительные клетки. HO-1 – гемоксигеназа; NR – нитратредуктаза; ПО – пероксидаза. Пояснения в тексте.

Действие тяжелых металлов и алюминия. Показана роль гемоксигеназы-1 в реакции *Chlamydomonas reinhardtii* на действие Hg^{2+} . Экспрессия гена этого фермента усиливалась в ответ на действие стрессора. При этом трансформанты, сверхэкспрессирующие ген *HO-1*, проявляли большую устойчивость к действию ионов ртути [63].

Обнаружено и защитное влияние экзогенного CO на растения, подвергнутые действию тяжелых металлов. Так, обработка проростков горчицы вод-

ным раствором CO уменьшала эффект окислительного стресса, вызываемого действием Hg^{2+} [64]. При этом у растений повышались активности аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы и каталазы, но одновременно ингибировались НАДФН-оксидаза и цитохромоксидазы, что, очевидно, предотвращало избыточную генерацию АФК и развитие окислительных повреждений.

При обработке проростков риса геминном снижалось накопление цинка и проявление его ростингибирующего действия. Подобное действие донора монооксида углерода может быть связано с угнетением им экспрессии генов транспортеров цинка (*OsZIPs*) [65]. Все указанные эффекты гемина устранялись ингибитором гемоксигеназы Zn-протопорфирином IX, что свидетельствует о специфичности его действия как индуктора гемоксигеназы.

Монооксид углерода, образующийся с участием гемоксигеназы-1, задействован в адаптации *Medicago sativa* к токсическому действию кадмия. Обработка $CdCl_2$ вызвала увеличение высвобождения CO, которое происходило одновременно с изменениями активности гемоксигеназы и содержания транскриптов гена *HO-1* [32]. Предварительная обработка растений водным раствором CO эффективно снижала окислительные повреждения мембран, вызываемые кадмием. Обработка CO также модулировала активности ферментов метаболизма глутатиона, что приводило к увеличению соотношения между содержанием его восстановленной и окисленной форм [32].

Биотические стрессы. Окуривание монооксидом углерода плодов *Zizyphus jujuba* значительно уменьшало поражение фруктов, инокулированных *Alternaria alternata*, несмотря на то что *in vitro* противогрибковая активность CO не проявлялась [66]. Обработка CO повышала активности ферментов, вовлеченных в защиту от грибных патогенов, фенолаланинаммонийлиазы, полифенолоксидазы, хитиназы и β -1,3-глюканазы. Кроме того, под влиянием экзогенного монооксида углерода происходило увеличение содержания пероксида водорода, фенольных соединений, флавоноидов и лигнина в плодах. Авторы полагают, что CO может использоваться как индуктор устойчивости к альтернариозной гнили [66].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ CO

Как уже отмечалось, при действии на растения стресс-факторов различной природы зарегистрировано усиление генерации ими CO, как правило, связанное с активацией экспрессии гена *HO-1* [30, 31, 49, 55, 63] (рис. 2). При этом, однако, вопрос о посредниках, обеспечивающих передачу сигнала, который индуцирует гемоксигеназу, до

сих пор остается неисследованным. Первичные механизмы реализации биологической активности самого СО могут быть связаны с образованием координационных связей с металлами в активных центрах белков, в первую очередь гемсодержащих [21]. Известно, что монооксид углерода проявляет способность связываться с атомом Fe гемового фрагмента гуанилатциклазы клеток животных, тем самым активируя фермент и синтез вторичного внутриклеточного мессенджера цГМФ [67]. Наличие в клетках гуанилатциклазной активности и цГМФ в последние годы было обнаружено у ряда видов растений. Однако молекулярно-генетического подтверждения существования этого фермента у растений до сих пор нет [68], и механизмы связи между монооксидом углерода и цГМФ остаются невыясненными. Более того, убедительные сведения о химическом взаимодействии СО с конкретными белками клеток растений до сих пор отсутствуют [37].

Тем не менее, получены сведения о функциональных связях СО со многими компонентами внутриклеточной сигнальной сети, в том числе с кальцием, активными формами кислорода, а также другими газотрансммиттерами (рис. 2).

Как известно, ионизированный кальций является универсальным сигнальным посредником, принимающим участие в передаче внеклеточных сигналов к внутриклеточным структурам, а также на генетический аппарат клеток [69–71]. Однако влияние СО на кальциевый гомеостаз у растений остается малоизученным. Для животных клеток имеются данные о влиянии СО на белки ионных каналов, в том числе кальциевых каналов L-типа. Механизм такого эффекта выяснен не полностью. Предполагается, что влияние СО на состояние этих ионных каналов может быть опосредованным и связанным с усилением образования АФК или NO [72].

Один из путей влияния СО на кальциевый гомеостаз может быть связан с зависимым от активности гуанилатциклазы и цГМФ повышением содержания цАМФ-рибозы. Последняя стимулирует внутриклеточные кальциевые каналы и усиливает поступление кальция в цитозоль, что приводит к активации кальцийзависимых протеинкиназ и к соответствующим физиологическим ответам [73]. Однако, в связи с отсутствием прямых доказательств существования гуанилатциклазы у высших растений, открытым остается и вопрос о роли цГМФ как возможного посредника в действии СО на кальциевый гомеостаз.

В то же время данные ингибиторного анализа указывают на участие цитозольного кальция в реализации физиологического действия монооксида углерода. Повышение теплоустойчивости проростков пшеницы донором СО геминном и усиление им генерации АФК с последующим повышением ак-

тивности антиоксидантных ферментов оказалось кальцийзависимым эффектом [74]. Хелатор внеклеточного кальция ЭГТА и ингибитор образования инозитол-1,4,5-фосфата неомидин, снижающий поступление кальция в цитозоль из внутриклеточных депо, значительно нивелировали эти эффекты. Можно полагать, что как внеклеточный, так и депонированный во внутриклеточных компартментах кальций участвуют в развитии теплоустойчивости проростков пшеницы при действии экзогенного СО.

Биологические эффекты СО нередко сравнивают с эффектами NO. Однако, как уже отмечалось, молекулярное действие этих газотрансммиттеров существенно отличается. Монооксид углерода не является свободным радикалом и не может участвовать в клеточных окислительно-восстановительных процессах непосредственно, как NO [75]. Монооксид углерода, в отличие от NO, не обладает способностью прямо взаимодействовать с тиольными группами белков, что, возможно, сужает спектр его действия. В то же время гемсодержащие белки могут быть мишенями действия как NO, так и СО. Для клеток животных эти эффекты изучены на примерах связывания NO и СО с гемоглобинами [67]. Предполагается, что в растительных клетках СО может влиять на процесс прямого ингибирования оксидом азота гемсодержащих активных центров каталазы и аскорбатпероксидазы [67]. В целом же взаимодействие NO и СО на уровне общих молекулярных мишеней у растений изучено еще очень слабо. При этом, однако, имеются сведения об участии оксида азота как посредника в реализации физиологических эффектов СО.

Установлено, что вызываемое монооксидом углерода усиление образования боковых корней у рапса зависело от синтеза NO [13]. Развитие корневых волосков под действием экзогенного СО сопровождалось повышением эндогенного содержания NO и устранялось его антагонистами [40]. Как отмечалось выше, экзогенный СО может вызывать закрытие устьиц. На примере *Vicia faba* показано, что этот эффект опосредован усилением синтеза оксида азота, поскольку он сопровождался ростом его содержания в замыкающих клетках и устранялся ингибиторами синтеза NO [76]. В то же время закрытие устьиц, вызываемое донором NO нитропруссидом натрия, не снималось ингибитором гемоксигеназы Zn-протопорфирином IX, что свидетельствует о том, что оксид азота в сигнальной цепи, регулирующей состояние устьиц, находится после СО, а не наоборот.

В условиях солевого стресса экзогенный СО усиливал генерацию NO в корнях проростков пшеницы [31]. При этом антагонисты оксида азота устраняли защитное действие СО. О возможной роли оксида азота как посредника в реализации

стресс-протекторных эффектов СО свидетельствует и снижение положительного действия гематина на проростки пшеницы, подвергнутые осмотическому стрессу, при их обработке скавенджером оксида азота РТЮ (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) [30].

Эффект повышения теплоустойчивости проростков пшеницы, вызываемый одним из индукторов гемоксигеназы гемином, по-видимому, также опосредован оксидом азота. Обработка гемином, повышающая теплоустойчивость проростков, приводила к транзиторному увеличению содержания NO и активности нитратредуктазы в корнях [77]. Подъем содержания оксида азота в корнях и повышение теплоустойчивости проростков устранялись ингибитором нитратредуктазы вольфраматом натрия, но не ингибитором NO-синтазы аминогуанидином. Активации нитратредуктазы и повышению содержания NO в корнях также препятствовала обработка корней антагонистами кальция ЭГТА и неомицином. Это свидетельствует о том, что кальций как посредник находится выше оксида азота в сигнальной цепи, активируемой СО [77]. Зависимость активности нитратредуктазы от кальциевого гомеостаза показана на различных объектах [78, 79].

Посредниками в процессах повышения теплоустойчивости растений при действии донора монооксида углерода, по-видимому, являются также и АФК. В наших экспериментах при обработке проростков пшеницы гемином отмечалось транзиторное увеличение активности внеклеточной пероксидазы и содержания пероксида водорода в корнях [52]. Эффект повышения содержания H_2O_2 не проявлялся в присутствии ингибитора пероксидазы азида натрия, но не ингибитора НАДФ-Н-оксидазы имидазола. В связи с этим есть основания полагать, что одним из основных ферментативных источников АФК, активируемых обработкой проростков донором СО, является внеклеточная пероксидаза. Максимальное повышение ее активности предшествовало максимуму содержания пероксида водорода в корнях [74]. Эти результаты согласуются с другим эффектом, изученным в работе Хуан с соавт. [44]. В ней показано устранение вызываемой гематином активации роста корней проростков пшеницы при их обработке не только скавенджером пероксида водорода иодидом калия, но и ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой.

Известно, что пероксидаза при наличии достаточного пула восстановителей обладает способностью непосредственно генерировать пероксид водорода, а не только супероксидный анион-радикал, превращающийся затем в H_2O_2 [80, 81]. Активацию именно такого механизма образования пероксида водорода можно считать вероятной при обработке корней проростков пшеницы

гемином, поскольку она вызывала значительное увеличение содержания пероксида водорода в корнях при слабом повышении генерации супероксидного анион-радикала [74].

Усиление образования АФК в клетках корней проростков пшеницы при их обработке гемином, также как и усиление генерации NO (см. выше), оказалось процессом, зависимым от кальциевого гомеостаза: ЭГТА полностью, а неомицин частично нивелировали повышение содержания пероксида водорода в корнях проростков, происходящее под влиянием донора СО [74]. Также оба антагониста кальция устраняли эффект повышения активности внеклеточной пероксидазы, вызываемый обработкой проростков гемином [74].

Таким образом, есть основания полагать, что повышение теплоустойчивости растений при действии экзогенного СО включает в себя функциональное взаимодействие Ca^{2+} , NO и АФК как сигнальных посредников (рис. 2). Вероятно, наиболее ранним эффектом является повышение под влиянием СО содержания внутриклеточного кальция; изменения кальциевого гомеостаза могут приводить к зависимому от нитратредуктазы повышению содержания NO, который в сигнальной цепи, стимулируемой монооксидом углерода, находится выше пероксида водорода. Обнаружено более быстрое образование NO в корнях пшеницы при обработке гемином по сравнению с динамикой изменения содержания H_2O_2 [52, 77]. На вероятное расположение оксида азота перед H_2O_2 в сигнальной цепи, запускаемой СО, указывают и результаты ингибиторного анализа, проведенного на той же модели — интактных корней проростков пшеницы. Предобработка скавенджером NO РТЮ и ингибитором НР вольфраматом натрия устраняла вызываемые гемином эффекты увеличения активности внеклеточной пероксидазы и содержания пероксида водорода, в то время как, антиоксидант диметилтиомочевина не влиял на вызываемое донором СО увеличение активности нитратредуктазы и содержания NO в корнях [77]. По-видимому, стимулированное донором СО повышение содержания NO вызывает последующую активацию внеклеточной пероксидазы, которая генерирует образование АФК [82, 83]. В литературе имеются данные о повышении активности различных форм пероксидазы под влиянием NO [84]. Нельзя также исключить и прямого влияния изменений кальциевого гомеостаза на процессы генерации АФК, связанные с модуляцией активности внеклеточной пероксидазы и, возможно, других ферментов (рис. 2).

По-видимому, повышение содержания АФК, вызываемое экзогенным гемином, может быть причиной увеличения активности антиоксидантных ферментов и, возможно, активации других стресс-протекторных механизмов у растений. Так, пока-

зано, что обработка проростков геминном индуцировала повышение активности СОД, каталазы и внутриклеточной пероксидазы в корнях пшеницы [52]. В целом, условием для проявления стресс-протекторных эффектов СО является активация сигнальной сети, в которой, очевидно, происходит функциональное взаимодействие между ионами кальция, АФК и NO (рис. 2). На это указывает устранение вызываемого действием донора СО повышения активности антиоксидантных ферментов и развития теплоустойчивости под влиянием антагонистов кальция, NO и АФК корнях [52, 74, 77]. Следует, однако, отметить, что указанные заключения сделаны преимущественно на основании экспериментов с одним модельным объектом – интактными корнями проростков пшеницы, на которые действовал экзогенный индуктор гемоксигеназы гемин. Нельзя исключить, что на других объектах могут проявиться иные особенности участия сигнальных посредников в реализации физиологических эффектов СО.

УЧАСТИЕ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА В ПРОЯВЛЕНИИ ЭФФЕКТОВ ДРУГИХ СИГНАЛЬНЫХ ПОСРЕДНИКОВ И ЕГО СВЯЗЬ С НЕКОТОРЫМИ ФИТОГОРМОНАМИ

В последние годы в литературе накапливаются данные о роли СО в реализации ряда физиологических эффектов других газотрансмиттеров и некоторых фитогормонов. Показано, что индуцированное обработкой водой, обогащенной газобразным водородом, образование придаточных корней у эксплантов огурца на фоне засухи, нивелировалось действием скавенджера СО гемоглобина и ингибитора синтеза монооксида углерода Zn-протопорфирина IX [53]. Это позволяет рассматривать монооксид углерода в качестве посредника действия H₂.

Малоизученный газотрансмиттер водород также может запускать защитные реакции растений на действие стресс-факторов [85]. При этом его влияние на антиоксидантную систему растений люцерны при обезвоживании было опосредовано пероксидом водорода, генерируемым НАДФ-Н-оксидазой, и монооксидом углерода, образующимся с помощью гемоксигеназы-1 [34]. На основании данных ингибиторного анализа авторы полагают, что СО как сигнальный посредник находится после H₂O₂.

Гемоксигеназа и генерируемый с ее участием СО также могут быть нижележащими компонентами сигнальной цепи, запускаемой сероводородом и усиливающей формирование адвентивных корней у растений [75]. Подобную роль СО может выполнять и при усилении корнеобразования под влиянием метана [75]. Не исключено, что мо-

ноксид углерода функционирует как посредник и в процессах повышения устойчивости растений к действию стресс-факторов экзогенным СН₄. В частности, показано, что растения люцерны, обработанные водой, обогащенной метаном, сверхэкспрессировали *НО-1* [2].

Монооксид углерода, вероятно, функционально связан и с рядом компонентов гормональной системы растений. Так, обнаружено, что закрывание устьиц у бобов под действием АБК сопровождалось повышением активности гемоксигеназы и содержания СО в замыкающих клетках [86].

Задержка старения листьев, вызываемая цитокининами, также может происходить при посредничестве гемоксигеназы-1 и СО. Установлено, что обработка отсеченных листьев пшеницы 6-БАП, задерживающая деградацию хлорофилла и повышающая активность и экспрессию генов антиоксидантных ферментов, сопровождалась активацией *НО-1*. При обработке листьев ингибитором гемоксигеназы-1 Zn-протопорфирином IX снималось положительное влияние 6-БАП [16]. Напротив, индуктор гемоксигеназы гемин частично имитировал эффекты 6-БАП. Авторы предполагают, что *НО-1* может участвовать в вызываемом цитокинином замедлении старения отделенных листьев пшеницы [16].

Монооксид углерода может быть также посредником в процессе образования латеральных корней, вызываемого метилжасмонатом. Показано, что такой эффект метилжасмоната устранялся скавенджером СО гемоглобином и ингибитором гемоксигеназы Zn-протопорфирином IX [47].

Итак, газотрансмиттеры, в том числе СО, по видимому, участвуют в трансдукции гормональных сигналов [87]. В то же время изменение содержания газотрансмиттеров может оказывать влияние на гормональный статус растений, например, на содержание жасмонатов. Повышение их количества у растений зарегистрировано под влиянием экзогенного СО [50]. Действие гипертермии на растения табака вызывало усиление синтеза СО, что, в свою очередь, усиливало образование жасмоновой кислоты. В результате этого активировался транскрипционный фактор жасмонатного сигналинга NtMYC2a, что, приводило к усилению экспрессии гена путресцин-N-метилтрансферазы *NtPMT1* и, в конечном итоге, к термoinдуцированному синтезу никотина [50].

Имеются сведения, что транскрипционный фактор JIN1/MYC2 причастен к реализации эффектов, индуцируемых не только жасмонатом, но и АБК [88] и, возможно, другими сигнальными молекулами, в том числе газотрансмиттерами [89]. Этот транс-фактор рассматривается в качестве одного из ключевых в стрессовом сигналинге, в частности, при развитии защитных реакций растений на засуху и засоление [88]. Исследова-

ние реакции на солевой стресс у растений *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и у дефектных по жасмонатному сигналингу мутантов *coi1* и *jin1* при их обработке донором СО гемином показало, что повышение солеустойчивости наблюдалось только на растениях дикого типа Col-0, но не мутантных линиях *coi1* и *jin1* [62]. У растений *A. thaliana* дикого типа, обработанных гемином, в ответ на действие хлорида натрия накапливалось большее количество пролина и сахаров по сравнению с растениями генотипов *coi1* и *jin1*. Обработка гемином также стабилизировала относительное содержание воды, активность антиоксидантных ферментов и способствовала сохранению пула фотосинтетических пигментов в стрессовых условиях только у растений Col-0. Полученные результаты позволили заключить, что компоненты жасмонатного сигналинга, в том числе белок JIN1/MYC2, могут быть вовлечены в реализацию адаптивных процессов, индуцируемых экзогенным СО [62].

ДОНОРЫ И АНТАГОНИСТЫ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

В опытах с животными доноры монооксида углерода используются с 70-х годов прошлого столетия [90]. Одним из них является гематин, известный как индуктор гемоксигеназы-1 и донор СО. Показано, что после внутривенной инфузии гематина-¹⁴C крысы продуцировали эквивалентные количества меченого билирубина и СО [91]. Еще одним донором СО с подобным механизмом действия является гемин. В целом, гематин и гемин широко применяются в исследованиях эффектов СО на животных и растениях [44, 52, 90].

Однако продукты, образующиеся в результате превращения гемоксигеназой доноров СО, также обладают определенной биологической активностью. Например, биливердин IX α имеет выраженное антиоксидантное действие [92]. В то же время ионы Fe²⁺, высвобождающиеся при разложении гема, могут способствовать неферментативному образованию АФК в клетках [93]. В связи с этим при постановке экспериментов целесообразно специальное подтверждение специфичности эффектов доноров СО. Для этого часто используется гемоглобин, связывающий СО [94]. Считается, что если в его присутствии не проявляются изучаемые эффекты доноров СО, то эти доноры действуют именно как источник СО. Однако гемоглобин может связывать не только СО, но и NO [37, 48], который, как отмечалось, может быть посредником в реализации эффектов монооксида углерода. В связи с этим однозначно интерпретировать устранение эффектов доноров СО гемоглобином вряд ли возможно.

Для доказательства отсутствия существенного эффекта на изучаемые процессы Fe²⁺, образующегося из гемсодержащих доноров СО, целесообразно оценивать влияние на используемые в экспериментах биологические объекты ионов железа в концентрации, эквивалентной концентрации используемого донора СО. Позитивным для проведения исследований является то, что в низких концентрациях эффекты железа на клеточные редокс-процессы вряд ли будут заметно проявляться. Как показали специальные опыты, соль FeSO₄ в концентрации 5 мкМ (эквивалентной концентрации гемина) не оказывала влияния на активность антиоксидантных ферментов, состояние мембран клеток корней после повреждающего прогрева проростков пшеницы и на их восстановление в оптимальных условиях [52]. Известно, что соли Fe²⁺ используются в экспериментах в качестве агентов окислительного стресса как участники неферментативных процессов образования АФК – реакций Фентона и Хабера-Вейса [95]. Однако, как показано нами ранее, FeSO₄ при обработке проростков пшеницы вызывал заметное проявление эффекта окислительного стресса в концентрации 5 мМ [96], то есть на несколько порядков превышающей ту, которая образуется из доноров СО. В связи с этим можно полагать, что доноры СО гемин и гематин, используемые в микромолярных концентрациях, вряд ли могут выступать в роли источников железа в концентрациях, которые вызывают окислительный стресс.

В настоящее время в физиологии человека и животных применяются доноры СО нового поколения семейства CORM [97, 98]. Молекулы CORM состоят из карбонильных групп, связанных с металлами, например, рутением или марганцем. После попадания таких соединений в клетки происходит медленное, обусловленное реакциями обмена лигандов, высвобождение СО, что сводит к минимуму токсические эффекты [99]. На растениях действие CORM как доноров СО пока исследовано лишь в единичных работах [42]. Например, показано, что обработка корней табака соединением CORM-2 так же, как и гипертермия, вызывала увеличение содержания в них жасмоновой кислоты и никотина [50]. В то же время необходимо учитывать, что соединения CORM способны существенно ингибировать НАДФ-Н-оксидазу [100], а также проявлять каталазную активность, не связанную с действием самого СО [101]. Не исключено, что в растительных клетках они будут проявлять и другие побочные эффекты. В связи с этим использование различных доноров СО требует проверочных экспериментов для доказательства специфичности их действия в качестве источников СО и отсутствия существенных побочных эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время имеются основания рассматривать газотрансмиттеры в качестве ключевых участников клеточного сигналинга у растений. Эти соединения находятся в тесных функциональных связях между собой, а также с такими универсальными сигнальными посредниками, как ионы кальция и АФК. Газотрансмиттеры не имеют специфических рецепторов. Их первичные эффекты, возможно, обусловлены прямым взаимодействием с определенными функциональными группами белков. Действие монооксида углерода существенно отличается от посттрансляционных модификаций, вызываемых сероводородом и оксидом азота, поскольку СО не взаимодействует с тиольными группами. Фактически его взаимодействие с белками ограничивается образованием координационных связей с металлами (в первую очередь связыванием с железом гемсодержащих белков). В связи с этим довольно широкий спектр его биологических эффектов до сих пор во многом остается загадкой. Открытым является и вопрос о посредниках, обеспечивающих передачу сигналов для индукции гемоксигеназы и синтеза СО при действии на растения внешних или внутренних факторов (например, стрессоров или гормонов).

Трансдукция сигналов СО, приводящая к модуляции экспрессии ряда генов, может происходить с участием ключевых посредников, таких как кальций, АФК и оксид азота. Однако механизмы изменения кальциевого и редокс-гомеостаза под влиянием монооксида углерода во многом непонятны. В частности, функционирование “классической” цепочки, характерной для клеток животных (СО → гуанилатциклаза → цГМФ → → АДФ-рибозилциклаза → цАДФ-рибоза → Са²⁺), в растительных клетках весьма сомнительно из-за отсутствия прямых доказательств наличия гуанилатциклазы. В то же время для животных клеток получены данные о возможности влияния СО на белки кальциевых каналов при посредничестве АФК и NO [72]. Однако у растений усиление образования других сигнальных посредников (NO, АФК) под влиянием СО может происходить вследствие изменения кальциевого гомеостаза [74, 77]. Как формируется этот предшествующий изменениям редокс-гомеостаза кальциевый сигнал, пока неясно. В целом же устранение многих физиологических эффектов СО (например, его влияния на рост корней или активации стресс-протекторных реакций растений) различными антагонистами Са²⁺ свидетельствует о роли внутриклеточного кальция как посредника в действии монооксида углерода.

Важным посредником в реализации действия СО в клетках является также пероксид водорода. По крайней мере, стресс-протекторные эффекты СО, в частности, его влияние на антиоксидантную

систему, могут быть результатом более раннего транзиторного повышения содержания АФК в клетках. В свою очередь увеличение содержания АФК может быть опосредовано влиянием СО на синтез оксида азота, связанным с повышением активности нитратредуктазы [77] (рис. 2).

Действие монооксида углерода у растений в значительной степени может быть обусловлено его вовлечением в функционирование гормональной системы. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что СО может быть посредником в реализации эффектов АБК и цитокининов. Показано участие СО в стресс-индуцируемом синтезе жасмоновой кислоты и активации жасмонатного сигналинга [50], важного для адаптации растений к действию многих стресс-факторов [102]. Обнаружено, что растения, дефектные по жасмонатному сигналингу, могут быть не чувствительны к действию экзогенного СО [62]. Механизмы вовлечения жасмоновой кислоты или отдельных компонентов жасмонатного сигналинга в реализацию физиологического действия СО пока не выяснены.

Индукция гемоксигеназы и повышение содержания монооксида углерода в клетках растений происходят под влиянием стресс-факторов различной природы, а экзогенный СО или его доноры способны повышать устойчивость растений ко многим неблагоприятным воздействиям, активируя антиоксидантную, осмопротекторную и другие защитные системы. В связи с этим, заманчивым представляется практическое применение СО или индукторов его образования для повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам, что уже отработано для более изученных газотрансмиттеров – NO и H₂S [103, 104]. Однако технические сложности применения газообразного монооксида углерода и высокая стоимость его доноров пока сдерживают прогресс в этом направлении. Кроме того, представляет интерес возможность усиления активности гемоксигеназы и синтеза растениями СО методами трансгенеза. Так или иначе, дальнейшие исследования, направленные на установление места и функций СО в сигнальной сети растительных клеток, будут способствовать пониманию новых аспектов регуляции клеточных процессов у растений и особенно механизмов их адаптации к различным стресс-факторам.

Автор благодарен к.б.н. Т. О. Ястреб за помощь в подготовке иллюстраций.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang R. Overview of gasotransmitters and the related signaling network // Gasotransmitters / Ed. Wang R.

- Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. 2018. P. 1. <https://doi.org/10.1039/9781788013000-00001>
2. Yao Y., Yang Y., Li C., Huang D., Zhang J., Wang C., Li W., Wang N., Deng Y., Liao W. Research progress on the functions of gasotransmitters in plant responses to abiotic stresses // *Plants*. 2019. V. 8. P. 605. <https://doi.org/10.3390/plants8120605>
 3. Karle S.B., Guru A., Dwivedi P., Kumar K. Insights into the role of gasotransmitters mediating salt stress responses in plants // *J. Plant Growth Regul.* 2021. V. 40. P. 2259. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10293-z>
 4. Takagi T., Uchiyama K., Naito Y. The therapeutic potential of carbon monoxide for inflammatory bowel disease // *Digestion*. 2015. V. 91. P. 13. <https://doi.org/10.1159/000368765>
 5. Motterlini R., Foresti R. Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules // *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 2017. V. 312. P. 302. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2016>
 6. Wilks S.S. Carbon monoxide in green plants // *Science*. 1959. V. 129. P. 964. <https://doi.org/10.1126/science.129.3354.964>
 7. Pandey A.K., Gautam A. Stress responsive gene regulation in relation to hydrogen sulfide in plants under abiotic stress // *Physiol. Plant*. 2020. V. 168. P. 511. <https://doi.org/10.1111/ppl.13064>
 8. Mishra V., Singh P., Tripathi D.K., Corpas F.J., Singh V.P. Nitric oxide and hydrogen sulfide: an indispensable combination for plant functioning // *Trends Plant Sci.* 2021. V. 26. P. 1270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.016>
 9. Feelisch M., Olson K.R. Embracing sulfide and CO to understand nitric oxide biology // *Nitric Oxide*. 2013. V. 35. P. 2. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.06.004>
 10. Santa-Cruz D.M., Pacienza N.A., Polizio A.H., Balestrasse K.B., Tomaro M.L., Yannarelli G.G. Nitric oxide synthase-like dependent NO production enhances heme oxygenase up-regulation in ultraviolet-B-irradiated soybean plants // *Phytochem.* 2010. V. 71. P. 1700. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.07.009>
 11. Lin Y.T., Zhang W., Qi F., Cui W.T., Xie Y.J., Shen W.B. Hydrogen-rich water regulates cucumber adventitious root development in a heme oxygenase-1/carbon monoxide-dependent manner // *J. Plant Physiol.* 2014. V. 171. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.009>
 12. Dekker J., Hargrove M. Weedy adaptation in *Setaria* spp. V. effects of gaseous environment on giant foxtail (*Setaria faberii*) (Poaceae) seed germination // *Amer. J. Bot.* 2002. V. 89. P. 410. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.3.410>
 13. Cao Z., Xuan W., Liu Z., Li X., Zhao N., Xu P., Wang Z., Guan R., Shen W. Carbon monoxide promotes lateral root formation in rapeseed // *J. Integr. Plant Biol.* 2007. V. 49. P. 1070. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2007.00482.x>
 14. Chen Y.H., Chao Y.Y., Hsu Y.Y., Hong C.Y., Kao C.H. Heme oxygenase is involved in nitric oxide- and auxin-induced lateral root formation in rice // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. P. 1085. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1228-x>
 15. Cui W.T., Qi F., Zhang Y.H., Cao H., Zhang J., Wang R., Shen W. Methane-rich water induces cucumber adventitious rooting through heme oxygenase1/carbon monoxide and Ca²⁺ pathways // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 435. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1723-3>
 16. Huang J., Han B., Xu S., Zhou M., Shen W. Heme oxygenase-1 is involved in the cytokinin-induced alleviation of senescence in detached wheat leaves during dark incubation // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 768. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.10.010>
 17. Zhang S., Li Q., Mao Y. Effect of carbon monoxide on active oxygen metabolism of postharvest Jujube // *J. Food Technol. Res.* 2014. V. 1. P. 146. <https://doi.org/10.18488/journal.58/2014.1.2/58.2.146.155>
 18. Gahir S., Bharath P., Raghavendra A.S. The role of gasotransmitters in movement of stomata: mechanisms of action and importance for plant immunity // *Biol. Plant*. 2020. V. 64. P. 623. <https://doi.org/10.32615/bp.2020.071>
 19. He H., He L.F. Regulation of gaseous signaling molecules on proline metabolism in plants // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. P. 387. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2239-4>
 20. Shekhawat G.S., Verma K. Haem oxygenase (HO): an overlooked enzyme of plant metabolism and defence // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 2255. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq074>
 21. Bilban M., Haschemi A., Wegiel B., Chin B.Y., Wagner O., Otterbein L.E. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling // *J. Mol. Med.* 2008. V. 86. P. 267. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0276-0>
 22. Verma K., Alam A. Heme oxygenase 1 (HO1): an enzyme of plant system and its role against various abiotic stresses // *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change* / Eds. Roychowdhury R., Choudhury S., Hasanuzzaman M., Srivastava S. Springer, 2020. P. 355. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45669-6_16
 23. Wang M., Liao W. Carbon monoxide as a signaling molecule in plants // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7: 572. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00572>
 24. Terry M.J., Linley P.J., Kohchi T. Making light of it: the role of plant heme oxygenases in phytochrome chromophore synthesis // *Biochem. Soc. Transact.* 2002. V. 30. P. 604.
 25. Emborg T.J., Walker J.M., Noh B., Vierstra R.D. Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 856. <https://doi.org/10.1104/pp.105.074211>
 26. Balestrasse K.B., Yannarelli G.G., Noriega G.O., Batlle A., Tomaro M.L. Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress // *Biometals*. 2008. V. 21. P. 433. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9132-0>

27. Davis S., Bhoo S.H., Durski A.M., Walker J.M., Viersta R.D. The heme oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 656.
<https://doi.org/10.1104/pp.126.2.65>
28. Matsumoto F., Obayashi T., Sasaki-Sekimoto Y., Ohta H., Takamiya K.-I., Masuda T. Gene expression profiling of the tetrapyrrole metabolic pathway in *Arabidopsis* with a mini-array system // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 2379.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.042408>
29. Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K., Bach F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme // *Trends Immunol.* 2003. V. 24. P. 449.
[https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00181-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00181-9)
30. Liu Y., Xu S., Ling T., Xu L., Shen W. Heme oxygenase/carbon monoxide system participates in regulating wheat seed germination under osmotic stress involving the nitric oxide pathway // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 1371.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.021>
31. Xie Y., Ling T., Han Y., Liu K., Zheng Q., Huang L., Yuan X., He Z., Hu B., Fang L., Shen Z., Yang Q., Shen W. Carbon monoxide enhances salt tolerance by nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis and up-regulation of antioxidant defence in wheat seedling roots // *Plant Cell Environ.* 2008. V. 31. P. 1864.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01888.x>
32. Han Y., Zhang J., Chen X., Gao Z., Xuan W., Xu S., Ding X., Shen W. Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa* // *New Phytol.* 2008. V. 177. P. 155.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02251.x>
33. Yannarelli G.G., Noriega G.O., Batlle A., Tomaro M.L. Heme oxygenase up regulation in ultraviolet-B irradiated soybean plants involves reactive oxygen species // *Planta.* 2006. V. 224. P. 1154.
<https://doi.org/10.1007/s00425-006-0297-x>
34. Muramoto T., Kohchi T., Yokota A., Hwang I., Goodman H.M. The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 335.
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.3.335>
35. Dixit S., Verma K., Shekhawat G.S. In vitro evaluation of mitochondrial-chloroplast subcellular localization of heme oxygenase1 (HO1) in *Glycine max* // *Protoplasma.* 2014. V. 251. P. 671.
<https://doi.org/10.1007/s00709-013-0569-9>
36. Zilli C.G. Santa-Cruz D.M., Balestrasse K.B. Heme oxygenase-independent endogenous production of carbon monoxide by soybean plants subjected to salt stress // *Environ. Exp. Bot.* 2014. V. 102. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.01.012>
37. Jin Q., Cui W., Xie Y., Shen W. Carbon monoxide: A ubiquitous gaseous signaling molecule in plants // *Gasotransmitters in Plants Signaling and Communication in Plants* / Eds. Lamattina L., Garcia-Mata C. Cham: Springer, 2016. P. 3.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-40713-5_1
38. Liu K., Xu S., Xuan W., Ling T., Cao Z., Huang B., Sun Y., Fang L., Liu Z., Zhao N., Shen W. Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa* // *Plant Sci.* 2007. V. 172. P. 544.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.007>
39. Guo K., Xia K., Yang Z.M. Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 3443.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern194>
40. Guo K., Kong W.W., Yang Z.M. Carbon monoxide promotes root hair development in tomato // *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32. P. 1033.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01986.x>
41. Amooaghaie R., Tabatabaei F., Ahadi A. Alterations in HO-1 expression, heme oxygenase activity and endogenous NO homeostasis modulate antioxidant responses of *Brassica nigra* against nano silver toxicity // *J. Plant Physiol.* 2018. V. 228. P. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.012>
42. He D., Deng G., Ying S., Yang W., Wei J., Li P. Carbon monoxide signal breaks primary seed dormancy by transcriptional silence of DOG1 in *Arabidopsis thaliana* // *Phyton – Int. J. Exp. Bot.* 2020. V. 89. P. 633.
<https://doi.org/10.32604/phyton.2020.010498>
43. Jia Y., Li R., Yang W., Chen Z., Hu X. Carbon monoxide signal regulates light-initiated seed germination by suppressing SOM expression // *Plant Sci.* 2018. V. 272. P. 88.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.009>
44. Xuan W., Huang L., Li M., Huang B., Xu S., Liu H., Gao Y., Shen W. Induction of growth elongation in wheat root segments by heme molecules: A regulatory role of carbon monoxide in plants? // *Plant Growth Regul.* 2007. V. 52. P. 41.
<https://doi.org/10.1007/s10725-007-9175-1>
45. Xuan W., Xu S., Yuan X., Shen W. Carbon monoxide. A novel and pivotal signal molecule in plants? // *Plant Signal. Behav.* 2008. V. 3. P. 381.
<https://doi.org/10.4161/psb.3.6.5374>
46. Xuan W., Zhu F.-Y., Xu S., Huang B.-K., Ling T.-F., Qi J.-Y., Ye M.-B., Shen W.-B. The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. P. 881.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.125567>
47. Hsu Y.Y., Chao Y.-Y., Kao C.H. Methyl jasmonate-induced lateral root formation in rice: The role of heme oxygenase and calcium // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 63.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.08.015>
48. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschastnyy S.P., Dmitriev A.P. Gasotransmitters and their role in adaptive reactions of plant cells // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. P. 392.
<https://doi.org/10.3103/S0095452719050098>
49. Bai X., Chen J., Kong X., Todd C.D., Yang Y., Hu X. Li D.Z. Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis // *Free Radical Biol. Med.* 2012. V. 53. P. 710.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.042>

50. Cheng T., Hu L., Wang P., Yang X., Peng Y., Lu Y., Chen J., Shi J. Carbon monoxide potentiates high temperature-induced nicotine biosynthesis in *Tobacco* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. e188. <https://doi.org/10.3390/ijms19010188>
51. Li Z.-G., Gu S.-P. Hydrogen sulfide as a signal molecule in hematin-induced heat tolerance of tobacco cell suspension // Biol. Plant. 2016. V. 60. P. 595. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0612-8>
52. Kolupaev Yu.E., Shkliarevskiy M.A., Karpets Yu.V., Shvidenko N.V., Lugovaya A.A. ROS-dependent induction of antioxidant system and heat resistance of wheat seedlings by hemin // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68. P. 322. <https://doi.org/10.1134/S102144372101009X>
53. Chen Y., Wang M., Hu L., Liao W., Dawuda M.M., Li C. Carbon monoxide is involved in hydrogen gas-induced adventitious root development in cucumber under simulated drought stress // Front. Plant Sci. 2017. V. 8: 128. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00128>
54. She X.P., Song X.G. Carbon monoxide-induced stomatal closure involves generation of hydrogen peroxide in *Vicia faba* guard cells // J. Integr. Plant Biol. 2008. V. 50. P. 1539. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00716.x>
55. Ling T., Zhang B., Cui W., Wu M., Lin J., Zhou W., Huang J., Shen W. Carbon monoxide mitigates salt-induced inhibition of root growth and suppresses programmed cell death in wheat primary roots by inhibiting superoxide anion overproduction // Plant Sci. 2009. V. 177. P. 331. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.004>
56. Verma K., Dixit S., Shekhawati G.S., Alam A. Antioxidant activity of heme oxygenase 1 in *Brassica juncea* (L.) Czern. (Indian mustard) under salt stress // Turk. J. Biol. 2015. V. 39. P. 540. <https://doi.org/10.3906/biy-1501-28>
57. Wei M.-Y., Chao Y.-Y., Kao C.H. NaCl-induced heme oxygenase in roots of rice seedlings is mediated through hydrogen peroxide // Plant Growth Regul. 2013. V. 69. P. 209. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9762-7>
58. Mahawar L., Shekhawati G.S. EsHO 1 mediated mitigation of NaCl induced oxidative stress and correlation between ROS, antioxidants and HO 1 in seedlings of *Eruca sativa*: underutilized oil yielding crop of arid region // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2019. V. 25. P. 895. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00663-71>
59. Yuan X.X., Wang J., Xie Y.J., Shen W.B. Effects of carbon monoxide on salt tolerance and proline content of roots in wheat seedling // Plant Physiol. Commun. 2009. V. 45. P. 567.
60. Zhang C., Li Y., Yuan F., Hu S., He P. Effects of hematin and carbon monoxide on the salinity stress responses of *Cassia obtusifolia* L. seeds and seedlings // Plant Soil. 2012. V. 359. P. 85. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1194-7>
61. Xu S., Sa Z.-S., Cao Z.-Y., Xuan W., Huang B.-K., Ling T.-F., Hu Q.-Y., Shen W.-B. Carbon monoxide alleviates wheat seed germination inhibition and counteracts lipid peroxidation mediated by salinity // J. Integr. Plant Biol. 2006. V. 48. P. 1168. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00337.x>
62. Shkliarevskiy M.A., Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P. The effect of CO donor hemin on the antioxidant and osmoprotective systems state in *Arabidopsis* of a wild-type and mutants defective in jasmonate signaling under salt stress // Ukr. Biochem. J. 2021. V. 93 (3). P. 39. <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.039>
63. Wei Y.Y., Zheng Q., Liu Z.P., Yang Z.M. Regulation of tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to heavy metal toxicity by heme oxygenase-1 and carbon monoxide // Plant Cell Physiol. 2011. V. 52. P. 1665. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr102>
64. Meng D.K., Chen J., Yang Z.M. Enhancement of tolerance of Indian mustard (*Brassica juncea*) to mercury by carbon monoxide // J. Hazardous Materials. 2011. V. 186. P. 1823. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.12.062>
65. Chen Q., Gong C., Ju X., Zhu Z., Shen W., Shen Z., Cui J. Hemin through the heme oxygenase 1/ferrous iron, carbon monoxide system involved in zinc tolerance in *Oryza sativa* L. // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 947. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9793-z>
66. Zhang S., Wang Q., Guo Y., Kang L., Yu Y. Carbon monoxide enhances the resistance of jujube fruit against postharvest *Alternaria* rot // Postharvest Biol. Technol. 2020. V. 168: 111268. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111268>
67. He H., He L. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses // Nitric Oxide. 2014. V. 42. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.08.011>
68. Baudouin E. The language of nitric oxide signaling // Plant Biology. 2011. V. 13. P. 233. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00403.x>
69. Kim M.C., Chung W.S., Yun D., Cho M.J. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants // Mol. Plant. 2009. V. 2. P. 13. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn091>
70. Bürstenbinder K., Möller B., Plötner R., Stamm G., Hause G., Mitra D., Abel S. The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus // Plant Physiol. 2017. V. 173. P. 1692. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01743>
71. Medvedev S.S. Principles of Calcium signal generation and transduction in plant cells // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 771. <https://doi.org/10.1134/S1021443718060109>
72. Wilkinson W.J., Kemp P.J. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels // J. Physiol. 2011. V. 589. P. 3055. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.206706>
73. Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 165. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm293>
74. Shkliarevskiy M.A., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. Calcium-dependent chang-

- es in cellular redox homeostasis and heat resistance of wheat plantlets under influence of hemin (carbon monoxide donor) // *Cytol. Genet.* 2020. V. 54. P. 522. <https://doi.org/10.3103/S0095452720060109>
75. Mukherjee S., Corpas F.J. Crosstalk among hydrogen sulfide (H₂S), nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) in root-system development and its rhizosphere interactions: A gaseous interactome // *Plant Physiol. Biochem.* 2020. V. 155. P. 800. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.020>
 76. Song X.G., She X.P., Zhang B. Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis // *Physiol. Plant.* 2008. V. 132. P. 514. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01026.x>
 77. Shkliarevskiy M.A., Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Lugovaya A.A., Bessonova V.P. Involvement of nitrate reductase and nitric oxide (NO) in implementation of the stress-protective action of a carbon monoxide (CO) donor on wheat seedlings under hyperthermy // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 688. <https://doi.org/10.1134/S1021443721040166>
 78. Sane P.V., Kumar N., Bajjal M., Singh K.K., Kochhar V.K. Activation of nitrate reductase by calcium and calmodulin // *Phytochem.* 1987. V. 26. P. 1289. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81796-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81796-3)
 79. Gao H., Jia Y., Guo S., Lv G., Wang T., Juan L. Exogenous calcium affects nitrogen metabolism in root-zone hypoxia-stressed muskmelon roots and enhances short-term hypoxia tolerance // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 1217. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.022>
 80. Gautam V., Kaur R., Kohli S.K., Verma V., Kaur P., Singh R., Saini P., Arora S., Thukral A.K., Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E., Bhardwaj R. ROS compartmentalization in plant cells under abiotic stress condition // *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress* / Eds. Khan M.I.R., Khan, N.A. Singapore: Springer. 2017. P. 89. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_4
 81. Sharova E.I., Medvedev S.S. Redox reactions in apoplast of growing cells // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 1. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010149>
 82. Minibayeva E.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>
 83. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.I. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
 84. Mamaeva A.S., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Moshkov I.E., Novikova G.V., Mur L.A.J., Hall M.A. Regulatory role of nitric oxide in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 427. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040135>
 85. Wang Y.-Q., Liu Y.-H., Wang S., Du H.-M., Shen W.-B. Hydrogen agronomy: research progress and prospects // *J. Zhejiang Univ., Sci., B.* 2020. V. 21. P. 841. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000386>
 86. Cao Z., Huang B., Wang Q., Xuan W., Ling T., Zhang B., Chen X., Nie L., Shen W. Involvement of carbon monoxide produced by heme oxygenase in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* and its proposed signal transduction pathway // *Chin. Sci. Bull.* 2007. V. 52. P. 2365. <https://doi.org/10.1007/s11434-007-0358-y>
 87. Shan C., Wang T., Zhou Y., Wang W. Hydrogen sulfide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism by jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* // *Biol. Plant.* 2018. V. 62. P. 188. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0740-9>
 88. Ton J., Flors V., Mauch-Mani B. The multifaceted role of ABA in disease resistance // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
 89. Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Shkliarevskiy M.A., Dmitriev A.P. Participation of jasmonate signaling components in the development of *Arabidopsis thaliana*'s salt resistance induced by H₂S and NO donors // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 827. <https://doi.org/10.1134/S1021443720050192>
 90. Lamar C.A., Mahesh V.B., Brann D.W. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion by heme molecules: a regulatory role for carbon monoxide? // *Endocrinol.* 1996. V. 137. P. 790. <https://doi.org/10.1210/endo.137.2.8593832>
 91. Landaw S.A., Callahan E.W.Jr., Schmid R. Catabolism of heme *in vivo*: comparison of the simultaneous production of bilirubin and carbon monoxide // *J. Clin. Invest.* 1970. V. 49. P. 914. <https://doi.org/10.1172/JCI106311>
 92. Ryter S.W. Therapeutic potential of heme oxygenase-1 and carbon monoxide in acute organ injury, critical illness, and inflammatory disorders // *Antioxidants.* 2020. V. 9: 1153. <https://doi.org/10.3390/antiox9111153>
 93. Le C.T.T., Brumbarova T., Bauer P. The interplay of ROS and iron signaling in plants // *Redox Homeostasis in Plants. Signaling and Communication in Plants.* Switzerland / Eds. Panda S.K., Yamamoto Y.Y. Cham: Springer, 2019. P. 43. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95315-1_3
 94. Sa Z.S., Huang L.Q., Wu G.L., Ding J.P., Chen X.Y., Yu T., Ci S., Shen W.B. Carbon monoxide: a novel antioxidant against oxidative stress in wheat seedling leaves // *J. Integr. Plant Biol.* 2007. V. 49. P. 638. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00461.x>
 95. Trchounian A., Petrosyan M., Sahakyan N. Plant cell redox homeostasis and reactive oxygen species // *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses* / Eds. Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.J. Switzerland: Springer. 2016. P. 25. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44081-1_2
 96. Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O., Oboznyi A.I., Ryabchun N.I., Kirichenko V.V. Constitutive and cold-induced resistance of rye and wheat seedlings to oxidative stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 326. <https://doi.org/10.1134/S1021443716030067>

97. *Magierowski M., Magierowska K., Hubalewska-Mazgaj M., Sliwowski Z., Ginter G., Pajdo R., Chmura A., Kwiecien S., Brzozowski T.* Carbon monoxide released from its pharmacological donor, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, accelerates the healing of pre-existing gastric ulcers. // *Br. J. Pharmacol.* 2017. V. 174. P. 3654. <https://doi.org/10.1111/bph.13968>
98. *Beschasnyi S.P., Hasiuk O.M.* The effect of carbon monoxide's donor CORM-2 on erythrocyte aquaporins // *World Med. Biol.* 2021. V. 2. P. 167. <https://doi.org/10.26724/2079-8334-2021-2-76-167-173>
99. *Adach W., Olas B.* Carbon monoxide and its donors – their implications for medicine // *Future Med. Chem.* 2019. V. 11. P. 60. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0215>
100. *Adach W., Błaszczuk M., Olas B.* Carbon monoxide and its donors – Chemical and biological properties // *Chem.-Biol. Interact.* 2020. V. 318: 108973. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108973>
101. *Yuan Z., Yang X., Wang B.* Redox and catalase-like activities of four widely used carbon monoxide releasing molecules (CORMs) // *Chem. Sci.* 2021. V. 12: 13013. <https://doi.org/10.1039/D1SC03832J>
102. *Kolupaev Yu.E., Yastreb T.O.* Jasmonate signaling and plant adaptation to abiotic stressors (Review) // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. P. 1. <https://doi.org/10.1134/S0003683821010117>
103. *Corpas F.J., Palma J.M.* H₂S signaling in plants and applications in agriculture // *J. Adv. Res.* 2020. V. 24. P. 131. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.011>
104. *Singhal R.K., Jatav H.S., Aftab T., Pandey S., Mishra U.N., Chauhan J., Chand S., Indu Saha D., Dadarwal B.K., Chandra K., Khan M.A., Rajput V.D., Minkina T., Narayana E.S., Sharma M.K. et al.* Roles of nitric oxide in conferring multiple abiotic stress tolerance in plants and crosstalk with other plant growth regulators // *J. Plant Growth Regul.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10446-8>

УДК 581.1.575.113.1

ФОТОПЕРИОД-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ ЦВЕТЕНИЯ *Arabidopsis thaliana* L. И *Zea mays* L.

© 2022 г. А. В. Щенникова*

Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: shchennikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.06.2021 г.

После доработки 03.08.2021 г.

Принята к публикации 04.08.2021 г.

Одомашнивание растений включает их адаптацию к различным климатическим условиям, в том числе к изменениям фотопериода и температуры. Многие генетические локусы одомашнивания ортологичны у отдаленных таксонов. Основные молекулярно-генетические механизмы цветения детально охарактеризованы у модельного растения *Arabidopsis thaliana* L., что составляет основу для изучения и построения моделей цветения других видов растений. Одомашнивание и селекция кукурузы *Zea mays* L. привели к тому, что сегодня у данного вида наблюдается большое разнообразие реакций на продолжительность светового дня при сохранении основного каркаса генетической сети, контролирующей чувствительность к фотопериоду. В обзоре рассмотрены особенности реакции на фотопериод растений кукурузы в сравнении с модельным видом *Arabidopsis*, включая фенологические гены для селекции кукурузы, являвшиеся мишенью отбора в процессе адаптации *Zea mays* к новым эколого-географическим условиям.

Ключевые слова: кукуруза, одомашнивание, адаптация, цветение, фотопериод, температура, факторы транскрипции

DOI: 10.31857/S0015330322020166

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день основными источниками питания человека являются зерновые, главные из которых — пшеница, рис, кукуруза и другие культуры. Согласно прогнозам, таковыми они останутся и в будущем в условиях непрерывного роста населения мира и меняющегося климата [1]. Критическими факторами при выращивании зерновых являются время перехода растения к репродуктивному развитию и длительность фазы налива зерна. Оба фактора чувствительны к циркадным ритмам, связанным с суточными и сезонными колебаниями таких параметров как фотопериод, температура и др. [2].

Чувствительные к фотопериоду растения делятся на виды длинного (LD) и короткого (SD) дня, цветение которых наступает при, соответственно, превышении и снижении пороговых значений продолжительности светового дня, определяемых, в первую очередь, регионом происхождения вида [3]. Одомашненные виды зерновых, давшие начало современным сельскохозяйственным культурам, проходили через дополнительную селекцию человеком с целью получения сортов, способных пройти полный цикл развития до со-

зревания семян за пределами эколого-географической ниши, освоенной диким предком. Доместикация трав Poaceae произошла, предположительно, около 15 тыс. лет назад в Восточном Средиземноморье, и последующая селекция в различных эколого-географических зонах привела к диверсификации видов зерновых и возможности их выращивания в самых разных сезонно-климатических условиях [1, 4, 5].

При описании механизмов доместикации растений широко используется понятие генетических локусов одомашнивания, многие из которых ортологичны у отдаленных таксонов [6]. Это позволяет переносить генетические данные, полученные на одних видах растений, на другие виды (включая сельскохозяйственные культуры) в процессе их изучения.

Наиболее детально основные генетические и молекулярные механизмы фотопериод-зависимого цветения охарактеризованы у модельного растения *Arabidopsis thaliana* L., являющегося растением LD [7]. Полученные знания составили основу для изучения и построения моделей ответа на фотопериод других видов растений, чему значительно способствовало секвенирование и аннотация

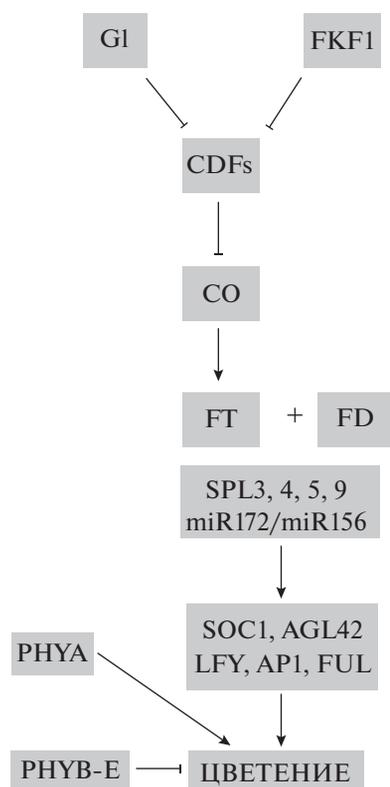


Рис. 1. Схема контроля времени цветения *Arabidopsis*. Сигнальный путь фотопериода в условиях длинного дня (LD). Стрелки указывают на активацию транскрипции/цветения; стрелки с плоским концом указывают на репрессию транскрипции/цветения.

их геномов и транскриптомов. С помощью такого подхода были идентифицированы ортологи генов, ассоциированных с фотопериодом, у однодольных культур, как LD (пшеница *Triticum aestivum* L. и ячмень *Hordeum vulgare* L.), так и SD (кукуруза *Zea mays* L., 1753 и рис *Oryza sativa* L.). Характеристика данных генов позволила выделить функционально как консервативные, так и дивергентные гены времени цветения, а также предложить возможные регуляторные механизмы, которые в ответ на эндогенные и экзогенные сигналы определяют пластичность перехода зерновых культур к репродуктивному развитию.

Кукуруза (*Zea mays* L., 1753) имеет тропическое происхождение и, как следствие, теплолюбива и приспособлена к короткому световому дню [8]. Одомашнивание и селекция данной культуры привели к тому, что сегодня у данного вида наблюдается большое разнообразие реакций на продолжительность светового дня при сохранении основного каркаса генетической сети, контролирующей чувствительность к фотопериоду. При продвижении на север, в более высокие широты, сокращается период вегетации *Z. mays* за счет короткого лета и, как следствие, значительно

снижается урожай зерна. Поэтому селекционный процесс все последнее столетие сводился к постепенной адаптации данной культуры к условиям северного климата методом инбридинга и отбора в традиционных популяциях без существенного изменения их генетического полиморфизма.

Настоящий обзор сфокусирован на анализе и обобщении существующей на сегодняшний день информации о зависимости генетической регуляции цветения *Z. mays* от длины дня с целью возможного практического использования этих данных в характеристике видового разнообразия *Z. mays* и селекции новых линий и сортов зерновой кукурузы для возделывания в умеренных и высоких широтах. В обзоре рассмотрены особенности реакции растений *Z. mays* на фотопериод в сравнении с модельным видом *Arabidopsis*, включая гены, предположительно являющиеся мишенями при одомашнивании и селекции *Z. mays*, в том числе при адаптации вида к новым эколого-географическим условиям выращивания.

ИНИЦИАЦИЯ ЦВЕТЕНИЯ *Arabidopsis thaliana*: СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ ФОТОПЕРИОДА

Известная концепция инициации цветения предполагает существование гормоноподобных стимулятора и ингибитора (так называемых флори-генов) цветения, лучшее снабжение апекса побега ассимилятами при индуктивных условиях, а также комплексное влияние условий окружающей среды [9]. Молекулярно-биологический контекст перехода растения к репродуктивному развитию означает наличие сигнальных путей, опосредованных множеством генов, стимулирующих или угнетающих цветение [7].

Стимуляция и угнетение цветения *Arabidopsis* происходит в условиях, соответственно, LD (14–16 часов) и SD (8–10 часов) [3, 10]. Центральным регулятором фотопериодического пути считается локализованный в листьях транскрипционный фактор (ТФ) CONSTANS (CO) – ядерный белок с цинковым пальцем В-бокса (BBX) с С-концевым ДНК-связывающим доменом CCT (CO, CO-like и TIMING OF CAB EXPRESSION 1) (рис. 1) [11].

В конце световой фазы происходит инициация экспрессии генов *GIGANTEA* (GI) и *FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX PROTEIN 1* (FKF1) [12]. Белки FKF1 и GI образуют комплекс, активирующий опосредованную протеасомами деградацию группы белков CYCLING DOF FACTORS (CDFs), которые являются репрессорами транскрипции гена CO при SD [12, 13]. За счет этого происходит активация CO. Наивысший уровень экспрессии гена CO в световой фазе LD фотопериода и стабильность белка CO исключительно в световой период приводят к максимальному накоплению белка в вечернее время перед наступлением

сумерек [14–16]. ТФ CO, совместно с другими партнерами, контролирует корректную транскрипцию флоригена *FLOWERING LOCUS T (FT)* [17–19]. Важное место среди партнеров занимают: ТФ NF-Y (состоит из трех субъединиц NF-YA, NF-YB и NF-YC; модуль CO–NF-Y активирует транскрипцию *FT*); белки V-Box19 (VBX19) и TOE1 (связываются с CO с образованием неактивного комплекса, что приводит к отсутствию индукции *FT*); несколько транскрипционных репрессоров семейства DELLA (связываясь с CO, блокируют его активность в отсутствие фитогормонов гиббереллинов; уровень экспрессии *FT* снижается); V-box микробелки (MicroProteins, MPs) miP1a и miP1b, которые опосредуют взаимодействие с белком-корепрессором TOPLESS (происходит не только инактивация CO, но и его превращение в репрессор *FT*) [19].

Накопление белка FT является сигналом к цветению *Arabidopsis* [17]. Считается, что ТФ FT перемещается из листьев через флоэму в апикальную меристему побега (АМП), где связывается с ТФ *FLOWERING LOCUS D (FD)* [17, 18, 20]. Исследования *O. sativa* показали, что для связывания с FD1 (гомолог FD) белок Hd3a (гомолог FT) формирует комплекс с белками 14-3-3 [18]. Тройной модуль FT-14-3-3-FD активирует транскрипцию *OsMADS15*, гомолога *API Arabidopsis*, что приводит к цветению [18]. У *Arabidopsis* модуль FT-FD взаимодействует с белками SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN (SBP)-LIKE 3 (SPL3), SPL4, SPL5 и SPL9, индуцируя экспрессию генов идентичности цветковой меристемы *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (API)* и *FRUITFULL (FUL)*, а в случае SPL9 – также гены *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* и *AGAMOUS-LIKE 42 (AGL42)* [21–27]. Белки SPL непосредственно повышают уровень экспрессии микроРНК *miR172*, которая участвует в подавлении транскрипции гена репрессора FT – *APETALA2 (AP2)*, что приводит к цветению [21, 28–30]. В то же время другой тип микроРНК, *miR156*, подавляет транскрипцию генов *SPL*, кодирующие или 3'-нетранслируемые области которых содержат последовательности, комплементарные *miR156* [31, 32]. Модуль *miR172/miR156/SPL* определяет зависящий от возраста регуляторный путь цветения и высоко консервативен у наземных растений [22, 30, 33–36].

Среди фоторецепторов *Arabidopsis* на инициацию цветения положительно влияют фитохром RHYA, фототропины PHOT1 и PHOT2, криптохромы CRY1 и CRY2, рецептор синего света FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1), а также рецептор ультрафиолета UVR8 [6, 12, 14, 37–39]. В подавлении зацветания участвуют фитохромы RHYB, RHYC, RHYD и RHYE, а также рецепторы синего света ZEITLUPE (ZTL) и LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) [6, 14, 40–44]. FKF1,

ZTL и LKP2 участвуют в регуляции стабильности белка-репрессора CO: сверхэкспрессия *LKP2* или *ZTL*, так же как мутация *fkf1*, приводит к позднему цветению в условиях LD за счет подавления экспрессии CO и FT [45–47]. Интересно, что RHYB также может функционировать и как температурный рецептор [48], что подчеркивает наличие корреляции между воздействием фотопериода и температуры на инициацию цветения растения.

ИНИЦИАЦИЯ ЦВЕТЕНИЯ КУКУРУЗЫ *Zea mays*

Важнейшим фенологическим этапом развития зерновых является инициация и продолжительность цветения, также известные как дата и фаза колошения, которые напрямую влияют на урожайность зерна и должны укладываться в определенный сезон во избежание абиотических (холод, мороз, жара и засуха) и биотических (грибы, бактерии, вирусы, нематоды или насекомые) стрессов.

Получение и анализ последовательностей генов зерновых – *O. sativa* [49], *H. vulgare* [50], *T. aestivum* [51] и *Z. mays* [52], позволили идентифицировать и охарактеризовать многие фенологические гены. Было показано, что сезонное цветение трав контролируется, за некоторым исключением, генами, ортологичными генам цветения *Arabidopsis*. При этом ключевые регуляторные гены фотопериодического контроля цветения консервативны у SD-растений *O. sativa* и LD-растений *T. aestivum* и *H. vulgare*, но регуляция этих генов часто противоположная [53]. Также выявлены многие функционально дивергентные (по отношению к *Arabidopsis*) гены, участвующие в цветении зерновых [54]. Кроме того, обнаружены значительные различия между злаками, выращиваемыми в умеренном и тропическом климате [54].

Кукуруза *Z. mays* является тропическим растением SD и, в отличие от *T. aestivum* и *H. vulgare*, не требует яровизации. Кукуруза (*Z. mays* ssp. *mays*) была одомашнена около 9 тыс. лет назад из дикой травы теосинте (*Z. mays* ssp. *parviglumis*), произрастающей в тропиках Центральной Америки (юго-западная часть Мексики) и являющейся растением SD [8]. В процессе одомашнивания теосинте была адаптирована к более прохладным умеренным регионам Северной Америки и Европы [55]. После доместикации селекция *Z. mays* была обусловлена, в частности, отбором по генам и локусам для адаптации времени цветения к новым условиям роста [56]. Сегодня, сорта кукурузы, чувствительные к фотопериоду, выращивают в тропических регионах, тогда как сорта умеренного климата нейтральны к продолжительности дня, и их цветение стимулируется почти исключительно за счет скоординированного действия

Таблица 1. Гены цветения кукурузы

Ген кукурузы	Ортолог гена у <i>Arabidopsis</i>
<i>ZmFKF1a</i> (GRMZM2G107945) <i>ZmFKF1b</i> (GRMZM2G106363)	<i>FKF1</i> (AT1G68050)
<i>ZmPRR37</i> (GRMZM2G033962, GRMZM2G005732)	<i>PRR3</i> (AT5G60100) <i>PRR7</i> (AT5G02810)
<i>ZmGHD8</i> (GRMZM2G444073)	<i>NF-YB2</i> (AT5G47640) <i>NF-YB3</i> (AT4G14540)
<i>ZmCCT</i> (GRMZM5G868285)	Нет
<i>CONZ1</i> (GRMZM2G405368)	<i>CO</i> (AT5G15840)
<i>gigz1A/GI1</i> (GRMZM2G107101) <i>gigz1B/GI2</i> (GRMZM5G844173)	<i>GI</i> (AT1G22770)
<i>ZmDLF1</i> (GRMZM2G067921)	<i>FD</i> (AT4G35900)
<i>ZmMADS1</i> (GRMZM2G171365) <i>ZmMADS69</i> (GRMZM2G171650)	<i>SOC1</i> (AT2G45660)
<i>ZmPHYA1</i> (GRMZM2G157727) <i>ZmPHYA2</i> (GRMZM2G181028) <i>ZmPHYB1</i> (GRMZM2G124532) <i>ZmPHYB2</i> (GRMZM2G092174) <i>ZmPHYC1</i> (GRMZM2G057935) <i>ZmPHYC2</i> (GRMZM2G129889; GRMZM2G129913)	<i>PHYA</i> (AT1G09570) <i>PHYB</i> (AT2G18790) <i>PHYC</i> (AT5G35840)
<i>ZCN8</i> (GRMZM2G179264) <i>ZCN7</i> (GRMZM2G141756) <i>ZCN14</i> (GRMZM2G373928) <i>ZCN12</i> (GRMZM2G103666)	<i>FT</i> (AT1G65480)
<i>ZmZCN6</i> (GRMZM2G132880)	<i>TFL1</i> (AT5G03840)
<i>ZFL1</i> (GRMZM2G098813) <i>ZFL2</i> (GRMZM2G180190)	<i>LFY</i> (AT5G61850)
<i>IDI</i> (GRMZM2G011357)	Нет
<i>ZmSPL25</i> (GRMZM2G414805)	<i>SPL3</i> (AT2G33810) <i>SPL4</i> (AT1G53160) <i>SPL5</i> (AT3G15270) <i>SPL9</i> (AT2G42200)
<i>ZMM4</i> (GRMZM2G032339) <i>ZMM15</i> (GRMZM2G553379) <i>ZMM24</i> (GRMZM2G087095) <i>ZMM31</i> (GRMZM2G071620) <i>ZAPI</i> (GRMZM2G148693)	<i>API</i> (AT1G69120) <i>FUL</i> (AT5G60910)

генов автономных путей, регулируемых эндогенными сигналами [56]. В целом, современные сорта и линии *Z. mays* демонстрируют огромное естественное разнообразие по времени цветения, благодаря высокому уровню диверсификации фенологических генов [56, 57].

Текущие знания о генах цветения *Z. mays* основаны на результатах анализа локусов количественных признаков (QTL), с использованием различных популяций, мутагенеза и сравнитель-

ных исследований с *Arabidopsis* и *O. sativa* [55, 57, 58]. Основные фенологические гены перечислены в табл. 1.

Ключевым геном автономного пути цветения *Z. mays* (особенно важным в случае сортов умеренного климата) является *INDETERMINATE 1 (IDI)*, специфичный для однодольных. Данный ген экспрессируется в листьях, кодирует ТФ с цинковым пальцем С2Н2-типа и способен активировать переход растения к цветению независи-

мо от фотопериода [59]. Уровни транскрипта и белка ID1 остаются стабильными в течение светового цикла, а мутации в *ID1* приводят к увеличению продолжительности вегетативной фазы [60]. Показано, что ID1 контролирует модификации хроматина в локусах, кодирующих флоригены *Z. mays*, и может регулировать цветение посредством метилирования гистонов [56].

Комплекс FKF1/GI, который способствует активации транскрипции гена *CO* у *Arabidopsis* в зависимости от фотопериода [12, 13], по всей видимости, имеется и у кукурузы. В геноме *Z. mays* обнаружены гомологи генов *Arabidopsis*, как *CO* (*CONZI*) и *GI* (*GI1* и *GI2*), суточный профиль экспрессии которых зависит от фотопериода [61], так и *FKF1* (*ZmFKF1a* и *ZmFKF1b*) [62]. В условиях LD *ZmGI* способствует подавлению цветения, так как мутация *gi1* вызывает раннее цветение в условиях LD, и это противоположно функции *GI* у *Arabidopsis* [53, 63]. *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* выявлены у инбредных линий *Z. mays*, тогда как у образцов теосинте присутствует только *ZmFKF1b* [62]. При этом у инбредных линий обнаружены восемь сайтов положительной селекции на *ZmFKF1b*, соответствующих тропическим и умеренным группам кукурузы, что указывает на ключевую роль *ZmFKF1b* в адаптивной эволюции *Z. mays* [62].

Гомологи флоригена *FT* также присутствуют во множестве в геноме *Z. mays*. Анализ 15 *FT*-подобных генов *ZEA CENTRORADIALIS* (*ZCN*) определил флориген – *ZCN8*, играющий центральную роль в инициации цветения *Z. mays* [64]. Мутация *zcn8* приводит к задержке цветения, а сверхэкспрессия *ZCN8* восстанавливает мутантный фенотип *ft Arabidopsis* до дикого типа [65]. Регулирование гена *ZCN8*, а также второго предполагаемого флоригена *ZCN7*, находится под контролем белка ID1 [56].

Другой ТФ ZmNF-YA3 семейства Nuclear factor-Y (NF-Y), способствует раннему цветению, взаимодействуя с CO-подобным белком и FLOWERING PROMOTING FACTOR 1 (FPF1), а также с промотором *FT-like 12 Z. mays* [66].

В сложной генетической сети контроля инициации цветения *Z. mays* задействованы многочисленные QTL, в основном, с небольшим эффектом [57, 67]. Так, локус *Vegetative to generative transition 1* (*Vgt1*) имеет в своей основе *cis*-регуляторный элемент *Rap2.7*, кодирующий AP2-доменный ТФ [68]. Ген *ZCN8* составляет основу QTL qDTA8, определяющего время цветения. Данный локус постоянно обнаруживался во многих экспериментальных популяциях теосинте. Ген экспрессируется во флоэме зрелых листьев только у тропической кукурузы в условиях SD [64]. Еще один QTL qDTA3-2, включающий ген *ZmMADS69*, ассоциирован с различием во времени цветения между *Z. mays* и теосинте [69]. Через регуляторный модуль *Rap2.7-ZCN8*,

ТФ *ZmMADS69* действует как активатор цветения, подавляя экспрессию гена репрессора цветения *Rap2.7* и тем самым ослабляя репрессию флоригена *ZCN8* [69]. Сверхэкспрессия гена *Zm-MADS69* вызывает раннее цветение, в то время как его инактивация – обратный эффект. Показано, что по мере распространения *Z. mays* в широты умеренного климата селекцией была затронута 5'-регуляторная область *ZmMADS69* [69]. И *ZmMADS69*, и *Rap2.7* картируются в пределах хорошо охарактеризованных QTL времени цветения, предполагая, что аллельные варианты этих генов отвечают за часть существующего разнообразия признака времени цветения у *Z. mays* умеренного пояса [68, 70].

В контроле экспрессии флоригена *ZCN8* участвуют также белки ID1 и DELAYED FLOWERING 1 (DLF1, bZIP-ТФ) [64, 71, 72]. ТФ ID1 активирует экспрессию гена *DLF1* (гомолог *FD Arabidopsis*), и синтезируемый белок DLF1 взаимодействует в АМП с белком *ZCN8*, формируя модуль DLF1/*ZCN8* (подобно FT/*FD Arabidopsis*, о котором писалось выше) [64, 71]. Эктопическая экспрессия *DLF1* приводит к раннему цветению, тогда как выключение гена значительно его задерживает [71].

Постепенное распространение *Z. mays* в северном направлении сопровождалось появлением вариаций *cis*-регуляторных последовательностей промотора *ZCN8*, которые модифицировали профиль связывания различных ТФ [73, 74]. Анализ ассоциаций у широкой выборки инбредных линий кукурузы позволил идентифицировать в промоторе *ZCN8* мононуклеотидный полиморфизм SNP-1245 (предположительно, происходящий от *Zea mays ssp. mexicana*), наиболее сильно коррелирующий с ранним цветением и связыванием с активатором цветения ТФ *ZmMADS1* (гомолог *SOC1 Arabidopsis*) [74]. Предполагается, что SNP-1245 являлся мишенью отбора во время раннего одомашнивания *Z. mays*. Перед SNP-1245 находится независимый ассоциативный блок, не имеющий отношения к QTL qDTA8 [74]. Данный блок содержит Indel-2339 и считается сайтом внедрения аллеля раннего цветения SNP-1245 в раноцветущий гаплотип при адаптации к высоким широтам. На это указывает, в числе прочего, низкая частота (5%) аллеля Indel-2339Del в современных инбредных линиях тропической кукурузы и более высокая его частота (30%) у кукурузы умеренного пояса [74]. Таким образом, в процессе отбора в промоторной области *ZCN8* произошли два тесно связанных события – появление SNP-1245 и Indel-2339 [74].

В условиях длинного дня репрессия *ZCN8* опосредована ССТ-доменным ТФ *ZmCCT*, который входит в один из основных QTL времени цветения (*oft10*) [64, 75]. *ZmCCT* связывается с промо-

тором гена *ZmEhd1*, подавляя его транскрипцию, что снижает экспрессию *ZCN8* [76]. Кроме того, *ZmCCT* подавляет транскрипцию флоригенов *ZCN7*, *ZCN12* и *ZCN14*, генов *BBX24* и *ZmPRR37*, и MADS-бок гена *ZAP1* (гомолог *API*), регулируя таким образом сложную сеть для инициации и поддержания перехода растения от вегетативной к репродуктивной фазе [76].

Более 85% генома *Z. mays* составляют различные транспозоны [52], которые играли и играют важную роль в доместикации и селекции данной культуры. К примеру, охарактеризованы аллели *ZmCCT9* [77] и *ZmCCT10* [70, 78, 79], независимые вставки транспозонов в регуляторные области которых снижают экспрессию *ZmCCT9* и *ZmCCT10* и, как следствие, чувствительность *Z. mays* к LD-фотопериоду [78, 79].

У различных аллелей *ZmCCT10* были выявлены две транспозонные вставки (5.1 т.п.н. — в промоторной области, 4.2 т.п.н. — в интроне). Данные вставки приводят к противоположным эффектам. Аллель со вставкой 5.1 т.п.н. САСТА-подобного транспозона в промоторе ускоряет цветение в условиях умеренного климата (LD), тогда как в тропических регионах (SD) не оказывает никакого эффекта по сравнению с нулевым аллелем (без вставок) [76]. Напротив, аллель со вставкой 4.2 т.п.н. в интроне ускоряет время цветения в тропическом регионе, но не в регионе с умеренным климатом [76]. Предполагается, что существует неизвестный белок, который может индуцироваться изменением длины дня и связываться с промотором *ZmCCT10*, усиливая его экспрессию в умеренном климате. Транспозонная вставка 5.1 т.п.н. может препятствовать связыванию неизвестного белка в высокоширотных регионах, тогда как в низкоширотной области данный белок может либо не экспрессироваться, либо экспрессироваться на низком уровне [76]. В свою очередь, вставка 4.2 т.п.н. может индуцировать транскрипцию антисмысловых РНК, что будет вызывать репрессирование хроматина, включая метилирование ДНК, H3K9me2 и деацетилирование гистонов, а затем подавлять транскрипцию гена *ZmCCT10* как в низко-, так и в высокоширотных регионах. В сравнении с аллелем со вставкой 5.1 т.п.н., *ZmCCT10* со вставкой 4.2 т.п.н. показывает равную и более низкую экспрессию в высоко- и низкоширотных регионах, соответственно [76].

Еще один мобильный элемент, Harbinger-like, расположенный за 57 т.п.н. до гена *ZmCCT9*, связан с еще одним QTL времени цветения, qDTA9 [67, 77]. Так как *ZmCCT9* подавляет экспрессию флоригена *ZCN8*, данный элемент выступает как репрессор *ZmCCT9*, способствуя цветению в условиях LD. Предполагается, что Harbinger-like элемент возник после появления вставки 5.1 т.п.н. в промоторе *ZmCCT10* [70, 76].

В инициации цветения *Z. mays* важная роль принадлежит также фитохром-опосредованному сигнальному пути в совокупности с регуляторным модулем *miR172/miR156/SPL*, как это показано на примере *Arabidopsis* [21]. Геном *Z. mays* содержит по паре паралогичных генов, кодирующих три типа фитохромов, *PHYA1*, *PHYA2*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYC1* и *PHYC2* [80], а также 30 генов *ZmSPL* [81]. Анализ сверхэкспрессии *ZmPHYC1* и *ZmPHYC2* и двойного нокаута *zmphyC1 zmphyC2* выявил консервативную функцию генов *ZmPHYC* в негативной регуляции времени цветения в условиях LD [82]. Данные анализа генов *ZmSPL* подтверждают, что 18 из них могут являться прямыми мишенями для *zma-miR156s* [81, 83–85], а *ZmSPL25* участвует в контроле времени цветения и региональной адаптации у сортов кукурузы умеренного климата [86]. У *Z. mays* найдено 12 членов семейства *MIR156* и показано, что сверхэкспрессия двух тандемных генов *MIR156* задерживает цветение [83].

После активации флоригенов и других факторов инициации цветения происходит активация генов идентичности меристем соцветия и цветка *Z. mays*, таких как *ZEAF LORICAULA/LEAFY (ZFL1 и ZFL2)* (гомологи *LFY*) и MADS-бок гены *ZMM4*, *ZMM15*, *ZMM24* и *ZMM31 (API/FUL)* подсемейство) [87, 88].

На рис. 2 приведена возможная схема инициации цветения *Z. mays* под влиянием фотопериода короткого дня.

Продвижение культуры в высокие широты сопряжено с понижением диапазона температур и, следовательно, с чувствительностью кукурузы к холоду, в частности, способностью цвести при пониженных температурах. Хотя *Z. mays*, в отличие от *T. aestivum*, не требует яровизации [8], она исходно является тропическим растением и должна быть чувствительна к холоду. Поскольку основные площади возделывания кукурузы находятся в регионах с теплым климатом, в основном изучаются механизмы устойчивости данной культуры к повышенным (выше 35°C) температурам [6, 66, 89, 90]. О связи цветения *Z. mays* с пониженными температурами известно только, что флоригены *ZCN12* и *ZCN8* играют совместную центральную роль в адаптации кукурузы при продвижении с юга на север в связи со сменой не только продолжительности дня, но и температурного градиента [91].

Исследования видов, адаптированных к северным, околополярным зонам роста, показали, что устойчивость к холоду и заморозкам может быть ассоциирована с накоплением сахаров [92]. Связь с углеводным обменом наблюдается и в случае ответа растений на изменение длины дня. Так, при культивировании в условиях непрерывного освещения (имитация условий околополярных широт) агрокультуры демонстрируют снижение активности фотосинтеза из-за накопления высоких

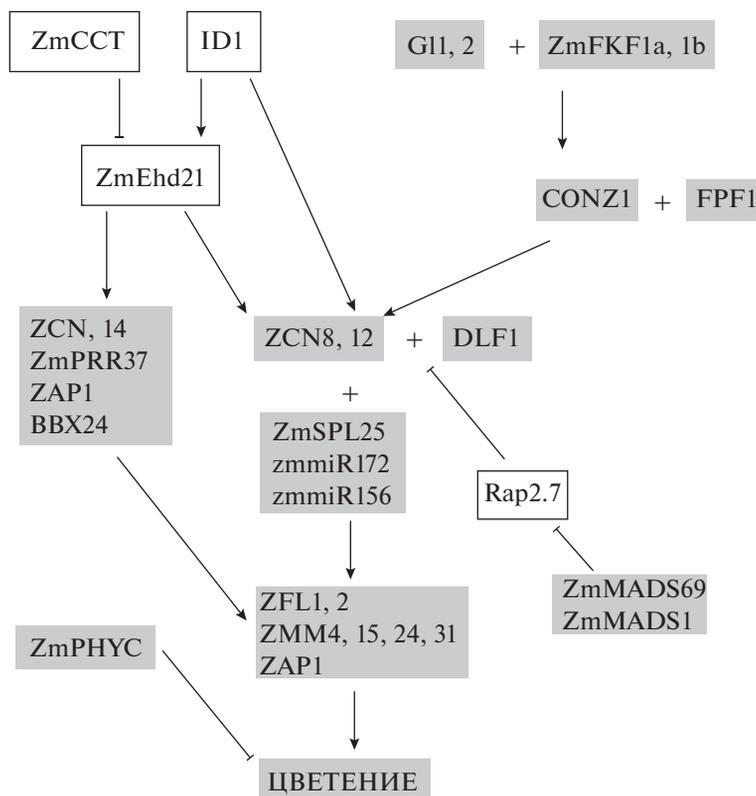


Рис. 2. Схема контроля времени цветения *Z. mays*. Сигнальный путь фотопериода короткого дня (SD). Стрелки указывают на активацию транскрипции/цветения; стрелки с плоским концом указывают на репрессию транскрипции/цветения. Серые блоки соответствуют генам, ортологи которых имеются в геноме *Arabidopsis*. В рамке – дивергентные гены цветения, идентифицированные в геноме *Z. mays* и отсутствующие у *Arabidopsis*.

концентраций крахмала в листьях [92]. Все это может свидетельствовать о связи эффектов изменения фотопериода и понижения температуры при адапционном продвижении *Z. mays* с юга на север, а также об участии в данном процессе эволюционных изменений генов углеводного метаболизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре изложены сведения о регуляции инициации цветения у растений кукурузы *Z. mays*, включая воздействие фотопериода, и ее возможной связи с адаптацией данной культуры к условиям увеличенной продолжительности дня в процессе доместикации и селекции при продвижении из тропиков в высокие широты. Общим для различных растений в основной схеме молекулярно-генетического контроля времени перехода к репродуктивной фазе является требование к вышестоящим регуляторам определять экспрессию *FT*-подобных генов, но количество паралофов и относительный вклад таких регуляторов в значительной степени отличается у *Z. mays* в сравнении с модельным растением *A. thaliana*. Имеются свидетельства связи между изменением фотопериода

и понижением температуры при адапционном продвижении *Z. mays* с юга на север. Обобщенные в обзоре данные могут быть использованы для оценки современного разнообразия вида в рамках существующих коллекций образцов, инбредных линий и сортов *Z. mays*, а также в селекции раноцветущих линий и сортов зерновой кукурузы для возделывания в умеренных и высоких широтах.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-16-00008) и Министерства науки и образования Российской Федерации.

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. Hill C.B., Li C. Genetic Architecture of Flowering Phenology in Cereals and Opportunities for Crop Improvement // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 1906. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01906>
2. Craufurd P.Q., Wheeler T.R. Climate change and the flowering time of annual crops // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 2529.

3. *Greenup A., Peacock W.J., Dennis E.S., Trevaskis B.* The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals // *Ann. Bot.* 2009. V. 103. P. 1165.
4. *von Zitzewitz J., Szucs P., Dubcovsky J., Yan L., Francia E., Pecchioni N., Casas A., Chen T.H., Hayes P.M., Skinner J.S.* Molecular and structural characterization of barley vernalization genes // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 59. P. 449.
5. *Gawroński P., Ariyadasa R., Himmelbach A., Poursarebani N., Kilian B., Stein N., Steuernagel B., Hensel G., Kumlehn J., Sehgal S.K., Gill B.S., Gould P., Hall A., Schnurbusch T.* A distorted circadian clock causes early flowering and temperature-dependent variation in spike development in the Eps-3Am mutant of einkorn wheat // *Genetics.* 2014. V. 196. P. 1253.
6. *Cao S., Luo X., Xu D., Tian X., Song J., Xia X., Chu C., He Z.* Genetic architecture underlying light and temperature mediated flowering in *Arabidopsis*, rice, and temperate cereals // *New Phytol.* 2021. V. 230. P. 1731.
7. *Song Y.H., Kubota A., Kwon M.S., Covington M.F., Lee N., Taagen E.R., Laboy Cintrón D., Hwang D.Y., Akiyama R., Hodge S.K., Huang H., Nguyen N.H., Nusinow D.A., Millar A.J., Shimizu K.K. et al.* Molecular basis of flowering under natural long-day conditions in *Arabidopsis* // *Nat. Plants.* 2018. V. 4. P. 824.
8. *Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M.M., Sanchez G.J., Buckler E., Doebley J.* A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 6080.
9. *Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., Lejeune P.* Physiological signals that induce flowering // *Plant Cell.* 1993. V. 5. P. 1147.
10. *Pidkowich M.S., Klenz J.E., Haughn G.W.* The making of a flower: control of floral meristem identity in *Arabidopsis* // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. P. 64.
11. *Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G.* The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors // *Cell.* 1995. V. 80. P. 847.
12. *Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A., Imaizumi T.* FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis* // *Science.* 2007. V. 318. P. 261.
13. *Fornara F., Panigrahi K.C., Gissot L., Sauerbrunn N., Rühl M., Jarillo J.A., Coupland G.* *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. P. 75.
14. *Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A., Coupland G.* Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering // *Science.* 2004. V. 303. P. 1003.
15. *Jang S., Marchal V., Panigrahi K.C., Wenkel S., Soppe W., Deng X.W., Valverde F., Coupland G.* *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response // *EMBO J.* 2008. V. 27. P. 1277.
16. *Lazaro A., Mouriz A., Piñeiro M., Jarillo J.A.* Red Light-Mediated Degradation of CONSTANS by the E3 Ubiquitin Ligase HOS1 Regulates Photoperiodic Flowering in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2015. V. 27. P. 2437.
17. *Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G.* FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* // *Science.* 2007. V. 316. P. 1030.
18. *Taoka K., Ohki I., Tsuji H., Furuita K., Hayashi K., Yanase T., Yamaguchi M., Nakashima C., Purwestri Y.A., Tamaki S., Ogaki Y., Shimada C., Nakagawa A., Kojima C., Shimamoto K.* 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen // *Nature.* 2011. V. 476. P. 332.
19. *Brambilla V., Fornara F.* Y flowering? Regulation and activity of CONSTANS and CCT-domain proteins in *Arabidopsis* and crop species // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2017. V. 1860. P. 655.
20. *Jaeger K.E., Wigge P.A.* FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. 1050.
21. *Wang J.W., Czech B., Weigel D.* miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana* // *Cell.* 2009. V. 138. P. 738.
22. *Wu G., Park M.Y., Conway S.R., Wang J.W., Weigel D., Poethig R.S.* The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis* // *Cell.* 2009. V. 138. P. 750.
23. *Mathieu J., Yant L.J., Mürdter F., Küttner F., Schmid M.* Repression of flowering by the miR172 target SMZ // *PLoS Biol.* 2009. V. 7: e1000148. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000148>
24. *Yamaguchi A., Wu M.F., Yang L., Wu G., Poethig R.S., Wagner D.* The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1 // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. P. 268.
25. *Yant L., Mathieu J., Dinh T.T., Ott F., Lanz C., Wollmann H., Chen X., Schmid M.* Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor APETALA2 // *Plant Cell.* 2010. V. 22. P. 2156.
26. *Jung J.H., Seo P.J., Kang S.K., Park C.M.* miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in *Arabidopsis* developmental transitions // *Plant Mol. Biol.* 2011. V. 76. P. 35.
27. *Jung J.H., Lee H.J., Ryu J.Y., Park C.M.* SPL3/4/5 Integrate Developmental Aging and Photoperiodic Signals into the FT-FD Module in *Arabidopsis* Flowering // *Mol. Plant.* 2016. V. 9. P. 1647.
28. *Jung J.H., Seo Y.H., Seo P.J., Reyes J.L., Yun J., Chua N.H., Park C.M.* The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 2736.
29. *Schwarz S., Grande A.V., Bujdosó N., Saedler H., Huijser P.* The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis* // *Plant Mol. Biol.* 2008. V. 67. P. 183.
30. *Wang J.W.* Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 4723.
31. *Gandikota M., Birkenbihl R.P., Höhmann S., Cardon G.H., Saedler H., Huijser P.* The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene

- SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 683.
32. Guo A.Y., Zhu Q.H., Gu X., Ge S., Yang J., Luo J. Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family // *Gene.* 2008. V. 418. P. 1.
 33. Xie K., Wu C., Xiong L. Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 280.
 34. Yang Z., Wang X., Gu S., Hu Z., Xu H., Xu C. Comparative study of SBP-box gene family in *Arabidopsis* and rice // *Gene.* 2008. V. 407. P. 1.
 35. Yang L., Conway S.R., Poethig R.S. Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156 // *Development.* 2011. V. 138. P. 245.
 36. Poethig R.S. Vegetative phase change and shoot maturation in plants // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2013. V. 105. P. 125.
 37. Kong Y., Zheng Y. Phototropin is partly involved in blue-light-mediated stem elongation, flower initiation, and leaf expansion: a comparison of phenotypic responses between wild *Arabidopsis* and its phototropin mutants // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 171: e103967. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103967>
 38. Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M., Lin C. The action mechanisms of plant cryptochromes // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 684.
 39. Arongaus A.B., Chen S., Pireyre M., Glockner N., Galvao V.C., Albert A., Winkler J.B., Fankhauser C., Harter K., Ulm R. *Arabidopsis* RUP2 represses UVR8-mediated flowering in noninductive photoperiods // *Genes Dev.* 2018. V. 32. P. 1332.
 40. Monte E., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang Y., Li X., Young J., Austin-Phillips S., Quail P.H. Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 1962.
 41. Devlin P.F., Robson P.R., Patel S.R., Goosey L., Sharrock R.A., Whitelam G.C. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 909.
 42. Devlin P.F., Patel S.R., Whitelam G.C. Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1998. V. 10. P. 1479.
 43. Kim W.Y., Fujiwara S., Suh S.S., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam H.G., Somers D.E. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light // *Nature.* 2007. V. 449. P. 356.
 44. Schultz T.F., Kiyosue T., Yanovsky M., Wada M., Kay S.A. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 2659.
 45. Nelson D.C., Lasswell J., Rogg L.E., Cohen M.A., Bartel B. FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis* // *Cell.* 2000. V. 101. P. 331.
 46. Somers D.E., Kim W.Y., Geng R. The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 769.
 47. Takase T., Nishiyama Y., Tanihigashi H., Ogura Y., Miyazaki Y., Yamada Y., Kiyosue T. LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1 // *Plant J.* 2011. V. 67. P. 608.
 48. Gil K.E., Park C.M. Thermal adaptation and plasticity of the plant circadian clock // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 1215.
 49. Goff S.A. Collaboration on the rice genome // *Science.* 2002. V. 296: 45. <https://doi.org/10.1126/science.296.5565.45c>
 50. International Barley Genome Sequencing Consortium, Mayer K.F., Waugh R., Brown J.W., Schulman A., Langridge P., Platzer M., Fincher G.B., Muehlbauer G.J., Sato K., Close T.J., Wise R.P., Stein N. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome // *Nature.* 2012. V. 91. P. 711.
 51. International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome // *Science.* 2014. V. 345: 1251788. <https://doi.org/10.1126/science.1251788>
 52. Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F.S., Pasternak S., Liang C.Z., Zhang J.W., Fulton L., Graves T.A., Minx P., Reily A.D., Courtney L., Kruchowski S.S., Tomlinson C. et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics // *Science.* 2009. V. 326. P. 1112.
 53. Hayama R., Yokoi S., Tamaki S., Yano M., Shimamoto K. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice // *Nature.* 2003. V. 422. P. 719.
 54. Calixto C.P., Waugh R., Brown J.W. Evolutionary relationships among barley and *Arabidopsis* core circadian clock and clock-associated genes // *J. Mol. Evol.* 2015. V. 80. P. 108.
 55. Chardon F., Virlon B., Moreau L., Falque M., Joets J., Decousset L., Murigneux A., Charcosset A. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome // *Genetics.* 2004. V. 168. P. 2169.
 56. Mascheretti I., Turner K., Brivio R.S., Hand A., Colasanti J., Rossi V. Florigen-Encoding Genes of Day-Neutral and Photoperiod-Sensitive Maize Are Regulated by Different Chromatin Modifications at the Floral Transition // *Plant Physiol.* 2015. V. 168. P. 1351.
 57. Buckler E.S., Holland J.B., Bradbury P.J., Acharya C.B., Brown P.J., Browne C., Ersoz E., Flint-Garcia S., Garcia A., Glaubitz J.C., Goodman M.M., Harjes C., Guill K., Kron D.E., Larsson S. et al. The genetic architecture of maize flowering time // *Science.* 2009. V. 325. P. 714.
 58. Steinhoff J., Liu W., Reif J.C., Della Porta G., Ranc N., Würschum T. Detection of QTL for flowering time in multiple families of elite maize // *Theor. Appl. Genet.* 2012. V. 125. P. 1539.
 59. Colasanti J., Tremblay R., Wong A.Y., Coneva V., Kozaki A., Mable B.K. The maize INDETERMINATE1 flowering time regulator defines a highly conserved zinc finger protein family in higher plants // *BMC Genomics.* 2006. V. 7: 158. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-158>

60. Wong A.Y., Colasanti J. Maize floral regulator protein INDETERMINATE1 is localized to developing leaves and is not altered by light or the sink/source transition // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 403.
61. Miller T.A., Muslin E.H., Dorweiler J.E. A maize CONSTANS-like gene, *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods // *Planta*. 2008. V. 227. P. 1377.
62. Liu L., Wu Y., Liao Z., Xiong J., Wu F., Xu J., Lan H., Tang Q., Zhou S., Liu Y., Lu Y. Evolutionary conservation and functional divergence of the LFK gene family play important roles in the photoperiodic flowering pathway of land plants // *Heredity (Edinb.)*. 2018. V. 120. P. 310.
63. Bendix C., Mendoza J.M., Stanley D.N., Meeley R., Harmon F.G. The circadian clock-associated gene *giganteal* affects maize developmental transitions // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 1379.
64. Meng X., Muszynski M.G., Danilevskaya O.N. The FT-like ZCN8 Gene Functions as a Floral Activator and Is Involved in Photoperiod Sensitivity in Maize // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 942.
65. Lazakis C.M., Coneva V., Colasanti J. ZCN8 encodes a potential orthologue of *Arabidopsis* FT florigen that integrates both endogenous and photoperiod flowering signals in maize // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 4833.
66. Su H., Cao Y., Ku L., Yao W., Cao Y., Ren Z., Dou D., Wang H., Ren Z., Liu H., Tian L., Zheng Y., Chen C., Chen Y. Dual functions of ZmNF-YA3 in photoperiod-dependent flowering and abiotic stress responses in maize // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 5177.
67. Li Y.X., Li C., Bradbury P.J., Liu X., Lu F., Romay C.M., Glaubitz J.C., Wu X., Peng B., Shi Y., Song Y., Zhang D., Buckler E.S., Zhang Z., Li Y., Wang T. Identification of genetic variants associated with maize flowering time using an extremely large multi-genetic background population // *Plant J.* 2016. V. 86. P. 391.
68. Salvi S., Corneti S., Bellotti M., Carraro N., Sanguineti M.C., Castelletti S., Tuberosa R. Genetic dissection of maize phenology using an intraspecific introgression library // *BMC Plant Biol.* 2011. V. 11: 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-4>
69. Liang Y., Liu Q., Wang X., Huang C., Xu G., Hey S., Lin H.Y., Li C., Xu D., Wu L., Wang C., Wu W., Xia J., Han X., Lu S. et al. ZmMADS69 functions as a flowering activator through the ZmRap2.7-ZCN8 regulatory module and contributes to maize flowering time adaptation // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 2335.
70. Ducrocq S., Giauffret C., Madur D., Combes V., Dumas F., Jouanne S., Coubriche D., Jamin P., Moreau L., Charcosset A. Fine mapping and haplotype structure analysis of a major flowering time quantitative trait locus on maize chromosome 10 // *Genetics*. 2009. V. 183. P. 1555.
71. Muszynski M.G., Dam T., Li B., Shurbroun D.M., Hou Z., Bruggemann E., Archibald R., Ananiev E.V., Danilevskaya O.N. *delayed flowering1* Encodes a basic leucine zipper protein that mediates floral inductive signals at the shoot apex in maize // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 1523.
72. Minow M.A.A., Ávila L.M., Turner K., Ponzoni E., Mascheretti I., Dussault F.M., Lukens L., Colasanti J. Distinct gene networks modulate floral induction of autonomous maize and photoperiod-dependent teosinte // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 2937.
73. Alter P., Bircheneder S., Zhou L.Z., Schlüter U., Gahrzt M., Sonnwald U., Dresselhaus T. Flowering Time-Regulated Genes in Maize Include the Transcription Factor ZmMADS1 // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 389.
74. Guo L., Wang X., Zhao M., Huang C., Li C., Li D., Yang C.J., York A.M., Xue W., Xu G., Liang Y., Chen Q., Doebley J.F., Tian F. Stepwise cis-Regulatory Changes in ZCN8 Contribute to Maize Flowering-Time Adaptation // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 3005.
75. Stephenson E., Estrada S., Meng X., Ourada J., Muszynski M.G., Habben J.E., Danilevskaya O.N. Overexpression of the photoperiod response regulator ZmCCT10 modifies plant architecture, flowering time and inflorescence morphology in maize // *PLoS One*. 2019. V. 14: e0203728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203728>
76. Zhong S., Liu H., Li Y., Lin Z. Opposite response of maize ZmCCT to photoperiod due to transposon jumping // *Theor. Appl. Genet.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03862-7>
77. Huang C., Sun H., Xu D., Chen Q., Liang Y., Wang X., Xu G., Tian J., Wang C., Li D., Wu L., Yang X., Jin W., Doebley J.F., Tian F. ZmCCT9 enhances maize adaptation to higher latitudes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. P. E334.
78. Hung H.Y., Shannon L.M., Tian F., Bradbury P.J., Chen C., Flint-Garcia S.A., McMullen M.D., Ware D., Buckler E.S., Doebley J.F., Holland J.B. ZmCCT and the genetic basis of day-length adaptation underlying the postdomestication spread of maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. E1913.
79. Yang Q., Li Z., Li W., Ku L., Wang C., Ye J., Li K., Yang N., Li Y., Zhong T., Li J., Chen Y., Yan J., Yang X., Xu M. CACTA-like transposable element in ZmCCT attenuated photoperiod sensitivity and accelerated the post-domestication spread of maize. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 16969.
80. Sheehan M.J., Farmer P.R., Brutnell T.P. Structure and expression of maize phytochrome family homeologs // *Genetics*. 2004. V. 167. P. 1395.
81. Wei H., Zhao Y., Xie Y., Wang H. Exploiting SPL genes to improve maize plant architecture tailored for high-density planting // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 4675.
82. Li Q., Wu G., Zhao Y., Wang B., Zhao B., Kong D., Wei H., Chen C., Wang H. CRISPR/Cas9-mediated knockout and overexpression studies reveal a role of maize phytochrome C in regulating flowering time and plant height // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2520.
83. Chuck G., Cigan A.M., Saeteurn K., Hake S. The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. P. 544.
84. Chuck G., Whipple C., Jackson D., Hake S. The maize SBP-box transcription factor encoded by *tasselsheath4* regulates bract development and the establishment of meristem boundaries // *Development*. 2010. V. 137. P. 1243.
85. Chuck G.S., Brown P.J., Meeley R., Hake S. Maize SBP-box transcription factors *unbranched2* and *un-*

- branched3 affect yield traits by regulating the rate of lateral primordia initiation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 18775.
86. *Unterseer S., Pophaly S.D., Peis R., Westermeier P., Mayer M., Seidel M.A., Haberer G., Mayer K.F., Ordas B., Pausch H., Tellier A., Bauer E., Schön C.C.* A comprehensive study of the genomic differentiation between temperate Dent and Flint maize // Genome Biol. 2016. V. 17: 137.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-1009-x>
87. *Bomblies K., Doebley J.F.* Pleiotropic effects of the duplicate maize FLORICAULA/LEAFY genes zfl1 and zfl2 on traits under selection during maize domestication // Genetics. 2006. V. 172 P. 519.
88. *Danilevskaya O.N., Meng X., Selinger D.A., Deschamps S., Hermon P., Vansant G., Gupta R., Ananiev E.V., Muszynski M.G.* Involvement of the MADS-box gene ZMM4 in floral induction and inflorescence development in maize // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 2054.
89. *Zeng W., Shi J., Qiu C., Wang Y., Rehman S., Yu S., Huang S., He C., Wang W., Chen H., Chen C., Wang C., Tao Z., Li P.* Identification of a genomic region controlling thermotolerance at flowering in maize using a combination of whole genomic re-sequencing and bulked segregant analysis // Theor. Appl. Genet. 2020. V. 133. P. 2797.
90. *Galic V., Franic M., Jambrovic A., Ledencan T., Brkic A., Zdunic Z., Simic D.* Genetic Correlations Between Photosynthetic and Yield Performance in Maize Are Different Under Two Heat Scenarios During Flowering // Front. Plant Sci. 2019. V. 10: 566.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00566>
91. *Castelletti S., Coupel-Ledru A., Granato I., Palaffre C., Cabrera-Bosquet L., Tonelli C., Nicolas S.D., Tardieu F., Welcker C., Conti L.* Maize adaptation across temperate climates was obtained via expression of two florigen genes // PLoS Genet. 2020. V. 16: 1008882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008882>
92. *Lütz C.* Cell physiology of plants growing in cold environments // Protoplasma. 2010. V. 244. P. 53.

УДК 581.1

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ПОЛИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2022 г. С. В. Осипова^{a, b, *}, Р. М. Островская^b, А. В. Третьякова^b^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

*e-mail: svetlanaosipova2@mail.ru

Поступила в редакцию 29.09.2021 г.

После доработки 29.09.2021 г.

Принята к публикации 30.09.2021 г.

Засухоустойчивость растений — сложный количественный признак, в формировании которого участвует множество генов. На примере аллогексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) описаны подходы к изучению механизмов засухоустойчивости полиплоидных растений и их генетической и геномной архитектуры от картирования локусов количественных признаков (QTL) на хромосомах до профилирования транскриптомов и выявления стабильных блоков гаплотипов, благоприятных для урожайности в разных условиях доступности воды. Анализ функций идентифицированных кандидатных генов позволил экстраполировать молекулярные события при адаптации к засухе и выявлять уникальные для сортов стратегии адаптации, а также указал на решающую роль перепрограммирования транскрипции в процессе адаптации. Для контроля экспрессии генов функционально важна их физическая ассоциация, однако влияние пространственной организации хроматина и ко-регуляторов транскрипции на экспрессию генов, контролируемых ключевые хозяйственно-ценные признаки сельскохозяйственных растений, все еще плохо изучено. Ограничено также наше понимание специфики экспрессии генов-гомеологов, участвующих в адаптации к дефициту воды.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, адаптация к засухе, генетическая и геномная архитектура засухоустойчивости, гены-гомеологи, кандидатные гены, профилирование транскриптома, QTL-картирование

DOI: 10.31857/S0015330322020142

ВВЕДЕНИЕ

Засуха является одним из самых жестких абиотических стрессоров, вызывающих серьезные, иногда катастрофические, потери урожая сельскохозяйственных культур. Актуальность проблемы возрастает в связи с высокими рисками потерь урожаев основных зерновых культур (пшеницы, кукурузы и риса) из-за засух различной интенсивности на протяжении XXI в. [1, 2]. Считается, что эффективно противостоять засухам можно путем создания и внедрения засухоустойчивых генотипов сельскохозяйственных растений, причем лучшие результаты может дать не прямой отбор только по урожайности в неблагоприятных условиях, а комплексная стратегия с учетом морфологических, физиологических и биохимических признаков засухоустойчивости [3].

Растения отвечают на стресс из-за дефицита воды изменениями на разных уровнях организа-

ции. На морфологическом уровне уменьшается их размер, снижается площадь и количество листьев, увеличивается соотношение корень/лист; на физиологическом уровне происходит закрытие устьиц и снижение фотосинтеза, скорости транспирации, устьичной проводимости, относительного содержания воды, изменение клеточной стенки, увеличение окислительного стресса и альтернативного пути транспорта электронов в митохондриях; на биохимическом уровне снижается эффективность Рубиско и фотохимическая эффективность, активизируются системы антиоксидантной защиты, накапливаются абсцизовая кислота, пролин, полиамины, углеводы, стрессовые белки [4]. Первым о необходимости принимать во внимание физиологические признаки в процессе селекции на засухоустойчивость заявил D. Passioura [5]. Он предлагал использовать такие признаки как высокое относительное содержание воды, ремобилизация углеводных резервов,

феномен “stay green“, связанный с задержкой старения флаговых листьев. Позже в селекционных программах стали использовать интегральный физиологический показатель – дискриминацию изотопов углерода ($\Delta^{13}\text{C}$), который у С3-растений связан с фотосинтетическим газообменом и коррелирует с эффективностью использования воды на протяжении онтогенеза [6]. С развитием флуоресцентных методов все чаще стали проводить мониторинг физиологического состояния фотосинтетического аппарата путем анализа индукционных кривых переменной флуоресценции хлорофилла [7]. В настоящее время, кроме перечисленных выше, используют следующие признаки: антиоксидантную активность, общее содержание фенолов и пролина [8], температуру полога, чувствительность к эндогенным гиббереллинам, определяющую высоту растений, содержание хлорофиллов, состав кутикулярных восков [2]. Эти признаки, наряду с оценкой фенотипа с помощью различных инструментов высокопроизводительного фенотипирования, являются хорошими кандидатами для отбора устойчивых генотипов.

В последние два десятилетия наблюдается значительный прогресс в понимании многогранности и сложности молекулярных процессов, помогающих растению адаптироваться и выживать в условиях засухи. Показано, что дефицит воды вызывает натяжение плазматической мембраны и повышение внеклеточного осмотического потенциала, что запускает открытие Ca^{2+} проницаемых каналов и приток ионов кальция в течение нескольких секунд после восприятия изменившихся условий [9]. Далее кальциевый сигнал передается на кальциевые белки-сенсоры (кальмодулин, кальмодулин-подобные белки, кальцинейрин-В-подобные белки) и взаимодействующие с ними Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, которые осуществляют декодирование и дальнейшую трансдукцию кальциевого сигнала на белки-мишени – транскрипционные факторы, ионные помпы, ферменты углеродного и азотного метаболизма и др. [10]. В дальнейшем в передаче информации об изменившихся условиях используются также активные формы кислорода, митоген-активируемые протеинкиназы, протеинфосфатазы, фитогормоны, микроРНК, различные факторы транскрипции, ферменты, участвующие в метаболизме фосфолипидов и другие молекулы [11–14]. В ответ на активацию сигналов засухи у растений индуцируется синтез многих функциональных белков, таких как дегидрины, осмотин, антифризные белки, мРНК-связывающие белки, ключевые ферменты биосинтеза осмолитов, транспортёры сахаров и пролина, ферменты детоксикации, среди которых антиоксиданты, обеспечивающие поддержание баланса АФК, различные протеазы и другие белки [11, 15, 16]. Таким образом, на молекулярном уровне засухоустойчивость растений форми-

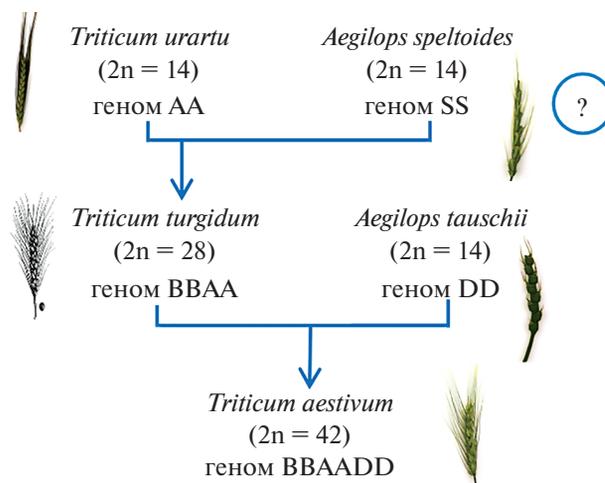


Рис. 1. Происхождение гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* (BBAADD). Субгеномы А, В и D в геноме мягкой пшеницы называют гомеологичными геномами. 1А,1В,1D; 2А,2В,2D; 3А,3В,3D; 4А,4В,4D; 5А,5В,5D; 6А,6В,6D; 7А,7В,7D – группы гомеологичных хромосом. Триады гомеологов ABD – копии одного и того же гена в субгеномах А, В и D.

руется множеством генов и регуляторных путей, перекрестные взаимодействия которых создают сложные генные сети.

Для прогресса в создании устойчивых генотипов растений с полиплоидным геномом, таких как мягкая пшеница, необходимо понимание генетической и геномной архитектуры засухоустойчивости [17]. Мягкая (хлебная) пшеница (*Triticum aestivum* L.) представляет собой аллогексаплоид (BBAADD, $2n = 42$), возникший в результате естественной межвидовой гибридизации различных диплоидных видов [18] (рис. 1). Из-за огромного размера (16 Гб), высокой степени сходства последовательностей между гомеологичными геномами А, В и D (95–99% в кодирующих последовательностях) и большой доли повторяющейся ДНК (>80%) геном пшеницы был секвенирован и аннотирован одним из последних среди геномов основных сельскохозяйственных культур. В 2018 г. Международный консорциум по секвенированию генома пшеницы представил аннотированный референсный геном с подробным анализом содержания генов в субгеномах и структурной организации всех хромосом [19]. Секвенированный геном мягкой пшеницы активно используют для идентификации генов в локусах количественных признаков, ассоциированных с физиологическими признаками устойчивости; для полногеномного анализа отдельных генных семейств, участвующих в регуляции ответа на засуху; для выявления тканеспецифичных сетей экспрессии и коэкспрессии генов во время развития мягкой пшеницы и адаптации к воздействию стрессовых факторов. Полигенный характер признака “засухо-

устойчивость” и полиплоидный геном мягкой пшеницы требуют интеграции физиологических, генетических и геномных подходов в исследованиях механизмов адаптации к засухе этой культуры и разработке путей улучшения сортов. Наряду с отбором по фенотипу развиваются маркер-ориентированная селекция и геномная селекция пшеницы.

Цель обзора — анализ современного состояния исследований засухоустойчивости у гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum*.

КАРТИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ НА ХРОМОСОМАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

С 1990-х гг. базовым подходом для изучения генетического контроля полигенных признаков стало картирование геномных областей (локусов количественных признаков, QTL) с использованием специально созданных картирующих популяций пшеницы и молекулярных маркеров (рис. 2), среди которых наиболее популярными были микросателлитные маркеры [20]. С развитием технологий секвенирования доминирующие позиции в геномных исследованиях пшеницы занял полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) между однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) и фенотипическими признаками [21]. За последние 30 лет появилось несколько тысяч исследований по идентификации QTL для множества признаков сельскохозяйственных растений, в т.ч. для агрономических, физиологических и метаболических признаков, ассоциированных с засухоустойчивостью, и предложены кандидатные гены для практического использования [22–24].

В 2015 г. был опубликован мета-анализ QTL, ассоциированных с физиологическими признаками и продуктивностью мягкой пшеницы в условиях засухи и температурного стресса [25]. Целью анализа была интеграция многочисленных данных по картированию QTL из разных экспериментов, проведенных на основе данных для 24 различных картирующих популяций пшеницы размером от 34 до 249 линий. Мета-анализ был сфокусирован на таких признаках как дискриминация изотопов углерода, температура полога, фотосинтез, содержание растворимых углеводов, водный статус, биомасса, компоненты урожая, скорость развития пшеницы в условиях стресса. Анализ показал, что QTL были неравномерно распределены между семью гомеологичными группами хромосом. Больше число QTL (163) было идентифицировано на хромосомах второй гомеологичной группы, меньше число (92) — на хромосомах группы 6. QTL были также неравномерно распределены между хромосомами пшеницы: от 11 на хромосоме 3D до 72 на хромосоме 2B. В границах 23 идентифицированных мета-QTL были локализованы 50 SNP

маркеров для генов ответа на засуху и тепловой стресс. Среди кандидатных генов (КГ) были гены, реагирующие на АБК и участвующие в контроле устьичных реакций на стресс, гены, вовлеченные в метаболизм углеводов и гены, функции которых в устойчивости пшеницы не были очевидны, т.к. не была изучена их экспрессия при стрессе [25]. Другой мета-анализ QTL, ассоциированных с засухоустойчивостью мягкой пшеницы, был сфокусирован на признаках архитектуры корневой системы. Он был проведен на основе 634 QTL, полученных из 30 предыдущих исследований [26]. В результате были идентифицированы 94 консенсусные области QTL, из которых 35 были связаны с архитектурой корня в контрастных условиях водообеспечения. Число QTL на хромосому варьировало от 7 на хромосоме 3D до 63 на хромосоме 2B, 8 мета-QTL на семи хромосомах (1A, 1B, 2A, 2B, 3B, 4B, 6A) были предложены для использования в селекции для улучшения засухоустойчивости пшеницы через архитектуру корня. Среди множества КГ, выявленных в анализе, наиболее часто встречались гены, кодирующие убиквитинлигазы E3, белки с доменом F-бокса, гликозилтрансферазы и богатый гидроксипролином гликопротеин позднего эмбриогенеза (LEA), реже — пероксидазы, белки, содержащие пентатрикопептидные повторы, белки с NAC доменами и доменами цинковых пальцев [26]. Следует отметить, что оба мета-анализа выявили наибольшее число QTL для фенотипических признаков засухоустойчивости на хромосоме 2B. Критическая роль хромосом второй гомеологичной группы в засухоустойчивости мягкой пшеницы была показана и в наших работах; замещение любой из хромосом гомеологичной группы 2 от влаголюбивого сорта пшеницы Янецкис Пробат значительно снижало засухоустойчивость адаптированного к водному дефициту сорта Саратовская 29 [27]. Используя две картирующие популяции мягкой пшеницы, мы идентифицировали хорошо воспроизводимые гомеологичные локусы на хромосомах 2D и 2A, ассоциированные с вариабельностью параметров газообмена, флуоресценции хлорофилла и биохимических индикаторов устойчивости к засухе [28, 29]. На хромосомах второй гомеологичной группы были идентифицированы позиции маркеров и значимые QTL, ассоциированные с относительным содержанием воды в листьях [30], содержанием фотосинтетических пигментов [31] и продуктивностью в условиях водного дефицита и высоких температур [32–34]. Из десяти выявленных в геноме пшеницы QTL, ассоциированных с поддержанием фертильности пыльцы в условиях осмотического стресса, локус с самым большим вкладом в изменчивость этого признака был идентифицирован на хромосоме 2A [35].

С появлением аннотированного генома мягкой пшеницы [19] QTL-анализ стал более точ-

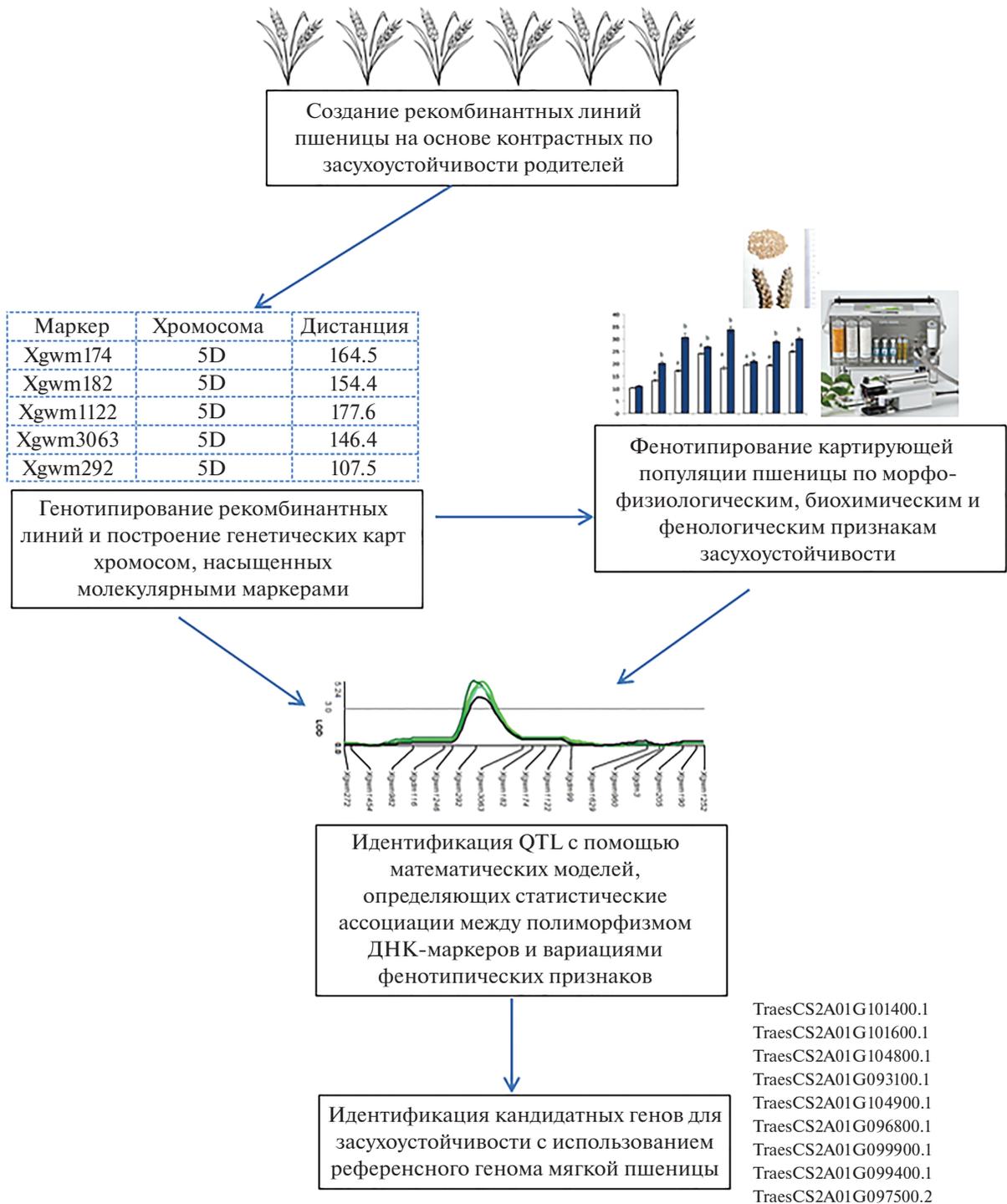


Рис. 2. Идентификация кандидатных генов для засухоустойчивости пшеницы через картирование локусов количественных признаков (QTL).

ным, позволяющим выявить гены и генные сети в области QTL, идентифицируемого по признаку, и экстраполировать молекулярные механизмы, вовлеченные в ответные реакции на стресс и засухоустойчивость. Были разработаны методы для определения приоритетности генов-канди-

датов на основе анализа их функций по генным онтологиям (ГО), что позволило значительно сократить их количество [36]. Примером может служить проведенное нами картирование локусов количественных признаков, ассоциированных с физиологическими признаками засухоустойчи-

вости и урожайностью в контрастных условиях водообеспечения на хромосоме 2A. В этой работе было идентифицировано 56 QTL, из которых 51 были сгруппированы в пять кластеров, размер которых варьировал от двух до шести сантиморган [29]. Используя последнюю сборку генома пшеницы [19], были отобраны 39 генов, которые соответствуют терминам ГО, связанным с ответом на засуху со стороны фотосинтетического аппарата и на окислительный стресс и метаболизмом липидов. Почти половина (18) из этих КГ были факторами транскрипции (ТФ). Одиннадцать из них принадлежали к мультигенным семействам факторов транскрипции AP2/EREBR, bZIP, MYB/MYC, NAC и WRKY, роль которых в зависимых и независимых от АБК путях ответа на засуху хорошо изучена у арабидопсиса и основных сельскохозяйственных культур – пшеницы, риса, кукурузы [12]. Кроме того, выявлен ген фактора транскрипции семейства EIN3/EIL, играющего ключевую роль в сигнальном пути этилена, и ген семейства GRAS подсемейства DELLA, участвующий в гормональных сигнальных путях, опосредованных гибберелловой, жасмоновой, абсцизовой, салициловой кислотами и этиленом. Среди структурных генов, участвующих в работе фотосинтетического аппарата, в обнаруженных нами QTL были: ген, кодирующий малую субъединицу Рубиско, гены белка светособирающего комплекса ФС II Lhcb6, ген белка-переносчика электронов в ФС II PsbQ-like 1 и ген криптохрома. В целом, функции большинства выявленных КГ были связаны с регуляцией путей гормональной сигнализации, большая часть – с регуляцией АБК-сигнализации, а также с сигнальными путями этилена, ауксина, жасмоновой, салициловой и гибберелловой кислот [29]. В границах значительного числа опубликованных QTL, ассоциированных с урожайностью и физиологическими признаками при дефиците воды, были локализованы гены-гомологи арабидопсиса, кодирующие факторы транскрипции и сигнальные молекулы. Отсюда появились идеи использовать эти гены для улучшения засухоустойчивости пшеницы [15, 37]. Однако факт локализации в пределах значимого QTL генов, хорошо изученных у модельных растений, таких как арабидопсис или рис, недостаточен для установления его функций у пшеницы, поскольку для полиплоидных геномов характерна гомеолог-специфичная экспрессия триад гомеологичных генов. Например, инфекция мучнистой росы индуцирует экспрессию *TaCprk2-A1* (ген кальций-зависимой протеинкиназы *TaCprk2*), тогда как экспрессия *TaCprk2-D1* в основном индуцируется низкими температурами [38]. Эту специфику можно выявить лишь анализом экспрессии транскриптома.

Благодаря поиску QTL постепенно прояснялась картина геномной архитектуры признаков, ассоциированных с устойчивостью, однако чет-

кого понимания молекулярной основы большинства QTL, используемых селекционерами, в отношении пшеницы пока нет [39]. Несмотря на это, маркеры, ассоциированные с целевыми признаками и выявленные в работах по картированию QTL, могут быть вовлечены в процесс маркер-ориентированной селекции (МОС) [21, 40].

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Начиная с 2005 г. активно развиваются и удешевляются технологии секвенирования нового поколения, благодаря чему анализ транскриптома мягкой пшеницы в условиях стресса в сочетании с опубликованными данными по картированию QTL и референсным геномом становится важнейшим инструментом для понимания механизмов и геномной архитектуры засухоустойчивости. Такой комплексный подход использовался в работе Galvez с соавт. [17] при изучении реакций на водный стресс разной интенсивности мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг, выращенной в поле. Для оценки степени стресса растений в этой работе применяли спектральные характеристики, позволяющие проводить фенотипирование в полевых условиях.

Анализом коэкспрессии 30180 генов были выявлены геномные регионы, в которых размещены компактные кластеры генов, дифференциально экспрессирующихся в условиях засухи. Эти генные кластеры были расположены, главным образом, в дистальных областях хромосом и были названы кластерами зависимых от засухи генов (КЗЗГ). Условиями, при которых данный кластер генов считался КЗЗГ, были следующими: 1) не менее трех генов должно находиться в области 1 Мб, 2) каждый ген должен принадлежать к триаде гомеологов ABD и 3) кластер должен включать хотя бы один ген, дифференциально экспрессирующийся в условиях засухи. Примерно 65% всех экспрессируемых триад генов показали сбалансированную экспрессию между субгеномами A, B и D независимо от условий водообеспечения. В кластерах зависимых от засухи генов лишь 30% триад ABD показали сбалансированную экспрессию, а 70% триад имели более высокую или более низкую экспрессию одного гомеолога относительно двух других. Несбалансированность экспрессии гомеологов в кластерах зависимых от засухи генов была более выраженной по мере того, как увеличивался уровень стресса от засухи. Это указывает на то, что гомеолог-специфичная экспрессия КЗЗГ играет важную роль в ответах на стресс, вызванный засухой [17].

Понимание отношений между гомеологами имеет большое значение для улучшения засухо-

устойчивости полиплоидной пшеницы, т.к. изменчивость многих количественных признаков модулируется генетическими взаимодействиями между множеством наборов гомеологов в субгенах А, В и D. Дополнительную сложность добавляет специфичность экспрессии гомеологов. Ramirez-Gonzalez с соавт. [41] показали, что паттерны экспрессии гомеологов в мягкой пшенице сформированы полиплоидией и связаны как с эпигенетическими модификациями, так и с вариациями в мобильных элементах в промоторах гомеологичных генов. Ramirez-Gonzalez и Borrill с соавт. [39, 41] считают, что понимание функций аллельных вариантов у гомеологов и управление ими может открыть широкий спектр фенотипических вариаций, которые ранее оставались за рамками селекции и естественного отбора, и раскрыть весь потенциал полиплоидной пшеницы.

Galvez с соавт. [17] выявили множество генных кластеров, семейств генов, микроРНК, репертуар которых различался в зависимости от интенсивности стресса, а также факторы транскрипции, координирующие ответы на засуху. Особое внимание авторы уделили семейству генов дегидринов, учитывая известную роль дегидринов в засухоустойчивости растений [42]. Из 50 генов дегидрина 37 были сгруппированы на хромосомах 5 и 6 групп. 13 генов дегидринов сверхэкспрессировались в ответ на засуху во флаговом листе, 11 из них были расположены на длинном плече хромосом группы 6, а остальные два – на длинном плече хромосомы 5В. Основной кластер дегидрина на хромосомах группы 6 соответствовал K33G, который находится в том же физическом положении, что и ранее известный мета-QTL для засухоустойчивости пшеницы на хромосомах 6В и 6D [25], что значительно повышает надежность их использования при создании засухоустойчивых сортов. Кроме того, на длинных плечах хромосом группы 5 была идентифицирована область размером примерно 50 Мб, содержащая несколько чувствительных к засухе дифференциально экспрессирующихся генов (в т.ч. кластер генов дегидрина) и ранее выявленные Quaglie с соавт. [43] гены, регулирующие индуцируемую засухой продукцию АБК. Этот интервал также содержал главный ген яровизации *Vrn 1*, который влияет на архитектуру корневой системы пшеницы [44]. Таким образом, профилированием транскриптома в геноме пшеницы были верифицированы локусы, ранее выявленные путем QTL-картирования.

Сравнение экспрессии генов в условиях полевой засухи и в экспериментах с моделируемым стрессом с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) показало, что почти половина (47%) идентифицированных дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) в ответ на засуху генов были выявлены только в условиях полевой засухи [17]. Это свидетельствует о том, что исследования геномной архи-

тектуры засухоустойчивости пшениц должны быть максимально приближены к естественным условиям их произрастания в регионах возделывания.

Аннотированный референсный геном пшеницы сорта Чайниз Спринг [19] не может полностью отразить внутривидовые геномные вариации, несмотря на то, что он является чрезвычайно ценным ресурсом. Сравнительный анализ геномного разнообразия среди 15 разных селекционных линий пшеницы из мировых генных банков выявил крупномасштабные рекомбинации в хромосомах и различия в содержании генов в результате сложных историй селекции, направленных на улучшение адаптации к различным условиям окружающей среды, урожайности и качества зерна [45]. Вероятно, этими различиями объясняется разнообразие стратегий адаптации разных сортов пшеницы. Секвенирование РНК демонстрирует существенные различия в транскриптомном ответе на стресс у сортов пшеницы из разных географических регионов. Так, в ответ на дефицит воды у пшеницы Саратовская 29, засухоустойчивого сорта степного волжского экотипа, повышалась экспрессия АТФаз семейства ААА, сигнальных и регуляторных белков с доменом F-бокса, белков суперсемейства α/β гидролаз, abc – транспортеров. А пшеница Янецки Пробат, которая считается чувствительным к засухе сортом, характеризовалась снижением экспрессии трансмембранных переносчиков аминокислот [46]. Даже сорта, хорошо адаптированные к условиям одного и того же географического региона, такие как засухоустойчивые сорта озимой пшеницы TAM 111 и TAM 112, знаковые для южных районов США, могут реализовывать разные механизмы засухоустойчивости [47]. Более 50% ДЭ генов в разных условиях доступности воды были обнаружены у обоих сортов, что свидетельствует о наличии у них консервативной регуляторной сети. Однако экспрессия других генов существенно различалась. Это касалось генов, участвующих в процессах фосфорилирования белков, генов с функцией связывания аденил-рибонуклеотида или генов, кодирующих белки с функциями регуляции транскрипции и трансмембранного транспорта. В условиях засухи экспрессия этих генов у TAM 111 была снижена по сравнению с TAM 112, что говорит о том, что TAM 112 имел относительно более активную регуляцию экспрессии генов, чем TAM 111 [47]. На уровне фенотипа это проявлялось в более высокой эффективности использования воды и более высокой урожайности при продолжительной засухе. У TAM 111 при водном дефиците было больше стерильных колосков в колосе. Вероятно, сниженная экспрессия специфических ДЭ генов в условиях засухи помогала TAM 111 экономить больше энергии для транспортировки углеводов от стеблей и колосьев к зернов-

кам или даже приводила к корректировке экспрессии генов, чтобы вызвать прерывание развития семян в некоторых колосках для сохранения общего урожая [47].

Chaichi с соавт. [48] с помощью секвенирования РНК выявили стратегию адаптации староместного сорта пшеницы путем избегания засухи. В другом исследовании двух контрастных по устойчивости к засухе сортов пшеницы было показано, что среди ДЭ генов устойчивого генотипа было большое число генов, контролирующих сигнальную трансдукцию и активность митоген-активированной протеинкиназы. Кроме того, у засухоустойчивого и чувствительного генотипов в условиях засухи было выявлено, соответственно, 32 и 2 сайта редактирования РНК. Это свидетельствует о том, что редактирование РНК играет важную роль в засухоустойчивости у пшеницы [49].

Засуха в первую очередь воспринимается корнями растений. Анализом транскриптома тканей корней пшеницы, выращенной в поле, были выявлены механизмы контроля засухи от восприятия дефицита воды, внутриклеточной передачи сигнала, опосредованной серин/треонин-протеинкиназой SRK, передачи сигналов АБК вместе с активацией сигнального пути салициловой кислоты, ответа на окислительный стресс, до обезвреживания АФК, поддержания энергетического баланса, закрытия устьиц, регуляции клеточной стенки, защитного ответа и, наконец, старения [50]. Была обнаружена повышенная экспрессия генов вторичных метаболитов, которые необходимы для противостояния осмотическому и окислительному стрессам, а также генов, кодирующих факторы транскрипции bHLH, MYB, WRKY, NAC и FAR1. Роль последних в засухоустойчивости пшеницы может быть связана с уменьшением накопления активных форм кислорода и гибели клеток, вызванной окислительным стрессом [51]. Была обнаружена также повышенная экспрессия нескольких десятков микроРНК, участвующих в регуляции ответов на засуху. ПЭГ-индуцированный стресс в корнях проростков засухоустойчивой мягкой пшеницы также значительно влиял на экспрессию 37 микроРНК, мишени которых включали 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, эпоксицидгидролазу, сахарозсинтазу, фитохром и белок, регулирующий время цветения [52].

Факторы транскрипции пяти мультигенных семейств AP2/EREBP, bZIP, MYB/MYC, NAC и WRKY считаются основной группой регуляторов транскрипции, отвечающих за устойчивость растений к абиотическим стрессам [12]. Гены этих семейств были выявлены путем профилирования транскриптома [17, 50], а также обнаружены в границах QTL, ассоциированных с морфо-физиологическими признаками засухоустойчивости

[29]. Среди них большое внимание привлекают ТФ DREB (AP2/EREBP) в связи с большим числом сообщений об их центральной роли в устойчивости и многочисленным попыткам применить гены *DREB* в генной инженерии для повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам [15, 37]. Всего у мягкой пшеницы было выявлено 210 генов *DREB*, которые были неравномерно распределены в геноме [53]. Экспрессия трех гомеологичных генов *TaDREB3* индуцировалась абиотическими стрессами. Трансгенный арабидопсис, сверхэкспрессирующий *TaDREB3-AI*, продемонстрировал повышенную устойчивость к засухе, солевому и тепловому стрессу. Shavrukov с соавт. [54] обнаружили существенную разницу в уровнях экспрессии генов *TaDREB5* в листьях казахстанских пшениц с разной урожайностью в условиях засухи. В группе из шести сортов пшениц с высоким урожаем зерна была показана небольшая активация транскриптов *TaDREB5* в обезвоженных листьях. Напротив, экспрессия *TaDREB5* в растениях из группы сортов с низким урожаем зерна (6 сортов) была значительно подавлена. Однако использование в инженерии стрессоустойчивости пшеницы генов *DREB* часто отрицательно влияло на урожайность, что объяснялось перераспределением энергопотребления между ростом и развитием и стрессоустойчивостью, поэтому факторы транскрипции DREB чаще используют в случаях, когда основной целью является выживание растений в стрессовых условиях, а урожай не так важен [37].

Факторы транскрипции семейства NAC также рассматриваются как кандидаты для улучшения устойчивости сельскохозяйственных культур к неблагоприятным условиям окружающей среды. Guegin с соавт. [55], используя общедоступную базу данных IWGS RefSeq v1.0, идентифицировали 488 членов семейства NAC у мягкой пшеницы и выявили равномерное распределение генов *TaNAC* в трех субгеномах пшеницы. Паттерны экспрессии 23 генов *TaNAC* обнаружили функциональную диверсификацию членов этого семейства генов. Были выявлены пять специфичных для зерна генов *TaNAC*, функциональные характеристики которых позволяют предположить, что они участвуют в развитии зерна пшеницы и в ответах на абиотический стресс.

Хорошим примером использования фактора транскрипции семейства NAC для получения трансгенной пшеницы с улучшенными параметрами засухоустойчивости является работа Chen с соавт. [56], в которой на основе данных секвенирования транскриптомов *de novo* проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. были идентифицированы 43 гена семейства факторов транскрипции NAC, индуцируемые засухой. Было показано, что транскрипт *TaNAC48* активировался засухой, обработкой ПЭГ, H₂O₂ и АБК. Сверхэкспрессия

TaNAC48 увеличивала чувствительность растений к АБК и значительно улучшала устойчивость трансгенных растений к засухе, но не солевому стрессу. При этом повышалось содержание пролина, снижалась скорость потери воды, накопление малонового диальдегида и H_2O_2 . В то же время в этом исследовании трансгенные растения не показали различий с диким типом в архитектуре растений и урожайности зерна при оптимальном поливе. Длина корня, длина побегов и устьица трансгенных растений были более чувствительны к АБК. Было показано также, что ген *TaAREB3* может связываться с цис-действующим АБК-чувствительным элементом (ABRE) на *TaNAC48* промоторе и активировать экспрессию *TaNAC48*. На основании этих данных авторы полагают, что *TaNAC48* может участвовать в регулировании засухоустойчивости посредством АБК-опосредованного сигнального пути.

Мао с соавт. [57] провели анализ ассоциаций с засухоустойчивостью чувствительных к стрессу генов-кандидатов семейства *NAC* в панели пшеницы, состоящей из 700 сортов, собранных по всему миру. Был идентифицирован ген *TaSNAC8-6A*, который тесно связан с засухоустойчивостью у проростков пшеницы. Трансгенная пшеница и линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие *TaSNAC8-6A*, показали повышенную засухоустойчивость за счет индукции сигнальных путей ауксина и стимуляции развития боковых корней, что впоследствии повысило эффективность использования воды. Был выявлен благоприятный аллель *TaSNAC8-6AIn-313*, который в значительной степени способствует устойчивости пшеницы к засухе и представляет собой ценный генетический ресурс.

Таким образом, анализ экспрессии генов в сочетании с данными картирования QTL и аннотированной референсной последовательностью мягкой пшеницы помогает выявить как универсальные, так и уникальные для сортов стратегии адаптации к засухе, а также новые кандидатные гены и благоприятные аллели, которые можно использовать для улучшения пшеницы биотехнологическими методами или с помощью маркер опосредованной селекции. Для отбора благоприятных аллелей используют аллель-специфичные маркеры, способствующие засухоустойчивости в определенных популяциях пшеницы. Так, Khalid с соавт. [58] идентифицировали благоприятные аллели пяти генов-кандидатов, связанных с адаптацией к засухе, в т.ч. гена инвертазы клеточной стенки (*TaCwi-1A*), которые можно использовать в МОС. Вероятно, маркеры к этим аллелям, к аллелю *TaSNAC8-6AIn-313* или к генам *TaNAC48* и *TaDREB5*, описанным выше, также могут быть хорошими кандидатами для МОС.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В ЭПОХУ ПОСГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Достижения в области секвенирования и сборки геномов помогают идентифицировать широкий спектр генетической изменчивости и связать генетическое разнообразие (QTL, SNP-маркеры, блоки гаплотипов) с различными фенотипическими признаками. Недорогие платформы генотипирования теперь доступны для всех сельскохозяйственных культур, важных с точки зрения агрономии [59]. Вместе с развивающимися методами обработки больших данных и биоинформатики они обеспечивают эффективные средства для генетических исследований сельскохозяйственных культур и помогают понять молекулярные механизмы засухоустойчивости [17, 60, 61].

Чтобы вывести улучшенные сорта пшеницы, селекционеры манипулируют с аллельными вариантами генов, которые чаще всего наследуются не независимо, а как блоки гаплотипов, включающие в себя несколько генов, находящихся в генетическом сцеплении. Будучи мультиаллельными, гаплотипы более информативны, чем биаллельные SNP-маркеры, и позволяют идентифицировать генетические локусы, лежащие в основе признаков с относительно высоким разрешением [62]. Для пшеницы пока очень мало исследований, посвященных гаплотипам, хотя считается, что полиплоидные виды являются главными бенефициарами этой технологии, и разработка маркеров к полезным блокам гаплотипов поможет более эффективно интегрировать благоприятные гены в новые сорта пшеницы. Так, в коллекции из 102 сортов аргентинских гексаплоидных пшениц было выявлено 1268 блоков гаплотипов разного размера, распределенных по геному, включая высококонсервативные области. Ген *Ppd-D1* на хромосоме 2D идентифицирован как главный детерминант жизненного цикла аргентинских сортов пшеницы в условиях адаптации [63]. Показательным является обширное исследование полногеномных ассоциаций (GWAS) с использованием гаплотипов и индивидуальных SNP, выполненное для зерновой урожайности и стабильности урожая в разных условиях водообеспечения учеными Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT) и Канзасского университета [64]. В течение семи вегетационных сезонов от 643 до 1086 перспективных линий пшеницы испытывались в нескольких контрастных условиях: оптимальный полив, умеренная засуха, суровая засуха и тепловой стресс. Линии были фенотипированы по зерновой урожайности, количеству дней до колошения и высоте растений и генотипированы с помощью маркеров GBS (genotyping by sequencing). Всего в геномах было установлено 519 блоков гаплотипов, количество аллелей в

каждом блоке варьировало от 3 (4D) до 143 (7A). Блоки были распределены в соответствии с длиной каждой хромосомы, наибольшая плотность маркеров была в геномах А и В (231 и 239, соответственно), а наименьшая – в геноме D (49). Наибольшее число блоков гаплотипов было получено на хромосомах 7A (51), за ними следовали хромосомы 2В и 7В (по 46 каждая), тогда как наименьшее количество было получено на хромосоме 4D (1). Для каждого из условий среды были идентифицированы благоприятные блоки гаплотипов, ассоциированные со значительным повышением урожайности. Идентифицировано 30 стабильных гаплотипов, благоприятных в нескольких средах и в каждый из семи вегетационных периодов, включая семь “hotspot” на хромосомах 1A, 1B, 2B, 4A, 5B, 6B и 7B, где несколько блоков гаплотипов на одной хромосоме были связаны с высокой урожайностью. Из 30 стабильных блоков гаплотипов восемь блоков соответствовали пяти мета-QTL, идентифицированным Аси́а-Galindo с соавт. [25]. Идентифицированы потенциальные гены-кандидаты, лежащие в основе стабильных блоков гаплотипов. В числе КГ были гены, экспрессия которых в пшенице в различных стрессовых условиях хорошо доказана, а также гены, роль которых в устойчивости к абиотическому стрессу доказана у модельных растений. Это гены, кодирующие ферменты с оксидоредуктазной, протеинкиназной, метилтрансферазной активностью, сигнальные пептиды, сериновые протеазы [64]. Среди КГ был ген, кодирующий белок с доменом DEK, который контролирует баланс между ростом и торможением роста у растений и животных посредством эволюционно консервативного механизма, связанного с ремоделированием хроматина. У *Arabidopsis thaliana* DEK3 специфически связывает гистоны H3 и H4, влияет на занятость нуклеосом и доступность хроматина и модулирует экспрессию генов-мишеней DEK3 [65]. Функциональные уровни DEK3 имеют решающее значение для устойчивости растений арабидопсиса к температурным стрессам [66].

Ген семейства F-бокса, отобранный в качестве КГ, принадлежит семейству генов, которые в большом количестве (1796) представлены в геноме пшеницы [67] и играют особую роль в регуляции деградации белков через убиквитин-протеасомный протеолитический механизм в ответ на различные сигналы в процессе роста и развития, сигналы гормонов и биотические/абиотические стрессовые реакции [68]. Несмотря на важную роль этих генов в регуляции развития растений и ответах на воздействие биотических и абиотических стрессоров, до последнего времени функциональный анализ генов F-бокса у пшеницы был проведен на уровне одного гена [69], поэтому необходимо дальнейшее исследование функций генов-кандидатов этого семейства. В списке КГ были также гены, кодирующие белки с JAZ (Jasmonate-zim)

доменом, которые являются репрессорами транскрипции в сигнальном пути жасмоновой кислоты и играют важную роль в регуляции роста и развития растений. Для пшеницы показано, что эти гены очень чувствительны к воздействию высокой засоленности, засухи и низких температур и могут участвовать в сложных регуляторных сетях [70]. Факторы транскрипции семейства MYB, которые также вошли в список КГ, у пшеницы систематически идентифицированы и проанализированы, многие R2R3-MYB пшеницы участвуют в реакциях на абиотический и биотический стресс [71]. Таким образом, в исследовании Seghal с соавт. [64] была выявлена сложная генетическая архитектура урожайности зерна в условиях засухи разной интенсивности, стабильные блоки гаплотипов, идентифицированы маркеры к благоприятным блокам гаплотипов и кандидатные гены, лежащие в основе стабильных блоков-гаплотипов и позволяющие определить молекулярные механизмы устойчивости. Польза подобных исследований для практической селекции очевидна. Генотипирование всех линий, участвующих в испытаниях урожайности, становится рутинной процедурой для программ CIMMYT и других селекционных программ. Линии с большим количеством благоприятных гаплотипов можно повторно включать в процесс селекции в качестве элитных родителей. Вместе с тем, это исследование дает много информации для понимания молекулярных механизмов засухоустойчивости, в частности, подчеркивает роль механизмов ремоделирования хроматина в регуляции экспрессии генов при адаптации к засухе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Идентификация кандидатных генов для засухоустойчивости мягкой пшеницы с помощью картирования локусов количественных признаков на хромосомах, профилирования транскриптома и использования аннотированного референсного генома помогает более полно экстраполировать картину молекулярных событий, имеющих место при адаптации к засухе. Значительная часть кандидатных генов, выявленных в описанных выше исследованиях, кодирует факторы и корегуляторы транскрипции, а также компоненты аппарата транскрипции, что указывает на решающую роль перепрограммирования транскрипции в процессе адаптации к засухе. После публикации референсного генома мягкой пшеницы появилось множество работ по полногеномному анализу факторов транскрипции. Однако данные о функциональной характеристике ТФ, вовлеченных в ответ на водный стресс, об их распределении в геноме и возможности использования в практической селекции или биотехнологии все еще ограничены.

Транскрипционная регуляция активно изучается на модельных растениях. Опубликовано значительное количество данных, подтверждающих важную роль в процессах адаптации к абиотическим и биотическим стрессам многосубъединичного комплекса МЕДИАТОР, который является коактиватором транскрипции за счет взаимодействия с РНК-полимеразой II и общими и специфическими факторами транскрипции [72]. Хорошо изучена субъединица MED25, которая, предположительно, является одной из самых многофункциональных субъединиц у растений и участвует в регуляции времени цветения, интеграции сигнальных путей гормонов, регуляции развития и устойчивости к стрессам [73]. У арабидопсиса определены стресс-специфические роли субъединиц MED9, MED16, MED18 и CDK8 в условиях жары, холода и солевого стресса [74]. Несмотря на очевидный прогресс в понимании роли МЕДИАТОРА в регуляции ответов растений на стрессовые условия, многое остается неизвестно, особенно ограничены знания о специфических функциях субъединиц комплекса МЕДИАТОР у сельскохозяйственных растений. У мягкой пшеницы была показана роль субъединицы TaMED25, локализованной на хромосомах 5A, 5B и 5D, в регуляции сигнального пути иммунного ответа на заражение мучнистой росой [75]. Niebert с соавт. [76] установили, что ген *SuSr-D1*, известный как супрессор устойчивости к стеблевой ржавчине, кодирует субъединицу медиатора Med15b.D. Эта работа демонстрирует сложность взаимодействий между субгенами пшеницы и определяет новый подход к повышению устойчивости к стеблевой ржавчине за счет удаления супрессоров. В целом же наше понимание того, в какой степени гены-гомеологи похожи или отличаются друг от друга по паттернам экспрессии и пространственно-временной динамике этих отношений, и как взаимодействия между гомеологами влияют на биологические признаки, на сегодняшний день ограничено.

В свете того, что конформация хроматина сильно влияет на экспрессию генов, активно развивается изучение пространственной организации хроматина. В недавнем исследовании Concia с соавт. [77] показано наличие в ядерном геноме мягкой пшеницы трех уровней крупномасштабной пространственной организации – расположение в территориях генома, разделение факультативного и конститутивного гетерохроматина и организация РНК-полимеразы II вокруг фабрик транскрипции. Авторы выявили в геноме пшеницы микрокомпартиментализацию транскрипционно активных генов путем физических взаимодействий между генами со специфическими модификациями эухроматических гистонов. Как внутри-, так и межхромосомные контакты, ассоциированные с РНК-полимеразой, включают гены с одинаковыми уров-

нями экспрессии. Это предполагает, что физическая ассоциация функционально важна для контроля экспрессии генов [77], однако влияние организации хроматина и ко-регуляторов транскрипции на экспрессию генов, контролируемых ключевыми хозяйственно-ценными признаками сельскохозяйственных растений, все еще плохо изучено. Для модельных растений показана также существенная роль АТФ-зависимых комплексов ремоделирования хроматина типа SWI/SNF в регуляции гормональных сигнальных путей [78], формировании “стрессовой памяти” [79] и регуляции взаимодействий между сигнальными путями АБК и шаперонов [80]. Исследования в этих направлениях необходимы для целостного понимания процессов адаптации мягкой пшеницы к неблагоприятным условиям и расширяют спектр потенциально благоприятных генов для практического использования. При создании улучшенных сортов для конкретных экологических условий необходимы также исследования сортоспецифичных стратегий адаптации пшеницы к разным сценариям засухи.

Полиплоидный геном мягкой пшеницы и полигенный характер признака “засухоустойчивость” определяют сложность выбора целевого гена, интрогрессия, трансформация или геномное редактирование которого приводили бы к повышению устойчивости без ущерба процессам роста и развития, хотя отдельные примеры удачного применения биотехнологических подходов имеются. Все же наиболее адекватными путями повышения засухоустойчивости гексаплоидной пшеницы считаются геномная и маркер-ориентированная селекция, выявление благоприятных и стабильных блоков гаплотипов и разработка надежных маркеров к ним. Секвенированная геномная последовательность мягкой пшеницы активно используется для этих целей.

Работа поддержана бюджетным проектом № 0277-2021-0002 Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Leng G., Hall J.* Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 654. P. 811. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.434>
2. *Khadka K., Earl H.J., Raizada M.N., Navabi A.* A physiomorphological trait-based approach for breeding drought tolerant wheat // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00715>

3. *Varshney R.K., Tuberosa R., Tardieu F.* Progress in understanding drought tolerance: from alleles to cropping systems // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 3175. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery187>
4. *Nezhadahmadi A., Proadhan Z.H., Faruq G.* Drought tolerance in wheat // *Sci. World J.* V. 2013. Article ID 610721. <https://doi.org/10.1155/2013/610721>
5. *Passiora J.B.* Grain-yield, harvest index and water-use of wheat // *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 1977. V. 43. P. 117.
6. *Condon A.G., Farquhar G.D., Richards R.A.* Genotypic variation in carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in wheat. Leaf gas exchange and whole plant studies // *Aust. J. Plant Physiol.* 1990. V. 17. P. 9.
7. *Goltsev V.N., Kalaji H.M., Paunov M. Baba W., Horaczek T., Mojski J., Kociel H., Allakhverdiev S.* Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 869. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050058>
8. *Upadhyay D., Budhlakoti N., Singh A.K., Bansal R., Kumari J., Chaudhary N., Padaria J.C., Sareen S., Kumar S.* Drought tolerance in *Triticum aestivum* L. genotypes associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation // *3 Biotech.* 2020. V. 10. P. 281. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02264-8>
9. *Liu X., Wang J., Sun L.* Structure of the hyperosmolality-gated calcium-permeable channel OSCA1.2 // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. Article ID 5060. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07564-5>
10. *Medvedev S.S.* Principles of calcium signal generation and transduction in plant cells // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 771. <https://doi.org/10.1134/S1021443718060109>
11. *Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.* Gene networks involved in drought stress response and tolerance // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 221. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>
12. *Gahlaut V., Jaiswal V., Kumar A., Gupta P.* Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerance cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129. P. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2794-z>
13. *Abhinandan K., Skori L., Stanic M., Hickerson N.M.N., Jamshed M., Samuel M.A.* Abiotic stress signaling in wheat – an inclusive overview of hormonal interactions during abiotic stress responses in wheat // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 734. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00734>
14. *Lamers J., van der Meer T., Testerink C.* How plants sense and respond to stressful environments // *Plant Physiol.* 2020. V. 182. P. 1624. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01464>
15. *Budak H., Hussain B., Khan Z., Ozturk N.Z., Ullah N.* From genetics to functional genomics: improvement in drought signaling and tolerance in wheat // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 1012. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01012>
16. *Samarah N.H.* Understanding how plants respond to drought stress at the molecular and whole plant levels // *Drought stress tolerance in plants* / Eds. M.A. Hossain et al. Springer, Cham. 2016. 616 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32423-4>
17. *Gálvez S., Mérida-García R., Camino C., Borrill P., Abrouk M., Ramírez-González R.H., Biyikliglu S., Amil-Ruiz F., The IWGSC, Dorado G., Budak H., Gonzalez-Dugo V., Zarco-Tejada P.J., Appels R., Uauy C.* et al. Hotspots in the genomic architecture of field drought responses in wheat as breeding targets // *Funct. Integr. Genomics.* 2019. V. 19. P. 295. <https://doi.org/10.1007/s12374-012-0377-3>
18. *Loginova D.B., Silkova O.G.* The genome of bread wheat *Triticum aestivum* L.: Unique structural and functional properties // *Russ. J. Genet.* 2018. V. 54. P. 403. <https://doi.org/10.1134/S1022795418040105>
19. *International Wheat Genome Sequencing Consortium.* Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome // *Science.* 2018. V. 361. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
20. *Kumar J., Gupta D.S., Gupta S., Dubey S., Gupta P., Kumar S.* Quantitative trait loci from identification to exploitation for crop improvement // *Plant Cell Rep.* 2017. V. 36. P. 1187. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2127-y>
21. *Салина Е.С.* Технологии геномного моделирования и редактирования для решения задач селекции // *Достижения науки и техники АПК.* 2016. Т. 30. С. 9.
22. *Kulkarni M., Soolanayakanahally R., Ogawa S., Uga Y., Selvaraj M.G., Kagale S.* Drought response in wheat: key genes and regulatory mechanisms controlling root system architecture and transpiration efficiency // *Front. Chem.* 2017. V. 5. P. 106. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.0010>
23. *Sallam A., Alqudah A.M., Dawood M.F.A., Baenziger P.S., Börner A.* Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3137. <https://doi.org/10.3390/ijms20133137>
24. *Khadka K., Raizada M.N., Navabi A.* Recent progress in germplasm evaluation and gene mapping to enable breeding of drought-tolerant wheat // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1149. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01149>
25. *Acuna-Galindo M.A., Mason E., Subramanian N.K., Hays D.B.* Meta-analysis of wheat QTL regions associated with adaptation to drought and heat stress // *Crop Sci.* 2015. V. 55. P. 477. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.11.0793>
26. *Soriano J.M., Alvaro F.* Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL meta-analysis // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 10537. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47038-2>
27. *Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Pshenichnikova T.A., Genaev M.A. Börner A.* The antioxidant enzymes activity in leaves of inter – varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 2455. <https://doi.org/10.1007/S11738-013-1280-3>

28. *Osipova S., Permyakov A., Permyakova M., Pshenichnikova T., Verkhoturov V., Rudikovskiy A., Rudikovskaya E., Shishparenok A., Doroshkov A., Boerner A.* Regions of the bread wheat D genome associated with variation in key photosynthesis traits and shoot biomass under both well watered and water deficient conditions // *J. Appl. Gen.* 2016. V. 57 P. 151.
<https://doi.org/10.1007/s13353-015-0315-4>
29. *Pshenichnikova T.A., Osipova S.V., Smirnova O.G., Leonova I.N., Permyakova M.D., Permyakov A.V., Rudikovskaya E.G., Konstantinov D.K., Verkhoturov V.V., Lohwasser U., Börner A.* Regions of chromosome 2A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) associated with variation in physiological and agronomical traits under contrasting water regimes // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1023.
<https://doi.org/10.3390/plants10051023>
30. *Ahmad M.A., Khan S.H., Khan A.S., Kazi A.M., Basra S.M.A.* Identification of QTLs for drought tolerance traits on wheat chromosome 2A using association mapping // *Int. J. Agric. Biol.* 2014. V. 16. P. 862. http://www.fspublishers.org/published_papers/86309_.pdf
31. *Czyczylo-Mysza I., Tyrka M., Marcińska I., Skrzypek E., Karbarz M., Dziurka M., Hura T., Dziurka K., Quarrie S.A.* Quantitative trait loci for leaf chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll and carotenoid contents in relation to biomass and yield in bread wheat and their chromosome deletion bin assignments // *Mol. Breed.* 2013. V. 32. P. 189.
<https://doi.org/10.1007/s11032-013-9862-8>
32. *Gao F., Wen W., Liu J., Rasheed A., Yin G., Xia X., Wu X., He Zh.* Genome-wide linkage mapping of QTL for yield components, plant height and yield-related physiological traits in the Chinese wheat cross Zhou 8425B/Chinese Spring // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 18.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01099>
33. *Parent B., Shahinnia F., Maphosa L., Berger B., Rabie H., Chalmers K., Kovalchuk A., Langridge P., Fleury D.* Combining field performance with controlled environment plant imaging to identify the genetic control of growth and transpiration underlying yield response to water-deficit stress in wheat // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5481.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv320>
34. *Saeed I., Chen X., Bachir D.G., Chen L., Hu Y.-G.* Association mapping for photosynthesis and yield traits under two moisture conditions and their drought indices in winter bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers // *Aust. J. Crop Sci.* 2017. V. 11. P. 248.
<https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.03.pne252>
35. *Dolferus R., Thavamanikumar S., Sangma H., Kleven S., Wallace X., Forrest K., Rebetzke G., Hayden M., Borg L., Smith A., Cullis B.* Determining the genetic architecture of reproductive stage drought tolerance in wheat using a correlated trait and correlated marker effect Model // *G3: Genes, Genomes, Genet.* 2019. V. 9. P. 473.
<https://doi.org/10.1534/g3.118.200835>
36. *Bargsten J.W., Nap J.P., Sanchez-Perez G.F., van Dijk A.D.* Prioritization of candidate genes in QTL regions based on associations between traits and biological processes // *BMC Plant Biol.* 2014. V. 14. Article ID 330.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0330-3>
37. *Agarwal P.K., Gupta K., Lopato S., Agarwal P.* Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 2135.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx118>
38. *Geng S., Li A., Tang L., Yin L., Wu L., Lei C., Guo X., Zhang X., Jiang G., Zhai W., Wei Y., Zheng Y., Lan X., Mao L.* TaCPK2-A, a calcium-dependent protein kinase gene that is required for wheat powdery mildew resistance enhances bacterial blight resistance in transgenic rice // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 3125.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert146>
39. *Borrill P., Adamski N., Uauy C.* Genomics as the key to unlocking the polyploid potential of wheat // *New Phytol.* 2015. V. 208. P. 1008.
<https://doi.org/10.1111/nph.13533>
40. *Хлесткина Е.К.* Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. С. 1044.
<https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/220/221>
41. *Ramirez-Gonzalez R.H., Borrill P., Lang D., Harrington S.A., Brinton J., Venturini L., Davey M., Jacobs J., van Ex F., Pasha A., Khedikar Y., Robinson S.J., Cory A.T., Florio T., Concia L. et al.* The transcriptional landscape of hexaploid wheat across tissues and cultivars // *Science*. 2018. V. 361.
<https://doi.org/10.1126/science.aar6089>
42. *Close T.J.* Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins // *Physiol. Plant.* 1996. V. 97. P. 759.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x>
43. *Quarrie S.A., Gulli M., Calestani C., Steed A., Marmioli N.* Location of a gene regulating drought-induced abscisic acid production on the long arm of chromosome 5A of wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1994. V. 89. P. 794.
<https://doi.org/10.1007/BF00223721>
44. *Voss-Fels K.P., Robinson H., Mudge S.R., Richard C., Newman S., Wittkop B., Stahl A., Friedt W., Frisch M., Gabur I., Miller-Cooper A., Campbell B.C., Kelly A., Fox G., Christopher J. et al.* VERNALIZATION1 modulates root system architecture in wheat and barley // *Mol. plant.* 2018. V. 11. P. 226.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.005>
45. *Walkowiak S., Gao L., Monat C., Haberer G., Kassa M.T., Brinton J., Ramirez-Gonzalez R.H., Kolodziej M.C., Delorean E., Thambugala D., Klymiuk V., Byrns B., Gundlach H., Bandi V., Siri J.N. et al.* Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding // *Nature*. 2020. V. 588. P. 277.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2961-x>
46. *Konstantinov D.K., Zubairova U.S., Ermakov A.A., Doroshkov A.V.* Comparative transcriptome profiling of a resistant vs susceptible bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar in response to water deficit and cold stress // *Peer J.* 2021. V. 9.
<https://doi.org/10.7717/peerj.11428>
47. *Chu C., Wang S., Paetzold L., Wang Z., Hui K., Rudd J.C., Xue Q., Ibrahim A.M.H., Metz R., Johnson C.D., Rush C.M., Liu S.* RNA-seq analysis reveals different drought tolerance mechanisms in two broadly adapted wheat cultivars 'TAM 111' and 'TAM 112' // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. P. 4301.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83372-0>
48. *Chaichi M., Sanjarian F., Razavi K., Gonzalez-Hernandez J.L.* Analysis of transcriptional responses in root tis-

- sue of bread wheat landrace (*Triticum aestivum* L.) reveals drought avoidance mechanisms under water scarcity // PLoS ONE. 2019. V. 14. P. e0212671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212671>
49. Lv S., Feng K., Peng S., Wang J., Zhang Y., Bian J., Nie X. Comparative analysis of the transcriptional response of tolerant and sensitive wheat genotypes to drought stress in field conditions // Agron. 2018. V. 8. P. 247. <https://doi.org/10.3390/agronomy8110247>
 50. Iqbal M.A., Sharma P., Jasrotia R.S., Jaiswal S., Kaur A., Saroha M., Angadi U.B., Sheoran S., Singh R., Singh G.P., Rai A., Tiwari R., Kumar D. RNAseq analysis reveals drought responsive molecular pathways with candidate genes and putative molecular markers in root tissue of wheat // Sci. Rep. 2018. V. 9. Article ID 13917. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49915-2>
 51. Ma L., Li G. FARI-RELATED SEQUENCE (FRS) and FRS-RELATED FACTOR (FRF) family proteins in *Arabidopsis* growth and development // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article ID 692. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00692>
 52. Hua Y., Zhang C., Shi W., Chen H. High-throughput sequencing reveals microRNAs and their targets in response to drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2017. V. 33. P. 465. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1586586>
 53. Niu X., Luo T., Zhao H., Su Y., Ji W., Li H. Identification of wheat dreb genes and functional characterization of tadre3 in response to abiotic stresses // Gene. 2020. V. 740. Article ID 144514. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144514>
 54. Shavrukov Y., Zhumalin A., Serikbay D., Botayeva M., Otemisova A., Absattarova A., Sereda G., Sereda S., Shvidchenko V., Turbekova A., Jatayev S., Lopato S., Soole K., Langridge P. Expression level of the DREB2-type gene, identified with amplifluor SNP markers, correlates with performance, and tolerance to dehydration in bread wheat cultivars from Northern Kazakhstan // Front. Plant Sci. 2016. V.7. Article ID 1736. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01736>
 55. Guerin C., Roche J., Allard V., Ravel C., Mouzeyar S., Bouzidi M.F. Genome-wide analysis, expansion and expression of the NAC family under drought and heat stresses in bread wheat (*T. aestivum* L.) // PLoS ONE. 2019. V. 14. Article ID e0213390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213390>
 56. Chen J., Gong Y., Gao Y., Zhou Y., Chen M., Xu Z., Guo C. Ma Y. TaNAC48 positively regulates drought tolerance and ABA responses in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Crop J. 2021. V. 9. P. 785. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.09.010>
 57. Mao H., Li S., Wang Z., Cheng X., Li F., Mei F., Chen N., Kang Z. Regulatory changes in TaSNAC8-6A are associated with drought tolerance in wheat seedlings // Plant Biotechnol. J. 2020. V.18. P. 1078. <https://doi.org/10.1111/pbi.13277>
 58. Khalid M., Afzal F., Gul A., Amir R., Subhani A., Ahmed Z., Mahmood Z., Xia X., Rasheed A., He Z. Molecular characterization of 87 functional genes in wheat diversity panel and their association with phenotypes under well-watered and water-limited conditions // Front. Plant Sci. 2019. V.10. Article ID 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00717>
 59. Брагина М.К., Афонников Д.А., Салина Е.А. Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. V. 23. P. 38. <https://doi.org/10.18699/VJ19.459>
 60. Bevan M.W., Uauy C., Wulff B.B.H., Ji Zhou, Krasileva K., Clark M.D. Genomic innovation for crop improvement // Nature. 2017. V. 543. P. 346. <https://doi.org/10.1038/nature22011>
 61. Leng P., Lübberstedt T., Xu M. Genomics-assisted breeding – A revolutionary strategy for crop improvement // J. Integr. Agr. 2017. V. 16. P. 2674. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61813-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61813-6)
 62. Sehgal D., Dreisigacker S. Haplotypes-based genetic analysis: benefits and challenges // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019. V. 23. P. 803. <https://doi.org/10.18699/VJ19.37-0>
 63. Basile S.M.L., Ramirez I.A., Crescente J.M., Conde M.B., Demichelis M., Abbate P., Rogers W.J., Pontaroli A.C., Helguera M., Vanzetti L.S. Haplotype block analysis of an Argentinean hexaploid wheat collection and GWAS for yield components and adaptation // BMC Plant Biol. 2019. V. 19. Article ID <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2015-4>
 64. Sehgal D., Mondal S., Crespo-Herrera L., Velu G., Juliana P., Huerta-Espino J., Shrestha S., Poland J., Singh R., Dreisigacker S. Haplotype-based, genome-wide association study reveals stable genomic regions for grain yield in CIMMYT spring bread wheat // Front. Genet. 2020. V. 11. Article ID 589490. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.589490>
 65. Waidmann S., Kusenda B., Mayerhofer J., Mechtler K., Jonak C. A DEK domain-containing protein modulates chromatin structure and function in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 4328. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129254>
 66. Brestovitsky A., Ezer D., Waidmann S., Maslen S., Balcerowicz M., Cortijo S., Charoensawan V., Martinho C., Rhodes D., Jonak C., Wigge P.A. DEK influences the trade-off between growth and arrest via H2A.Z-nucleosomes in *Arabidopsis*. <https://doi.org/bioRxiv.2019> <https://doi.org/10.1101/829226>
 67. Hong M.J., Kim J.-B., Seo Y.W., Kim D.Y. F-Box genes in the wheat genome and expression profiling in wheat at different developmental stages genes // Genes. 2020. V. 11. 1154. <https://doi.org/10.3390/genes11101154>
 68. Stefanowicz K., Lannoo N., Van Damme E.J. Plant F-box proteins-judges between life and death // Crit. Rev. Plant Sci. 2015. V. 34. P. 523. <https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1024566>
 69. An J., Li Q., Yang J., Zhang G., Zhao Z., Wu Y., Wang Y., Wang W. Wheat F-box protein TaFBA1 positively regulates plant drought tolerance but negatively regulates stomatal closure // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article ID 1242. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01242>
 70. Wang Y., Qiao L., Bai J., Wang P., Duan W., Yuan S., Yuan G., Zhang F., Zhang L., Zhao C. Genome-wide characterization of JASMONATE-ZIM DOMAIN transcription repressors in wheat (*Triticum aestivum* L.) // BMC Genomics. 2017. V. 18. Article ID 152. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3582-0>

71. *Wei Q., Chen R., Wei X., Liu Y., Zhao S., Yin X., Xie T.* Genome-wide identification of R2R3-MYB family in wheat and functional characteristics of the abiotic stress responsive gene TaMYB344 // *BMC Genomics*. 2020. V. 21. Article ID 792. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07175-9>
72. *Kim Y.J., Bjorklund S., Li Y., Sayre M.H., Kornberg R.D.* A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II // *Cell*. 1994. V.77. P. 599. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90221-6)
73. *Kazan K.* The multitasking MEDIATOR25 // *Front. Plant Sci*. 2017. V. 8. Article ID 999. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00999>
74. *Crawford T., Karamat F., Lehotai N., Rentoft M., Blomberg J., Strand A., Björklund S.* Specific functions for Mediator complex subunits from different modules in the transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress // *Sci. Rep*. 2020. V.10. Article ID 5073. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00124>
75. *Liu J., Zhang T., Jia J., Sun J.* The wheat mediator subunit TaMED25 interacts with the transcription factor TaEIL1 to negatively regulate disease resistance against powdery mildew // *Plant Physiol*. 2016. V. 170. P. 1799. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01784>
76. *Hiebert C.W., Moscou M.J., Hewitt T., Steuernagel B., Hernández-Pinzón I., Green P., Pujol V., Zhang P., Rouse M.N., Jin Y., McIntosh R.A., Upadhyaya N., Zhang J., Bhavani S., Vrána J. et al.* Stem rust resistance in wheat is suppressed by a subunit of the mediator complex // *Nat. Commun*. 2020. V. 11. Article ID 1123. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14937-2>
77. *Concia L., Veluchamy A., Ramirez-Prado J.S., Martin-Ramirez A., Huang Y., Perez M., Domenichini S., Podriges Granados N.Y., Kim S., Blein T., Duncan S., Pochot C., Manza-Mianza D., Juery C., Paux E. et al.* Wheat chromatin architecture is organized in genome territories and transcription factories // *Genome Biol*. 2020. V. 21. Article ID 104. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.03.003>
78. *Sarnowska E., Gratkowska D.M., Sacharowski S.P., Cwiek P., Tohge T., Fernie A.R., Siedlecki J. A., Koncz C., Sarnowski T.J.* The role of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in hormone crosstalk // *Trends Plant Sci*. 2016. V. 21. P. 594. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.017>
79. *Lämke J., Bäurle I.* Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants // *Genome Biol*. 2017. V. 18. Article ID 124. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6>
80. *Bulgakov V.P., Wu H.C., Jinn T.L.* Coordination of ABA and chaperone signaling in plant stress responses // *Trends Plant Sci*. 2019. V. 24. P. 636. <https://doi.org/10.1016/j.tplants>

УДК 581.1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗАХ РАСТЕНИЙ

© 2022 г. Л. А. Ломоватская^а, *, О. В. Кузакова^а, А. С. Романенко^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: LidaL@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 07.09.2021 г.

После доработки 13.10.2021 г.

Принята к публикации 18.10.2021 г.

Существование аденилатциклаза у растений долгое время считалось недоказанным и лишь в последние два десятилетия появились новые сведения, уточняющие как биохимические свойства фермента, так и данные о его молекулярной структуре. Поэтому в обзоре обсуждаются особенности функционирования растительных аденилатциклазов в мультимолекулярных комплексах и физиологическое значение этого феномена в реакциях растений на стрессы. Рассматриваются проблемы поиска и успехи в расшифровке нуклеотидных последовательностей аденилатциклаза растений.

Ключевые слова: аденилатциклазы растений, мультиферментный комплекс, нуклеотидные последовательности аденилатциклаза растений

DOI: 10.31857/S0015330322020117

ВВЕДЕНИЕ

В любой сигнальной системе ее эффективность в значительной степени зависит от фермента-триггера сигнала. Для аденилатциклазной системы клеток растений таким ферментом является аденилатциклаза, синтезирующая циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), который участвует в каскаде последующих сигнальных событий, включающих трансдукцию внеклеточного сигнала в генетический аппарат клетки, и обеспечивающий регуляцию таких фундаментальных физиологических процессов как рост и развитие, дифференциация, метаболизм, апоптоз и другие функции [1, 2]. Таким образом, цАМФ, в числе других вторичных мессенджеров (кальций, H₂O₂, NO и др.), обеспечивает своевременную реакцию растительного организма на изменяющиеся условия внешней среды. Для поддержания оптимальных концентраций этой сигнальной молекулы у растений также функционирует фосфодиэстераза, преобразующая цАМФ в нециклическую неактивную форму. Регуляция активности этого фермента не менее сложна и многообразна [3, 4], и заслуживает отдельного обзора.

Исторически так сложилось, что интерес к исследованию аденилатциклаза у животных и человека пришелся, в основном, на вторую половину

XX века, когда в 1958 г. E. Sutherland с коллегами впервые обнаружили цАМФ в клетках печени животных [5]. Наиболее важные сведения, касающиеся структурных и биохимических особенностей АЦ животных, были получены в конце 90-х годов прошлого столетия [6, 7].

У растений существование аденилатциклазной сигнальной системы, и, в частности, аденилатциклаза, долгое время ставилось под сомнение [8, 9], а затем, до начала XXI столетия, основной упор в исследованиях делался на биохимические свойства фермента [10, 11]. Если структура генов АЦ животных была уже известна в конце 90-х годов прошлого века [12], то АЦ растений до сих пор остаются в некотором смысле “*terra incognita*”, а сведения о нуклеотидных последовательностях их генов до сих пор носят неполный характер [2, 13].

Целью настоящего обзора явилось изложение современных представлений о сходстве и различиях в молекулярной структуре и свойствах АЦ растений и животных, а также об их роли в стрессовых ответах растений.

Классификация и краткая характеристика аденилатциклаза про- и эукариот

Аденилатциклаза (АТФ-пирофосфатлиаза циклизующая КФ 4.6.1.1) катализирует следующую реакцию:



Сокращения: АЦ – аденилатциклаза; АСС – аденилатциклазная сигнальная система; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат.

Несмотря на то, что аденилатциклаза во всех объектах выполняет одну и ту же функцию и использует один и тот же субстрат, она имеет значительные различия в регуляции у разных видов живых организмов [14, 15]. По этой причине все аденилатциклазы на основании сходства аминокислотных последовательностей их каталитических доменов делят на несколько классов (табл. 1). Поскольку в этой классификации микроорганизмы занимают весьма значительный объем, и сведения об особенностях АЦ у этих организмов постоянно обновляются, существующие классификации подвергаются пересмотру. На сегодняшний день АЦ животных и микроорганизмов сгруппированы в шесть классов, основанных на гомологии последовательностей внутри их каталитических доменов [16, 17]. АЦ из *Escherichia coli* и некоторых грамотрицательных прокариотов вошли в класс I. Класс II охватывает “токсиновые” АЦ из таких патогенов, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis* [18, 19]. Эти циклазы являются секретлируемыми ферментами, которые переносятся в хозяйские клетки, где разрушают внутриклеточный сигналинг путем наполнения клеток хозяина сверхфизиологическими концентрациями цАМФ [20]. АЦ эукариотов и гуанилатциклазы отнесены к классу III, наиболее обширному, куда входят представители бактериального и животного царств [17]. Классы IV, V и VI выделены сравнительно недавно и включают один или несколько прокариотических членов [21] (табл. 1).

Несмотря на то, что все шесть классов широко представлены у прокариот, все АЦ эукариот – как одноклеточных, так и многоклеточных – возникли из бактериальных АЦ, относящихся также к классу III [22]. По своей локализации в клетке АЦ класса III делятся на две большие группы – трансмембранные формы фермента, представляющие собой белковые молекулы, один раз или более пронизывающие плазматическую мембрану, и растворимые (цитозольные) его формы [15, 23]. Для ознакомления со структурными и функциональными особенностями этого фермента из других классов рекомендуем обратиться к обзору Baker и Kelly [19].

Краткая характеристика АЦ животных

Трансмембранные аденилатциклазы (тАЦ) III класса биохимически и структурно хорошо изучены у бактерий, животных и человека [6, 19, 20, 23]. Краткая характеристика АЦ животных, изложенная в этом разделе, позволяет получить общее представление об их биохимических свойствах и особенностях структуры, а также дает информацию для сравнения их с АЦ растений.

Для катализа АЦ в качестве кофактора требуется металл, обычно Mg²⁺ или Mn²⁺. Их каталити-

Таблица 1. Классификация аденилатциклаз про- и эукариот

Класс АС	Название класса	Представители класса	Литература
I	Энтеробактериальный	Бактерии: <i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Vibrio cholera</i> ; <i>Erwinia chrysanthemi</i>	[16]
II	Токсины	Бактерии: <i>Bacillus anthracis</i> ; <i>Bordetella pertussis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[18], [19]
III	Универсальный	Бактерии: <i>Corynebacterium liquefaciens</i> ; <i>Rhizobium meliloti</i> ; животные и человек; предположительно растения	[20], [23]
IV	Не имеет названия	Бактерии: <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Yersinia pestis</i>	[16]
V	Не имеет названия	Бактерии: <i>Prevotella ruminicola</i>	[21]
VI	Не имеет названия	Бактерии: <i>Rhizobium etli</i> ; <i>Mesorhizobium loti</i> ; <i>Sinorhizobium meliloti</i>	[21]

ческий сайт формируется димеризацией двух доменов (С1 и С2) по типу голова–хвост. Поскольку эти домены схожи друг с другом, но не идентичны, они создают только один активный сайт. Согласно кристаллической структуре, второй (псевдо-симметричный) сайт занят активатором АЦ, форсколином. Необходимые для катализа два атома металла координируются двумя консервативными остатками аспартата, присутствующими в домене С1, а переходное состояние стабилизируется необходимой для этого парой аспарагин–аргинин, локализованной в домене С2 [23]. У животных и человека известно девять изоформ тАЦ, имеющих специфическую локализацию в

определенных органах и тканях и имеющих различную чувствительность к ионам кальция [24].

Растворимая аденилатциклаза (рАЦ) клеток животных была подробно исследована в последние два десятилетия, когда большая часть основополагающих работ была выполнена на экстрактах из яичек крыс [22, 25]. В отличие от тАЦ, биохимическая активность рАЦ, как правило, зависит только от двухвалентного катиона Mn^{2+} , нечувствительна к регуляции G-белками, форсколином и проявляется более низкую (примерно в 10 раз) аффинность к субстрату (АТФ).

Отличительной чертой рАЦ является наличие у нее Р-петли, связывающей АТФ [26]. Кроме того, в С-концевой части рАЦ есть аминокислотная последовательность с высоким содержанием лейцина, так называемый потенциал лейциновой заставки или домен спираль—спирального взаимодействия [22, 27, 28]. Есть предположение, что этот участок необходим для прикрепления рАЦ к цитоскелету [22, 29]. По данным Zippin с соавт. [30], рАЦ в клетках животных локализована в различных внутриклеточных компартментах и структурах — в митохондриях, центриолях, митотическом веретене, срединных пластинках и ядре.

Аденилатциклазы растений: свойства фермента и участие в стрессовых ответах

Поскольку исследования свойств и структуры АЦ у растений значительно отстают по времени и эффективности от таковых у животных, сведения об аденилатциклазах долго носили скудный, а зачастую и противоречивый характер [31–34]. Однако в последнее десятилетие появилось довольно много работ, где достоверно, с применением методов генетической инженерии, доказывалось существование АЦ у растений. Пожалуй, неоспоримым сходством АЦ животных и растений является их субстратная специфичность — АТФ и металлы-кофакторы (Mn^{2+} , Mg^{2+}) [35], а также активаторы (NaF , Ca^{2+}) [36].

Для растений нет литературных данных по изоферментному составу АЦ, но известно, что одни и те же агенты (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) могут оказывать различный, а зачастую и противоположный эффект на активность трансмембранной АЦ растений [33, 35]. Этот факт косвенно указывает на присутствие у растений нескольких изоформ тАЦ. Согласно литературным данным, оптимум рН тАЦ растений имеет значительный разброс: показана форма тАЦ с оптимумом активности при рН 4.8–5.2 и в то же время есть сведения об изоформе, наиболее активной в щелочной области (рН 8.8) [37].

По растворимой АЦ растений в литературе имеется еще более противоречивая информация. Так, из корней люцерны (*Medicago sativa*) была

выделена фракция растворимой АЦ и частично изучены ее свойства [33]. Как оказалось, аденилатциклазная активность, измеренная в присутствии $MgATP$ в качестве субстрата, стимулировалась ионами Ca^{2+} и кальмодулином. Гуанозин-5'-[β -имида]трифосфат (ГТФ), форсколин, фторид и холерный токсин (общеизвестные модуляторы трансмембранной АЦ животных) не активировали этот фермент. Существует и противоположное мнение [38]: авторы, проведя анализ соответствующей базы данных и сравнительное изучение геномов многих про- и эукариот, сделали вывод, что у арабидопсиса и, очевидно, у растений вообще рАЦ отсутствует. В определенной мере такой вывод можно объяснить тем, что гены АЦ у растений могут быть замаскированы среди широкого спектра больших семейств генов, в частности, R-генов, которых насчитывается, например, в арабидопсисе 200–300, а в рисе — порядка 1500 [39].

В связи с тем, что АЦ растений является частью сигнальной системы, весьма значительное влияние на ее активность оказывают факторы окружающей среды как абиотической, так и биотической природы. Есть сведения, что низкая температура [40], экзогенные фитогормоны [41], свет [40], а также вирусы, грибные и бактериальные метаболиты, весьма существенно влияют на изменение концентрации эндогенного цАМФ [42, 43], что косвенно свидетельствует о модулировании активности АЦ. Прямые доказательства активации АЦ были получены Gasumov с соавт. [34], которые выявили светоиндуцируемую трансмембранную и растворимую АЦ у растений, соответственно. АЦ в мембранной фракции проявляла сезонные изменения в активности по отношению к красному и дальнему красному свету, а фракция, содержащая растворимую АЦ, оказалась чувствительна как к красному, так и к дальнему красному свету и не меняла ее в зависимости от сезона. У одноклеточных водорослей *Euglena gacilis* [44] и *Microcoleus sp.* [45] обнаружены фотоактивируемые аденилатциклазы, которые являются рецепторным флавопротеином. Авторы полагают, что поскольку данная АЦ может активироваться в широком световом диапазоне, она необходима для адаптации. Весьма активно растительные АЦ, вероятнее всего тАЦ, реагируют на экзогенные фитогормоны [46]. Так, показано, что при добавлении экзогенного гиббереллина через активацию тАЦ происходил не только усиленный синтез цАМФ [47], но также активация белковых цАМФ-зависимых обменных факторов [41]. Интересно, что аналогичный эффект у арабидопсиса наблюдался и под влиянием солевого и холодового стрессоров [1]. Показано, что увеличение уровня гиббереллина в проростках *Orobanche minor* приводило к существенному возрастанию концентрации цАМФ, что, вероятно, тоже связано с активацией тАЦ [48].

Как правило, при биотических стрессах под воздействием PAMP/МAMP бактериальных и грибных фитопатогенов, активируются сигнальные системы клеток растений и запускаются защитные механизмы с участием соответствующих вторичных мессенджеров. В этом принимают участие специфические/неспецифические рецепторы растительных клеток, передающие сигналы на GPCRs (G-protein-coupled receptors complex) [49]. Можно полагать, что активность тАЦ растений также регулируется подобным образом, поскольку показано, что под воздействием экзополисахаридов *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* (*Cms*) активность тАЦ в клетках растений картофеля *in vitro* возрастала или снижалась в зависимости от устойчивости сорта картофеля, а добавление к мембранной фракции, содержащей тАЦ сурамина, разобщителя связи “рецептор—G белок”, снижало ее активность более, чем на 90% [36]. Кроме того, показано, что активность АЦ из клеток *Nicotiana benthamiana* повышалась при инфицировании *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, что существенно уменьшало количество симптомов программируемой клеточной смерти [50]. Инокуляция тканей *Hippeastrum × hybridum* грибным патогеном *Phoma narcissi* приводила не только к повышению концентрации цАМФ, но и к увеличению транскрипционного уровня РНК АЦ. Авторы полагают, что это является одной из защитных реакций растений на нарушения целостности симпласта и апопласта [51]. Под воздействием PAMP *Pseudomonas syringae* в листьях *Arabidopsis* повышался уровень цАМФ, что способствовало развитию защитных реакций [52]. Аналогичные результаты были получены при изучении действия элиситора из *Colletotrichum lindemuthianum* на суспензионную культуру клеток *Phaseolus vulgaris* [53]. В работе Jiang с соавт. [43] показано, что увеличение уровня синтеза салициловой кислоты в растениях арабидопсиса при инфицировании *Verticillium* является следствием усиления активности АЦ, что может приводить к усилению защитных реакций растений. Также в арабидопсисе был обнаружен белок, имеющий помимо АЦ каталитического центра последовательность NB-ARC (nucleotide-binding domain shared with DPAF-1) и домен LRR (leucine-rich repeat), которые присущи PR-белкам и определяют устойчивость растений к патогенам. Показано, что активность АЦ в составе этого белка повышалась при инфицировании арабидопсиса биотрофным грибом *Golovinomyces orontii* и гембиотрофной бактерией *Pseudomonas syringae*, но не при контакте с некротрофным грибом *Botrytis cinerea* [54]. Авторы полагают, что такая реакция АЦ связана с особенностями эффекторных молекул биотрофных патогенов, которые воспринимаются PR-белками растений [54].

Кроме непосредственной модуляции с помощью GPCRs, активность АЦ растений, так же как и АЦ животных [23], может меняться под воздействием ионов кальция. Ruzvidzo с соавт. [13] выявили активацию рекомбинантного белка из арабидопсиса с активностью АЦ 100 μM CaCl_2 , тогда как Chatukuta с соавт. [55] выявили в эндоцитозных пузырьках в клетках арабидопсиса рекомбинантный домен АЦ (AtCIAP261–379), который существенно активировался 250 μM CaCl_2 .

Интересно, что присутствие аденилатциклаз было обнаружено и в некоторых внутриклеточных компартментах растений. Активность аденилатциклаз была выявлена в изолированных хлоропластах шпината [56], в межмембранном пространстве и в стромах хлоропластов клеток *Nicotiana tabacum* и арабидопсиса [57, 58]. Двумя независимыми авторами локализация АЦ была выявлена в митохондриях клеток арабидопсиса [13] и кукурузы [46], где показано ее участие в проведении сигналов при стрессах.

Многие литературные данные свидетельствуют о том, что АЦ у растений функционируют в составе мультибелковых комплексов, что принципиально отличает их от АЦ животных (табл. 2). Такие мало консервативные АЦ содержат только ключевые остатки каталитических центров, позволяющие сохранять их функции. Возможно, что это произошло в результате дивергентной эволюции [59, 60]. Так, Al-Younis с соавт. [61] выявили в K^+ -зависимой пермеазе 7 (AtKUP7) N-концевой цитозольный домен AtKUP71-100 с активностью АЦ. Встраивание данной последовательности в мутант *Escherichia coli*, дефицитный по *suA* (аденилатциклаза), восстанавливало ферментацию лактозы, что невозможно без соответствующего уровня внутриклеточного цАМФ [61]. В эндоцитозных пузырьках в составе клатринового белкового комплекса были выявлены нуклеотидные последовательности, соответствующие каталитическому центру АЦ: AT1G68110 и AtCIAP. Полагают, что цАМФ необходим в интернализации патогенных эффекторов в эндоплазматическую сеть и вакуоль растительных клеток [55]. В *Marchantia polymorpha* (мох печеночник) была обнаружена нетипичная аденилатциклаза, которая помимо стандартного C-домена, характерного для III класса АЦ, имеет N-концевой домен, представляющий собой фосфодиэстеразу [62, 63]. Этот рекомбинантный белок кодируется геном *MpCAPE* (COMBINED AC with PDE). Наиболее высокая его активность была найдена в органах размножения этого растения — антеридиумах. Обе группы авторов считают, что этот белок необходим для регуляции репродуктивного процесса в растениях с мужскими гаметофитами. Весьма интересным представляется сообщение о том, что в *Arabidopsis thaliana* выявлен ген *At3g14460*, кодирующий бе-

Таблица 2. Экспериментально подтвержденные фрагменты молекулы АЦ растений из базы NCBI

Вид растения	№ в NCBI	Роль в метаболизме и стрессовых реакциях растений	Литература
<i>Zea mays</i>	CAC59976.1	Отвечает за рост пыльцевой трубки	[39]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176447.1 pentatricopeptide repeat protein	Мотив каталитического центра АЦ. Отвечает за взаимодействие с РНК и облегчение ее процессинга	[13]
<i>Nicotiana benthamiana</i>	ACR77530.1	Отвечает за табтоксин- β -лактам-индуцированную клеточную смерть и развитие симптомов заболевания	[50]
<i>Hippeastrum x hybridum</i>	ADM83595.1 hybridum adenylyl cyclase protein	Участие в системной реакции, индуцированной разрушением симпласта и апопласта <i>Phoma narcissi</i>	[51]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568213.2	Рекомбинантная K^+ -пермеаза. Выполняет роль молекулярного переключателя с одной сигнальной системы на другую	[61]
<i>Marchantia polymorpha</i>	PTQ35772.1	Представляет пример сложного многодоменного растительного белка, способного регулировать клеточный уровень цАМФ	[62]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564922.1 Clathrin assembly protein	Защита от патогена и ремоделирование актинового цитоскелета в течение эндоцитозной интернализации	[55]

лок, богатый лейциновыми повторами, который содержит четыре различных каталитических центра АЦ, пространственно распределенных по всему белку. Эти центры были названы как АС1, АС2, АС3 и АС4, соответственно, и индивидуально испытаны на каталитическую активность, которая у всех оказалась весьма высокой. Кроме того, оказалось совсем неожиданным, что в клетках *A. thaliana* содержатся еще пять других белков с несколькими центрами АЦ: At1g01040 с 5, At1g62590 с 3, At2g34780 с 13, At3g18035 с 2, и At5g57690. Можно полагать, что это растворимая форма АЦ, поскольку Mn^{2+} значительно ее активировал, а Ca^{2+} при этом дополнительно усиливал эту активацию [13, 64]. Еще одним примером функционирования АЦ в сложных белковых ком-

плексах является белок NCED3, представляющий собой 9-цис-эпоксикаротиноид диоксигеназу, в котором присутствует активный аденилатциклазный домен. Этот белок локализован в хлоропластах и является ключевым компонентом биосинтеза абсцизовой кислоты, обязательного участника стрессовых ответов растений [58, 61]. Также недавно был охарактеризован белок ZmRPP13-LK3 в кукурузе, который не только обладает активностью АЦ, сопоставимой с AtNCED3, но и участвует в АБК-опосредованной устойчивости к тепловому стрессу [46]. Авторы показали, что активность ZmRPP13-LK3 и уровень цАМФ уменьшаются в мутанте кукурузы, дефицитном по биосинтезу АБК. С точки зрения теории сигнальных микродоменов, принятой для клеток животных [17], низкая активность АЦ в составе

таких ферментных комплексов у растений вполне объяснима, так как цАМФ действует *in situ*, не диффундируя на значительные расстояния. Общеизвестно, что цАМФ способствует фосфорилированию соответствующих белков — компонентов сигнальных каскадов. Однако есть данные о том, что цАМФ участвует в ингибировании фосфорилирования белков, в частности белков в составе светособирающего комплекса хлоропластов [65]. Таким образом, АЦ в составе сложных молекулярных комплексов могут функционировать и во внутриклеточных сигнальных микродоменах растений. На фоне большого объема исследований, подтверждающих присутствие АЦ у растений, появляются отдельные работы, опровергающие этот факт [66]. Авторы, обнаружив весьма низкую активность АЦ в белке HрАС1 из *Hippeastrum hybrid cultivars*, полагают, что он относится к полифосфатазам, а синтез цАМФ является его “побочной” функцией. Опираясь на эти результаты, авторы заявляют, что у высших растений АЦ отсутствуют вообще и, следовательно, аденилатциклазная сигнальная система не имеет права на существование. На наш взгляд, результаты, полученные этими авторами, напротив, еще раз подтверждают гипотезу о функционировании АЦ растений в составе мультибелковых комплексов, и низкая аденилатциклазная активность исследуемого белка только подтверждает это. Упомянутая статья Kleinboelting с соавт. [66] ставит под сомнение данные, полученные ранее Swiezawska с соавт. По нашему мнению, результаты В. Swiezawska с соавт., полученные с применением высокотехнологичных генетических и биохимических методов, заслуживают доверия и вносят существенный вклад в понимание особенностей и разнообразия молекулярной структуры АЦ растений. Более подробно эти результаты обсуждаются в следующем разделе обзора.

По мнению Ruzvidzo с соавт. [13], мультидоменные АЦ могут образовывать внутримолекулярные димеры, что в свою очередь должно влиять на каталитическую активность и, следовательно, на эффективность цАМФ-зависимого сигнального пути [13]. Открытие белков одного типа с множественными каталитическими центрами АЦ вызывает новые вопросы и предположения: могут ли эти каталитические центры аккумулятивно увеличивать активность АЦ, усиливая друг друга? Или функционируют ли эти центры одновременно? Не “маскируют” ли такие белки различные изоформы АЦ? Это требует дальнейших исследований *in vivo* и *in planta*.

Поиски нуклеотидных последовательностей аденилатциклаз растений

При современном уровне развития науки для полной характеристики фермента недостаточно

данных только о его физиологических и биохимических свойствах. В последние годы, с помощью методов геномной инженерии получены новые сведения о нуклеотидной и аминокислотной последовательностях АЦ растений. Как показали поиски в различных базах данных и литературных источниках, сходства растительных АЦ с АЦ животных по аминокислотным последовательностям не обнаружено [4].

Е. Gehring в 2010 г., опираясь на исследование гуанилатциклаз из арабидопсиса, содержащих 14 аминокислот в конечном фрагменте каталитического центра, предпринял попытку провести аналогичный анализ для аденилатциклаз растений [67]. В модифицированном поиске мотивов АЦ аминокислотные остатки, которые обеспечивают субстратную специфичность, были заменены на аминокислоты [DE]. Это было сделано потому, что коровый мотив внутри каталитического центра состоит из функционально определенных остатков, к которым присоединяется водород от аденина, а также аминокислот, которые обеспечивают субстратную специфичность для АТФ и стабилизируют переход из АТФ в цАМФ. Таким образом, мотив ([RKS]X[DE]X(9,11)[KR]X(1,3)[DE]), считающийся фрагментом АЦ, действительно оказался представлен в АЦ кукурузы (AJ307886.1), и в ортологе *Sorghum bicolor* (gb | EER90437.1), а также в классе белков арабидопсиса, содержащем NBS-LRR (2e⁻⁷⁰). В арабидосисе Е. Gehring обнаружил аннотированные, но функционально недоказанные АЦ (At1g26190, At1g73980 и At2g11890) (TAIR: www.arabidopsis.org) и все они действительно содержат мотив ([RKS]X[DE]X(9,11)[KR]X(1,3)[DE]). Однако автор отмечает, что присутствия такого мотива, строго говоря, не достаточно, чтобы идентифицировать кандидатов АЦ *ab initio* с любой разумной степенью достоверности [67]. Для того, чтобы получить более надежные результаты, был использован расширенный АЦ мотив, который является специфичным для связывания АТФ, а не для ГТФ с С-терминальным металл-связывающим остатком ([RK][YFW][DE][VIL][FV]X(8)[KR]X(1,3)[DE]). Этот расширенный мотив позволил автору определить девять предполагаемых АЦ в арабидопсисе. Они включают два белка (At3g28223 и At4g39756) и toll-интерлейкиновый рецептор (TIR) NBS-LRR (At3g04220), участвующие в защитных реакциях растений [68]. В связи с этим следует заметить, что АЦ с NBS-LRR доменами обнаружены и в кукурузе [39], где АЦ структурно похожа на растительные TIR-NBS-LRR белки устойчивости к болезням, и в тополе *Populus trichocarpa* (ADB66335.1, 4e⁻⁷⁶) [69]. По мнению Wong и Gehring, [68], поиск в системе <http://www.panterdb.org> для библиотеки белковых семейств и суперсемейств, индексированных по функциям, указывает на присутствие в арабидопсисе 83 позиций с онтологами генов следующих категорий: процессы иммунной систе-

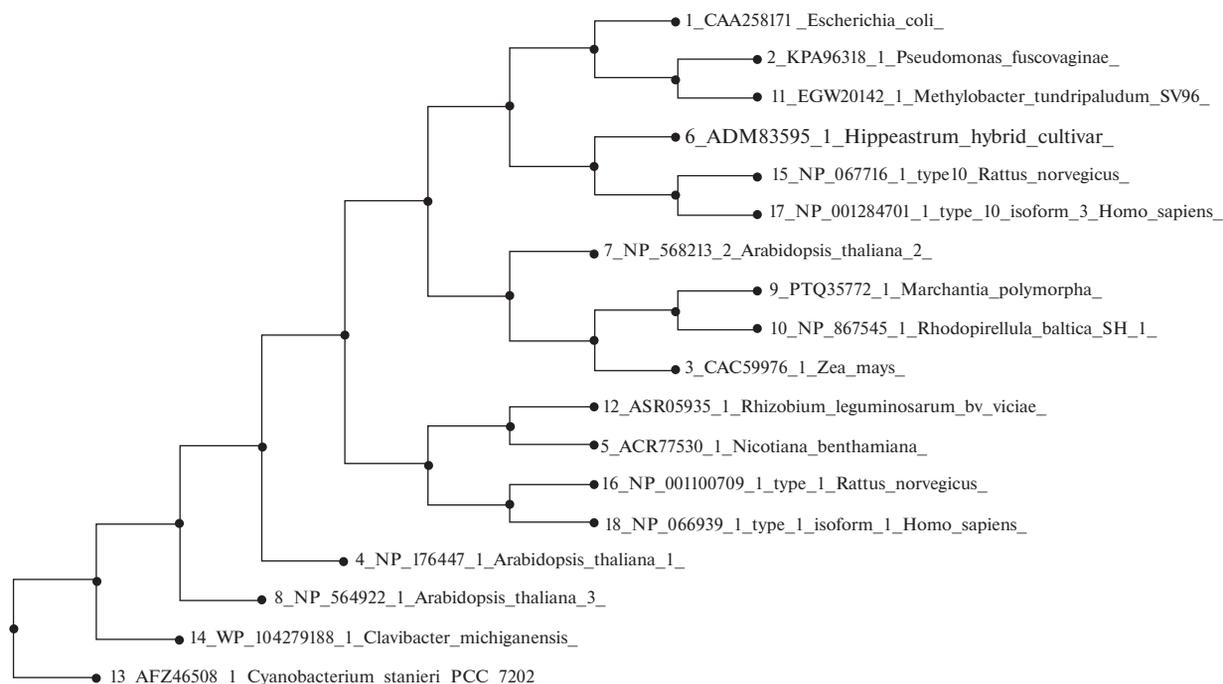


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отражающее эволюционные взаимосвязи и степень родства АЦ растений с аналогичным ферментом из организмов – представителей других царств. Аминокислотные последовательности АЦ получены из базы данных NCBI, филогенетическое дерево построено в программе MAFFT (multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences), версия 7.

мы, рецепторы клеточной поверхности, связанные с передачей сигнала, внутриклеточный сигнальный каскад, метаболические процессы нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Таким образом, предложенный метод *in silico* E. Gehring очерчивает довольно широкий круг претендентов на роль АЦ, но не дает точного представления об их нуклеотидных последовательностях. Другие авторы [13], используя мотив (At3g21465, BLAST) (14 аминокислотных остатков) из арабидопсиса, выделили АЦ-подобный белок. Из *Hippeastrum × hybridum* был выделен, клонирован и охарактеризован новый ген аденилатциклазы, названный *HrAC1* [51]. Этот ген кодирует белок, состоящий из 206 аминокислот с рассчитанной молекулярной массой 23 кДа. Предсказанная аминокислотная последовательность содержит все типичные признаки и имеет высокую идентичность с предполагаемыми АЦ растений. Очищенный рекомбинантный белок *HrAC1* способен конвертировать АТФ в цАМФ. Кроме того, авторы показали, что уровень транскрипта *HrAC1* и концентрация цАМФ изменялись в условиях стресса. По-видимому, АЦ в *Hippeastrum* является цитозольным белком, поскольку *in silico* анализ алгоритма с помощью программы SOSUI не показал присутствие трансмембранной последовательности внутри *HrAC1*. Такой вывод был подтвержден биохимически, когда активатор трансмембранной АЦ, фторид натрия, не оказал влияния на об-

суждаемый фермент. При этом *HrAC1* имеет гомологию с аналогичными белками из мха (*Physcomitrella patens*) и водорослей (*Chlorella variabilis*, *Volvox carteri*, *Chlamidomonas reinhardtii* и *Coccomyxa subellipsoidea*), а также с многими АЦ из грамположительных бактерий (стрептококки, бациллус, энтерококки и стафилококки) [51].

Имеющийся на сегодняшний день массив данных по аминокислотным последовательностям АЦ растений позволил нам построить филогенетическое дерево, отражающее эволюционные взаимосвязи и степень родства АЦ растений с аналогичным ферментом из организмов – представителей других царств (рис. 1). Первичные данные были получены из базы данных NCBI, где представлены аминокислотные последовательности белков или их фрагментов, обладающие активностью АЦ. Несмотря на то, что у растений АЦ, как правило, представлены фрагментами в составе других белков, они также были привлечены для сравнительного анализа, так как полностью сохраняют функции фермента, характерные для АЦ и подтвержденные экспериментально (табл. 2).

Анализ показал, что цианобактерии (*Cyanobacterium stanieri*) являются наиболее ранним носителем гена АЦ, что вполне объяснимо, поскольку, вероятно, они являются прародителями высших растений. Весьма возможно, что ген АЦ был получен арабидопсисом (*Arabidopsis thaliana*)

в процессе эндосимбиоза, где претерпел дальнейшие мутации, в результате чего три АЦ арабидопсиса оказались на разных уровнях дерева: WP_104279188 и NP_564922 локализованы в самом его начале, образуя только по одной внутренней ветви, тогда как NP_568213 находится довольно далеко от них, образуя одиночную внешнюю ветвь в составе кластера. Это дает основание предполагать, что две первые АЦ эволюционно являются более ранними, а третья АЦ сформировалась намного позже и должна иметь некоторое сходство с АЦ из *Marchantia polymorpha* (PTQ35772) и *Zea mays* (CAC59976). Интересно, что в одном кластере со мхом *Marchantia polymorpha* и высшим растением *Zea mays* находится и АЦ из бактерии *Rhodopirella baltica* SH (NP867545). При этом АЦ из мха и бактерии образуют две внешние ветви из одного внутреннего узла, что вероятно, также является результатом эндосимбиоза, но, при этом, АЦ из высшего растения кукурузы претерпела большее количество мутаций, что и нашло отражение в ее положении в филогенетическом дереве. Аналогичная дивергенция в двух ветвях в одном кластере АЦ из *Nicotiana benthamiana* (ACR77530) и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (ASR05935) еще раз подтверждает теорию эндосимбиоза бактерий и растений. АЦ из *Hipperastrum hybrid cultivar* (AQDM83596) находится дальше всех на филогенетическом дереве и входит в один кластер с *Rattus norvegicus* (NP 067716) и *Homo sapiens* (NP001284701), хотя они локализованы на внешних ветвях. Поскольку АЦ упомянутых млекопитающих представлены 10 растворимыми изоформами [30], можно предположить, что и *Hipperastrum hybrid cultivar* содержит растворимую АЦ. Это подтверждается и данными Świeżawska с соавт. [51], которые в результате анализа *in silico* обнаружили у АЦ из этого растения только цитозольный домен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, АЦ растений, в отличие от АЦ животных, наиболее хорошо изучены на биохимическом уровне, тогда как генетика этого фермента и его ортологи у различных видов растений исследованы недостаточно, и их поиски требуют, возможно, новых нестандартных подходов. Al-Younis с соавт. [61] предложил название “криптоаденилатциклазы” растений, и с этим, можно согласиться, поскольку растительные АЦ обнаруживаются часто в составе мультиферментных комплексов. [46, 54, 58, 61]. Этот феномен растительного фермента является еще одним принципиальным отличием от АЦ животных, и пока трудно сделать однозначный вывод о причинах этого явления. Анализ литературных данных позволяет предположить, что, с одной стороны, существование белков с несколькими активными

центрами АЦ может быть одним из способов регуляции активности этого фермента [13], а с другой стороны, мультиферментный комплекс может более эффективно выполнять функции внутриклеточного сигнального микродомена [58, 61, 65]. При этом очевидно, что у растений функционируют различные формы аденилатциклазы, и они, как источники сигнальной молекулы, цАМФ, играют важную роль в реализации защитных механизмов при стрессах у растений [1, 2, 53, 70–72].

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. Alqurashi M., Gehring C., Marondedze C. Changes in the *Arabidopsis thaliana* proteome implicate cAMP in biotic and abiotic stress responses and changes in energy metabolism // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 852. <https://doi.org/10.3390/ijms17060852>
2. Gehring C., Turek I. Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling // Front. Plant Sci. 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01704>
3. Johnson J.-L.F., Leroux M.R. cAMP and cGMP signaling: sensory systems with prokaryotic roots adopted by eukaryotic cilia // Trends Cell Biol. 2010. V. 20. P. 435. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.005>
4. Świeżawska B., Duszyn M., Jaworski K., Szmidt-Jaworska A. Downstream targets of cyclic nucleotides in plants // Frontiers Plant Science. 2018. V. 9: Article 1428. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01428>
5. Sutherland E.W., Rall T.W., Mennon T. Adenyl cyclase: distribution, preparation and properties // J. Biol. Chem. 1962. V. 247. P. 1220.
6. Hanoune J., Pouille Y., Tzavara E., Shen T., Lipskaya M., Miyamoto N., Suzuki Y., Defer N. Adenylyl cyclases: structure, regulation, and function in an enzyme superfamily // Mol. Cell. Endocrinol. 1997. V. 128. P. 179. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(97\)04013-6](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(97)04013-6)
7. Tesmer J.G., Sunahara R.K., Johnson R.A., Gosselin G., Gilman A.G., Sprang S.A. Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase // Science. 1999. V. 285. P. 756. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.756>
8. Amrhein N. Evidence against the occurrence of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in higher plants // Planta. 1974. V. 118. P. 241.
9. Spiteri A., Viratelle O.M., Raymond P., Rancillac M., Labouesse J., Pradet A. Artefactual origins of cyclic AMP in higher plant tissues // Plant Physiol. 1989. V. 91. P. 624. <https://doi.org/10.1104/pp.91.2.624>
10. Ishikawa I., Homey C. The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction // Circulation Research. 1997. V. 80. P. 297. <https://doi.org/10.1161/01.RES.80.3.297>

11. Jasso-Chávez R., Vega-Segura A., El-Hafidi M., Moreno-Sanchez R., Torres-Marquez M.E. Kinetic and thermodynamic characterization of adenylyl cyclase from *Euglena gracilis* // Archives Biochem. Biophys. 2002. V. 404. P. 48.
[https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00235-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00235-7)
12. Hellevuo K., Berry R., Sikela J.M., Tabakoff B. Localization of the gene for a novel human adenylyl cyclase (ADCY7) to chromosome 16 // Hum. Genet. 1995. V. 95. P. 197.
<https://doi.org/10.1007/BF00209401>
13. Ruzvidzo O., Dikobe D.T., Kawadza D.T., Mabadahanye G.H., Chatukuta P., Kwezi L. Recombinant expression and functional testing of candidate adenylate cyclase domains // Cyclic nucleotide signaling in plants. Methods and protocols. New York: Springer Science+Business Media. 2013. P. 13.
14. Defer N., Best-Belpomme M., Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2000. V. 279. P. F400.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.3.F400>
15. Halls M.L., Cooper D.M.F. Regulation by Ca²⁺ signaling pathways of adenylyl cyclases // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V.3: a004143.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004143>
16. Danchin A. Adenylyl cyclases and guanylyl cyclases: role and classification // http://www.normalesup.org/-adanchin/science/adenylyl_cyclases.html. 2010.
17. Kamenetsky M., Middelhaufe S., Bank E.M., Levin L.R., Buck J., Steegborn C. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems // J. Mol. Biol. 2006. V. 362. P. 623.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.045>
18. Drum C.L., Yan S.Z., Bard J., Shen Y.Q., Lu D., Soelaiman S., Grabarek Z., Bohm A., Tang W.J. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin // Nature. 2002. V. 415. P. 396.
<https://doi.org/10.1038/415396a>
19. Baker D.A., Kelly J.M. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases // Mol. Microb. 2004. V. 52. P. 1229.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04067.x>
20. Linder J.U. Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation // Cell Mol. Life Sci. 2006. V. 63. P. 1736.
<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6072-0>
21. Téllez-Sosa J., Soberón N., Vega-Segura A., Torres-Márquez M.E., Cevallos M.A. The *Rhizobium etli cya C* product: characterization of a novel adenylate cyclase class // J. Bacteriol. 2002. V. 84. P. 3560.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3560-3568.2002>
22. Steegborn C. Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases — similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1842. P. 535.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.08.012>
23. Sunahara R., Taussig R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling // Mol. Intervent. 2002. V. 2. P. 168.
<https://doi.org/10.1124/mi.2.3.168>
24. Chang J.C., Beuers U., Elferink R. The emerging role of soluble adenylyl cyclase in primary biliary cholangitis // Dig. Dis. 2017. V. 35. P. 217.
<https://doi.org/10.1159/000450914>
25. Roa J.N., Tresguerres M. Bicarbonate-sensing soluble adenylyl cyclase is present in the cell cytoplasm and nucleus of multiple shark tissues // Physiol. Reports. 2017. V. 5. P. e13090.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13090>
26. Wuttke M.S., Buck J., Levin L.R. Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase // J. Pancreas. 2001. V. 2. P. 154.
27. Kobayashi M., Buck J., Levin L.R. Conservation of functional domain structure in bicarbonate-regulated “soluble” adenylyl cyclases in bacteria and eukaryotes // Dev. Genes. Evol. 2004. V. 214. P. 503.
<https://doi.org/10.1007/s00427-004-0432-2>
28. Kleinboelting S., Diazb A., Monioto S., Heuvelc J., Weyanda M., Levin L.R., Buck J., Steegborn C. Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. V. 111. P. 3727.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1322778111>
29. Buck J., Sinclair M.L., Schapal L., Cann M.J., Levin L.R. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. V. 96. P. 79.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.79>
30. Zippin J.H., Chen Y., Nahirney P., Kamenetsky M., Wuttke M.S., Fischman D.A., Levin L.R., Buck J. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains // Faseb J. 2003. V. 17. P. 82.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0598fje>
31. Brown E.G., Newton R.P. Occurrence of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in plant tissues // TIBS. 1973. V. 12. P. 2683.
32. Bhalta S.C., Chopra R.N. Subcellular localization of adenylate cyclase in the shoot apices of *Bryum argenteum* Hedw // Ann. Botany. 1984. V. 54. P. 195.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086783>
33. Carricarte V.C., Bianchin G.M., Muschiatti J.P. Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*) // Biochem. J. 1988. V. 249. P. 807.
<https://doi.org/10.1042/bj2490807>
34. Gasumov K.G., Shichijo C., Bayramov S.M., Hashimoto T. Membrane and soluble fractions of adenylyl cyclase from *Sorghum bicolor* seedlings positively react to the action of red and far red lights // Fest Conference on Photochemistry and Photobiology. 1997. <http://www.photobiology.com/v1/contrib.htm>
35. Lusini P., Trabalzini L., Franchi G.G., Bovalini L., Martelli P. Adenylate cyclase in roots of *Ricinus comuis*: stimulation by GTF and Mn²⁺ // Phytochem. 1999. V. 30. P. 109.
36. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Филинова Н.В., Салеев Р.К. Влияние экзополисахаридов возбудителя кольцевой гнили картофеля на кинетические параметры аденилатциклазы в растениях картофеля // Доклады АН. 2011. Т. 441. С. 404.
37. Тарчевский И.А. Сигнальные системы растений. Москва: Наука, 2002. 294 с.

38. Roelofs J., Van Haastert P.J. Deducing the origin of soluble adenylyl cyclase, a gene lost in multiple lineages // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 9. P. 2239. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004047>
39. Moutinho A., Hussey P. J., Trevawas A.J., Malho R. Cyclic AMP act as a second messenger in pollen tube growth and reorientation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. V. 98. P. 10481. <https://doi.org/10.1073/pnas.171104598>
40. Thomas L., Maronedzge C., Ederli L., Pasqualini S., Gehring C. Proteomic signatures implicate cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana* // *J. Proteom.* 2013. V. 83. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2013.02.032>
41. Di D.W., Zhang C., Guo G.Q. Involvement of secondary messengers and small organic molecules in auxin perception and signaling // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 895. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1767-z>
42. Cooke C.J., Smith C.J., Walton T.J., Newton R.P. Evidence that cyclic AMP is involved in the hypersensitive response of *Medicago sativa* to a fungal elicitor // *Phytochemistry.* 1994. V. 35. P. 889. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90633-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90633-2)
43. Jiang J., Fan L.W., Wu W.H. Evidences for involvement of endogenous cAMP in *Arabidopsis* defense responses to *Verticillium* toxins // *Cell Research.* 2005. V. 15. P. 585.
44. Koumura Y., Suzuki T., Yoshikawa S., Watanabe M., Iseki M. The origin of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the *Euglena* blue-light receptor: phylogenetic analysis of orthologues of PAC subunits from several euglenoids and trypanosome-type adenylyl cyclases from *Euglena gracilis* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. V. 3. P. 580.
45. Blain-Hartung M., Rockwell N.C., Moreno M.V., Martin S.S., Gan F., Bryant D.A., Lagarias J.C. Cyanobacteriochrome-based photoswitchable adenylyl cyclases (cPACs) for broad spectrum light regulation of cAMP levels in cells // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 8473. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002258>
46. Yang H., Zhao Y., Chen N., Liu Y., Yang S., Du H., Wang W., Wu J., Tai F., Chen F., Hu X. A new adenylyl cyclase, putative disease-resistance RPP13-like protein 3, participates in abscisic acid-mediated resistance to heat stress in maize // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 283-301. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa431>
47. Sim W.-S., Kim H.-R. Effect of GA₃ on the cyclic AMP biosynthesis in maize seedling // *Plant Cell Physiol.* 1987. V. 28. P. 415. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077311>
48. Uematsu K., Nakajima M., Yamaguchi I., Yoneyama K., Fuku Y. Role of cAMP in gibberellin promotion of seed germination in *Orobancha minor* Smith // *J. Plant Growth Regul.* 2007. V. 26. P. 45.
49. Duc N.M., Kim H.R., Chung K.Y. Recent progress in understanding the conformational mechanism of heterotrimeric G protein activation // *Biomol. Ther.* 2017. V. 25. P. 4. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.169>
50. Ito M., Takahashi H., Sawasaki T., Ohnishi K., Hikichi Y., Kiba A. Novel type of adenylyl cyclase participates in tabtoxinine-β-lactam-induced cell death and occurrence of wildfire disease in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Signaling & Behavior.* 2014. V. 9. P. e27420. <https://doi.org/10.4161/psb.27420>
51. Świeżawska B., Jaworski K., Pawełek A., Grzegorzewska W., Szewczuk P., Szmidt-Jaworska A. Molecular cloning and characterization of a novel adenylyl cyclase gene, HpAC1, involved in stress signaling in *Hippeastrum x hybridum* // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 80. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.010>
52. Ma Y., Zhao Y., Walker R.K., Berkowitz G.A. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca²⁺-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca²⁺ signal // *Plant Physiol.* 2013. V. 163. P. 1459. <https://doi.org/10.1104/pp.113.226068>
53. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured French bean cells involve cAMP and Ca²⁺ // *New Phytologist.* 2001. V. 151. P. 185. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00170.x>
54. Bianchet C., Wong A., Quaglia M., Alqurashi M., Gehring C., Ntougakise V., Pasqualina S. An *Arabidopsis thaliana* leucine-rich repeat protein harbors an adenylyl cyclase catalytic center and affects responses to pathogens // *J. Plant Physiol.* 2019. V. 232. P. 12. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.025>
55. Chatukuta P., Dikobe B., Kawadza D., Sehlabane K., Takundwa M., Wong A., Gehring C., Ruzvidzo O. An *Arabidopsis* clathrin assembly protein with a predicted role in plant defense can function as an adenylate cyclase // *Biomolecules.* 2018. <https://doi.org/10.3390/biom8020015>
56. Newton R.P., Roef L., Witters E., Van Onckelen H. Tansley Review No. 106. Cyclic nucleotides in higher plants: the enduring paradox // *New Phytol.* 1999. V. 143. P. 427. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00478.x>
57. Witters E., Valcke R., van Onckelen H. Cytoenzymological analysis of adenylyl cyclase activity and 3':5'-cAMP immunolocalization in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* 2005. V. 168. P. 709. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01476.x>
58. Al-Younis I., Moosa B., Kwiatkowski M., Jaworski K., Wong A., Gehring C. Functional crypto-adenylate cyclases operate in complex plant proteins // *Front. Plant Sci.* 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.711749>
59. Zhang H., Gao Z., Zheng X., Zhang Z. The role of G-proteins in plant immunity // *Plant Signal Behav.* 2012. V. 7. P. 1284. <https://doi.org/10.4161/psb.21431>
60. Guo T., Fang Y. Functional organization and dynamics of the cell nucleus // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 378. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00378>
61. Al-Younis I., Wong A., Gehring C. The *Arabidopsis thaliana* K⁺-uptake permease 7 (AtKUP7) contains a functional cytosolic adenylate cyclase catalytic centre // *FEBS Letters.* 2015. V. 589. P. 3848. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.038>

62. *Kasahara M., Suetsugu N., Urano Y., Yamamoto C., Ohmori M., Takada Y., Okuda S., Nishiyama T., Sakayama H., Kohchi T., Takahashi F.* An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system // *Scient. Reports.* 2016. V. 6. P. 39232. <https://doi.org/10.1038/srep39232>
63. *Yamamoto C., Takahashi F., Ooe Y., Shirahata H., Shibata A., Kasahara M.* Distribution of adenylyl cyclase/cAMP phosphodiesterase gene, CAPE, in streptophytes reproducing via motile sperm // *Scient. Reports.* 2021. V. 11. P. 10054. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89539-z>
64. *Wong A., Tian X., Gehring C., Maronedze C.* Discovery of novel functional centers with rationally designed amino acid motifs // *Computat. structural biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 70. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.02.007>
65. *Gangwani L., Khurana J.P., Maheshwari S.C.* Inhibition of chloroplast protein phosphorylation by cAMP in *Lemna paucicostata* 6746 // *Phytochem.* 1996. V. 41. P. 49. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00616-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00616-8)
66. *Kleinboelting S., Miehl J., Steegborn C.* Crystal structure and enzymatic characterization of the putative adenylyl cyclase HpAC1 from *Hippeastrum* reveal dominant triphosphatase activity // *J. Structural Biol.* 2020. V. 212. P. 107649. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.1-6>
67. *Gehring C.* Adenylyl cyclases and cAMP in plant signaling – past and present // *Cell Commun. Signal.* 2010. V. 8. P. 1.
68. *Wong A., Gehring C.* Computational identification of candidate nucleotide cyclases in higher plants // *Cyclic Nucleotide Signaling in Plants. Methods and Protocols.* “HUMANA PRESS”, 2013, 205 p.
69. *Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L.* STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 343. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.023>
70. *Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Филинова Н.В.* Аденилатциклазы растений: влияние биотического стрессора на кинетические параметры трансмембранной и “растворимой” форм аденилатциклазы // *Биологические мембраны.* 2014. Т. 31. С. 129. <https://doi.org/10.7868/S0233475514010071>
71. *Pietrowska-Borek M., Chadzinikolau T., Borek S.* Cyclic nucleotides and nucleotide cyclases in plants under stress // *Improvement of crops in the Era of climatic changes.* New York: Springer Science+Business Media, 2014. 151p.
72. *Xu R., Guo Y., Peng S., Liu J., Li P., Jia W., Zhao J.* Molecular targets and biological functions of cAMP signaling in *Arabidopsis* // *Biomolecules.* 2021. V. 11. P. 688. <https://doi.org/10.3390/biom11050688>

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ АУКСИНОВ И ЦИТОКИНИНОВ НА РОСТОВЫЕ
И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИОННОЙ
КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *Tribulus terrestris* L.© 2022 г. А. Г. Ключин^{a, *}, С. В. Томилова^a, Д. В. Кочкин^{a, b}, Б. А. Галишев^c, А. М. Носов^{a, b, **}^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия^bФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия^cФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина”, Екатеринбург, Россия

*e-mail: andreyklyushin@list.ru

**e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 11.10.2021 г.

После доработки 19.10.2021 г.

Принята к публикации 19.10.2021 г.

Продолжен цикл работ по изучению влияния синтетических фитогормонов на ростовые и биосинтетические параметры суспензионной культуры клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L., и исследовано влияние цитокининов на эти характеристики. В дополнение к ранее полученным результатам об альтернативном действии двух аналогов ауксинов – 2,4-Д и α -НУК (первый из них активирует рост клеток *in vitro*, но тормозит образование стероидных гликозидов, второй – вызывает цитодифференцировку, приводящую к замедлению и остановке роста культуры, но активирует образование вторичных соединений), показано, что природа цитокинина и его концентрация может модулировать действие этих ауксинов. Установлено, что после перевода культуры с “ростовой” среды (содержащей 2,4-Д) на среду с α -НУК и различным составом цитокининов (БАП или кинетин в различных концентрациях) она сохраняет способность к активному росту в течение как минимум 3 циклов выращивания. Затем, при неоптимальной комбинации фитогормонов, культура клеток перестает расти и погибает. Однако при определенном составе регуляторов роста в питательной среде (1 или 2 мг/л α -НУК + 1 мг/л кинетина) после длительной лаг-фазы (12–18 суток) рост культуры возобновляется и впоследствии возможно ее длительное культивирование. На среде с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина суспензию *T. terrestris* поддерживали в течение 70 циклов выращивания без ухудшения ростовых характеристик (максимальный уровень накопления сухой биомассы M_{\max} – 12–16 г/л, индекс роста I – 13–18, удельная скорость роста μ – 0.18–0.28 сут⁻¹). Содержание стероидных гликозидов в клетках при этом не опускалось ниже 0.2–0.3% к сухой биомассе. С использованием метода UPLC-ESI-MS показано наличие в клеточной биомассе как минимум 4 стероидных гликозидов фураностанолового ряда – производных гидроксидиосгенина и тигогенина/неотигогенина. Полученные результаты подтверждают общие закономерности развития популяций клеток *in vitro* и важны для оптимизации ростовых и биосинтетических характеристик культур клеток высших растений.

Ключевые слова: *Tribulus terrestris*, суспензионная культура клеток, регуляторы роста, ауксины, цитокинины, фураностаноловые гликозиды

DOI: 10.31857/S0015330322020075

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире постоянно растет интерес к использованию биологически активных веществ растений как основных составляющих фармпрепа-

ратов, пищевых добавок, косметических и парфюмерных средств. На данный момент из растений получают порядка трети всех лекарственных субстанций, используемых в медицинской практике [1].

Крайне часто ценные лекарственные растения относятся к редким и эндемичным видам, к тому же для интактных растений (дикорастущих и

Сокращения: ФГ – фураностаноловые гликозиды, UPLC-ESI-MS – ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением.

плантационных) характерен нестабильный химический состав и высокая вероятность естественного (связано с природными процессами) и антропогенного (техногенного) загрязнения, зависящие от условий произрастания [2]. Поэтому поиск альтернативных источников экологически чистого возобновляемого растительного сырья с высоким содержанием целевых веществ является весьма актуальной проблемой. Перспективным вариантом решения этой проблемы может быть использование культур клеток высших растений, но применение данного подхода ограничено из-за трудностей в получении штамма-продуцента с удовлетворительными ростовыми и биосинтетическими характеристиками [3].

Якорцы стелющиеся *Tribulus terrestris* L. (*Zygophyllaceae* R.Br.) синтезируют более сотни различных стероидных гликозидов как спиростанолового, так и фураностанолового ряда. Кроме того, растения *T. terrestris* также накапливают множество флавоноидов, протоалкалоидов, истинных алкалоидов и некоторые другие группы вторичных метаболитов. Благодаря своему богатому химическому составу, препараты и экстракты на основе *T. terrestris* обладают высокой биологической активностью и используются при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза общих, церебральных и коронарных сосудов и для коррекции половой дисфункции у мужчин и женщин [4, 5].

Ранее нами были получены каллусная и суспензионная культуры клеток якорцев стелющихся, определены их ростовые параметры и показано наличие в клетках *in vitro* двух стероидных гликозидов фураностанолового ряда. В недавних исследованиях было изучено влияние ряда химических факторов — изменение состава синтетических регуляторов роста ауксиновой природы, а также стрессовое воздействие (повышенные концентрации ионов меди) на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *T. terrestris*. Было показано, что на средах, содержащих в качестве регулятора роста с ауксиновой активностью 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту), наблюдается интенсивный рост культуры, но содержание вторичных метаболитов (стероидных гликозидов) снижается до весьма малых значений (не более 0.1–0.2% к сухой массе клеток). Замена в среде выращивания 2,4-Д на α -НУК (α -нафтилуксусную кислоту) приводит к существенному повышению уровня содержания стероидных гликозидов и расширяет их качественный состав. Однако на средах с α -НУК наблюдается изменение морфологии клеток, увеличение степени их агрегированности и постепенное снижение жизнеспособности культуры вплоть до ее гибели. Совместное присутствие в среде 2,4-Д и α -НУК приводило к увеличению содержания стероидных гликозидов, но в меньшей степени чем на

средах только с α -НУК, — с сохранением удовлетворительных ростовых характеристик культуры и высокой жизнеспособности клеток. Стрессовое воздействие на суспензионную культуру *T. terrestris* (высокие концентрации ионов меди в среде) серьезно не ухудшало ростовые характеристики клеток *in vitro*, но увеличивало накопление стероидных гликозидов без изменения их качественного состава [6–8].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния регуляторов роста с цитокининовой активностью на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была использована суспензионная культура клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. (штамм Ттер 8 коллекционный №81 во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР)), которая была получена М.Т. Ханды с коллегами в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН в 2014 г. [6].

Для культивирования суспензионной культуры применяли питательную среду с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (MS) [9], с добавлением гидролизата казеина (0.5 г/л), инозитола (0.1 г/л) и 3% сахарозы (“Merck”, Германия). Для экспериментов использовали среды с разными сочетаниями регуляторов роста: 2,4-Д, α -НУК, 6-бензиламинопурин (БАП) и кинетин (“Merck”, Германия). Диапазон концентраций ауксинов и цитокининов в средах составил от 0 до 9.0 мг/л.

Выращивание проводили в конических стеклянных колбах объемом 250 мл (30 мл суспензии в колбе) или 100 мл (12 мл суспензии в колбе) в темноте, при скорости вращения качалки 100 об/мин, температура в камере $26 \pm 0.1^\circ\text{C}$, влажность 60–70%. Пересадку осуществляли на 14 сутки выращивания, соотношение инокулюм/свежая среда — 1/10.

Для характеристики роста суспензионной культуры на разных средах использовали содержание сырой и сухой биомассы в 1 л среды. Для определения сырой и сухой биомассы пробу суспензии клеток (содержимое одной колбы, 12–30 мл) отфильтровывали на воронке Бюхнера через бумажный фильтр под вакуумом [10]. Высушивание биомассы проводили методом сублимационного обезвоживания.

На основании полученных результатов вычисляли параметры роста суспензионной культуры, такие как индекс роста (I) и удельная скорость роста (μ). Для расчетов использовали следующие формулы [10]:

Таблица 1. Характеристики роста (3 цикл культивирования после перевода культуры со стандартной среды) и содержание фураностаноловых гликозидов (ФГ) в суспензионной культуре клеток *T. terrestris* при выращивании на средах с различными комбинациями регуляторов роста

Содержание регуляторов роста в среде		Ростовые параметры, 3 цикл после смены среды			Содержание ФГ в сухой биомассе, %	
Ауксины	Цитокинины	I	μ , сут ⁻¹	M_{\max} , г/л	2 цикл	3 цикл
2 мг/л 2,4-Д	1 мг/л БАП	14.1 ± 0.7	0.28 ± 0.01	9.9 ± 0.5	0.20 ± 0.01	0.12 ± 0.01
2 мг/л α -НУК	1 мг/л БАП	13.3 ± 0.7	0.27 ± 0.01	13.3 ± 0.7	0.38 ± 0.02	<0.02
1 мг/л α -НУК	1 мг/л кинетина	12.0 ± 0.6	0.21 ± 0.01	10.8 ± 0.5	0.48 ± 0.02	0.30 ± 0.02
1 мг/л α -НУК	3 мг/л кинетина	11.3 ± 0.6	0.19 ± 0.01	13.6 ± 0.7	<0.02	0.22 ± 0.01
1 мг/л α -НУК	6 мг/л кинетина	12.0 ± 0.6	0.17 ± 0.01	14.4 ± 0.7	<0.02	0.27 ± 0.01
1 мг/л α -НУК	9 мг/л кинетина	12.4 ± 0.6	0.26 ± 0.01	14.9 ± 0.7	0.24 ± 0.01	0.33 ± 0.02
–	1 мг/л кинетина	4.6 ± 0.2	0.27 ± 0.01	4.4 ± 0.2	0.24 ± 0.01	0.17 ± 0.01
2 мг/л α -НУК	1 мг/л кинетина	6.4 ± 0.3	0.30 ± 0.02	6.3 ± 0.3	0.82 ± 0.04	0.24 ± 0.01
4 мг/л α -НУК	1 мг/л кинетина	7.2 ± 0.4	0.32 ± 0.02	6.0 ± 0.3	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01
8 мг/л α -НУК	1 мг/л кинетина	4.8 ± 0.2	0.32 ± 0.02	5.7 ± 0.3	<0.02	<0.02

Примечание: I – индекс роста, μ – удельная скорость роста, M_{\max} – максимальное накопление сухой биомассы. Среда с 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БА П – стандартная среда выращивания (контроль). Анализ содержания ФГ проводили на 14 сутки цикла выращивания.

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

$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1)$, где X_2 и X_1 – значения критерия роста (сухая масса клеток) в момент времени t_2 и t_1 соответственно (рассчитывали для экспоненциальной фазы роста).

Микрофотографии суспензионной культуры клеток сделаны на оптическом микроскопе PZO SK14 (Польша) с помощью цифровой камеры Tourcam UCMS14000KPA 14.0 Мпикс (Китай).

Для качественного анализа стероидных гликозидов в исследуемых вариантах суспензионной культуры клеток использовали ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электро-распылением (UPLC-ESI-MS). Методика UPLC-ESI-MS анализа опубликована ранее [8].

Общую экстракцию стероидной фракции проводили из лиофилизированной биомассы 70% этанолом (соотношение биомасса : растворитель – 1 : 40 (масса : объем)) на ультразвуке 3 раза по 30 мин при комнатной температуре (УЗ-ванна “Сапфир”, Россия). Объединенный экстракт упаривали досуха под вакуумом при 55°C и растворяли в воде. Полученный раствор наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (“Supelco”, США). Затем патрон последовательно промывали водой и 70% этанолом. Полученный спиртовой экстракт упаривали досуха под вакуумом при 55°C и использовали для химического анализа.

Для количественного анализа стероидных гликозидов фураностанолового ряда применяли спек-

трофотометрический метод. 0.4 мл спиртового экстракта отбирали в пробирки Эппендорф и добавляли 1.0 мл реактива Эрлиха (1% раствор *n*-диметиламинобензальдегида в смеси концентрированная соляная кислота : этанол – 34 : 66, по объему). Пробирки закрывали и помещали в термостат при 60 ± 1°C на 1 ч. После охлаждения пробирок проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО, Россия) при 520 нм. Концентрацию фураностаноловых гликозидов вычисляли по калибровочному графику, построенному по препарату “Дельгостим” (смесь фураностаноловых гликозидов, выделенных из биомассы культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall.).

Определение ростовых характеристик (содержание сырой и сухой биомассы) проводили в 2–3 биологических повторностях. Для спектрофотометрического метода анализа погрешность прибора при измерении оптической плотности была не более 0.5%. Анализ данных проводили с помощью программы Excel, входящей в состав офисного пакета приложений Microsoft Office 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выяснения роли регуляторов роста с цитокининовой активностью на физиолого-биохимические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* культуру, выращиваемую на стандартной среде (содержащей в качестве регуляторов роста 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП) перевели на среды с различными комбинациями синтетических ауксинов (2,4-Д, α -НУК) и цитокининов (БАП, кинетин) (табл. 1).

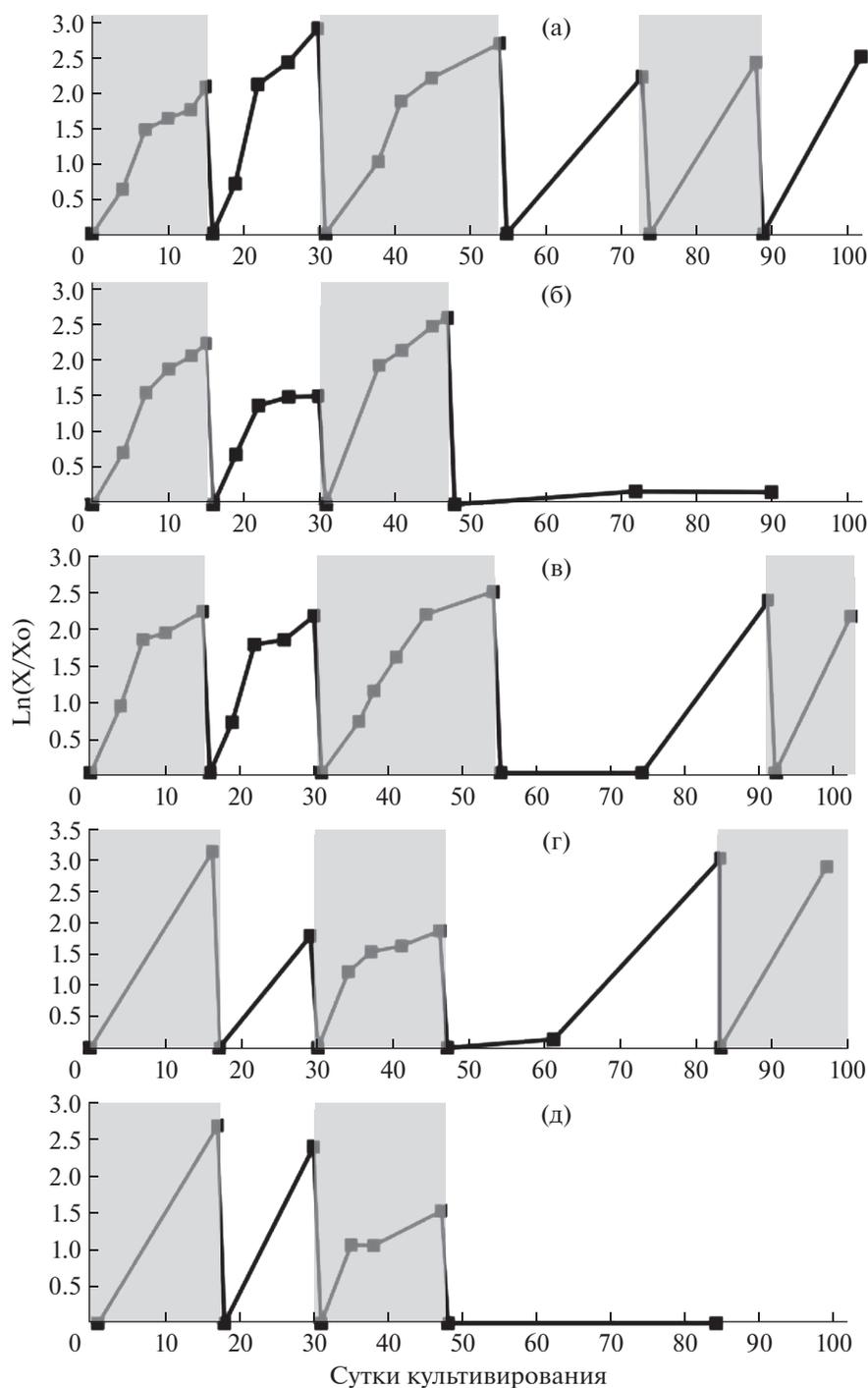


Рис. 1. Динамика роста (накопление сухой биомассы) в полулогарифмической системе координат суспензионной культуры клеток *T. terrestris* на средах с 2 мг/л 2,4-Д – 1 мг/л БАП (а), 2 мг/л α -НУК – 1 мг/л БАП (б), 1 мг/л α -НУК – 1 мг/л кинетина (в), 2 мг/л α -НУК – 1 мг/л кинетина (г) и 1 мг/л кинетина – без ауксинов (д). Чередующимся затемнением выделено начало и окончание каждого индивидуального цикла.

Установлено, что после перевода культуры на экспериментальные варианты сред, она во всех случаях сохраняет способность к активному росту в течение как минимум 3 циклов выращивания. На рис. 1 представлены кривые роста в полулогарифмической системе координат для пяти из исследуемых вариантов.

При этом на средах, содержащих кинетин и высокие концентрации α -НУК (2–8 мг/л) или при отсутствии ауксинов, к третьему циклу выращивания можно отметить существенное снижение ростовых параметров (индекса роста, максимального накопления биомассы – табл. 1).

После трех циклов выращивания на большинстве экспериментальных вариантов сред (семи из девяти исследованных) культура клеток *T. terrestris* перестает расти и в результате погибает. Однако при определенном составе регуляторов роста в питательной среде (1 или 2 мг/л α -НУК + 1 мг/л кинетина) после длительной лаг-фазы (12–18 суток) рост культуры возобновляется (рис. 1в, 1г), после чего возможно ее длительное субкультивирование. На одном из этих вариантов сред (2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина) культуру клеток *T. terrestris* выращивали более двух лет, при этом она сохраняла высокие ростовые характеристики (максимальный уровень накопления сухой биомассы (M_{\max}) 12–16 г/л, индекс роста (I) 13–18, удельная скорость роста (μ) 0.18–0.28 сут⁻¹). Кривые роста культуры клеток *T. terrestris* на среде, содержащей 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина после почти 3 лет субкультивирования на этой среде (68 цикл выращивания) представлены на рис. 2.

Анализируя полученные результаты, можно предположить, что после изменения состава среды культура клеток в течение нескольких (2–4) циклов выращивания поддерживает рост за счет использования “остаточных” количеств регуляторов роста исходной среды. В это время происходит изменение популяции за счет отбора клеток, способных пролиферировать в условиях измененной композиции регуляторов роста. После формирования жизнеспособной популяции возобновляется рост культуры, при невозможности отбора таких клеток – популяция погибает.

Для подтверждения изложенного варианта объяснения полученных результатов, был проведен цитологический анализ клеток *T. terrestris* при выращивании на разных средах. Показано, что при использовании стандартной среды выращивания с 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП клетки *in vitro* в популяции выявляются как небольшие агрегаты клеток, состоящие из мелких округлых меристемоподобных клеток, так и в виде гигантских цилиндрических клеток. Длина этих клеток относится к ширине как 4 : 1 и их доля в клеточной популяции составляет не менее 65–70%. Также встречаются единичные паренхимоподобные овальные клетки размером 40–50 мкм. Центральную часть клеток занимает центральная вакуоль, которую пронизывают цитоплазматические тяжи. Вакуоль не содержит видимых включений. Ядро расположено либо в цитоплазматических тяжах, либо занимает пристенное положение (рис. 3а). При замене в среде ауксинов (с 2,4-Д на α -НУК; среда содержит 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л БАП) наблюдаются значительные морфологические и структурные перестройки состава популяции клеточной культуры *T. terrestris*. При выращивании на этой среде культура представлена преимущественно агрегатами меристемоподобных и/или паренхимопо-

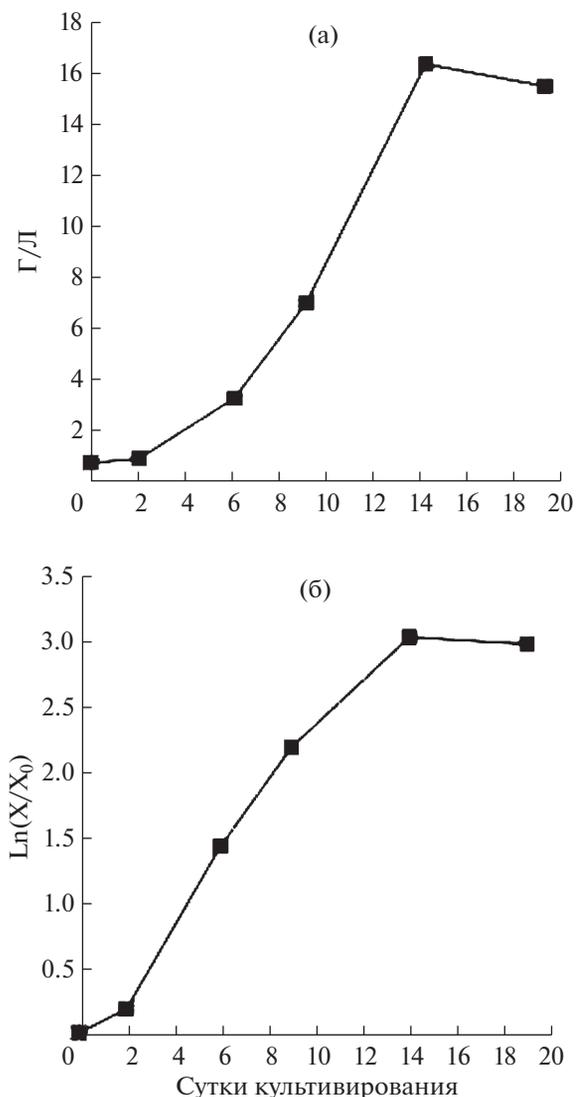


Рис. 2. Кривая роста (накопление сухой биомассы) суспензионной культуры *T. terrestris* на среде с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина в стандартной (а) и полуполюгарифмической (б) системе координат (68-й цикл выращивания после перевода со стандартной среды культивирования, содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП).

добных округлых клеток. Часто агрегаты имеют вид закрученных “улиток” и складывается впечатление, что они формируются из гигантских клеток, которые приступили к активной цитотомии. Цитоплазма в клетках более плотная, крупные вакуоли отсутствуют, ядра не просматриваются, однако выявляются многочисленные мелкие темноокрашенные кольцевидные включения, располагающиеся в цитоплазме хаотично (рис. 3б). При изменении в среде регуляторов роста как ауксиновой, так и цитокининовой природы (среда с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина) в суспензии преобладают одиночные крупные овальные паренхимоподобные клетки, которые по общему плану

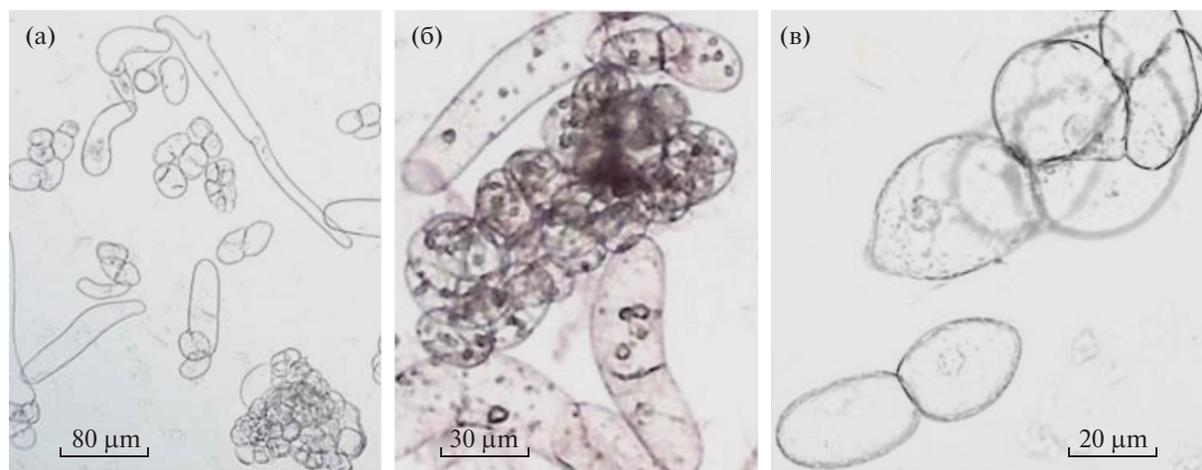


Рис. 3. Микрофотографии суспензионной культуры клеток *T. terrestris* на средах с разным составом регуляторов роста: (а) – 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП; (б) – 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л БАП; (в) – 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л кинетина.

строения аналогичны выращенным на стандартной среде (рис. 3б). В популяции присутствует незначительное количество “гигантских” клеток. Учитывая, что в случае использования среды с 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л БАП, культура клеток не способна расти более 3–4 циклов, то, вероятно, данные структурные перестройки в популяции клеток и морфологические изменения клеток оказывают существенное влияние на ростовые процессы суспензии. В пользу этого предположения свидетельствует также то, что в предыдущей работе при культивировании суспензионной культуры клеток *T. terrestris* на среде с 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л α-НУК и 1 мг/л БАП было показано увеличение агрегированности клеток без формирования внутриклеточных включений и в этой ситуации наблюдался стабильный и хороший рост культуры на протяжении более 5 циклов выращивания [8]. Таким образом установлено, что изменения в составе регуляторов роста оказывают значительное влияние на цитофизиологические особенности культуры клеток.

Во время 2-го и 3-го цикла культивирования после перевода культуры на среды с разными концентрациями ауксинов и цитокининов был выполнен количественный анализ содержания фураностаноловых гликозидов (ФГ) в клеточной биомассе (табл. 1). Проведенный анализ показал, что практически для всех вариантов уровень содержания ФГ находился в пределах 0.2–0.8% к сухой биомассе. Фураностаноловые гликозиды не были обнаружены в варианте с максимальной концентрацией α-НУК в среде, а также во время второго цикла выращивания культуры клеток на средах с 3 и 6 мг/л кинетина. Максимальное содержание ФГ было отмечено для культур, выращиваемых на вариантах сред, способных поддерживать рост культуры клеток в течение длитель-

ного времени – 0.8% к сухой биомассе на среде с 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л кинетина, и 0.5% – для среды с 1 мг/л α-НУК и 1 мг/л кинетина. Для культуры клеток, выращиваемой на контрольной среде (2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП) содержание фураностаноловых гликозидов было в пределах 0.1 – 0.2%. Уровень накопления стероидных гликозидов в биомассе клеток выращиваемой в течение трех лет (более 70 циклов субкультивирования) суспензионной культуре *T. terrestris* на среде с 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л кинетина не опускался ниже 0.2–0.3% к сухой биомассе.

Для суспензионной культуры клеток *T. terrestris* длительно выращиваемой на среде с 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л кинетина с целью структурной идентификации фураностаноловых гликозидов был проведен UPLC-ESI-MS анализ [7]. UPLC-ESI-MS хроматограмма (записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов) очищенных экстрактов из биомассы клеток *T. terrestris* (68 цикл культивирования, 21 сутки выращивания) представлена на рис. 4. Идентификацию соединений проводили на основании расшифровки результатов масс-спектрометрии (фрагментации протонированных молекул гликозидов в источнике ионизации), анализа относительного хроматографического поведения соединений и сопоставления этих результатов с данными литературы [8, 11, 12].

В общей сложности в биомассе суспензионной культуры клеток якорцев стелющихся, выращенной на среде с 2 мг/л α-НУК и 1 мг/л кинетина было выявлено 4 стероидных гликозида фураностанолового типа (табл. 2). В соответствии с порядком увеличения гидрофобности (времени удерживания на обращенной фазе хроматографической колонки) обнаруженные гликозиды обозначены номерами 1 – 4.

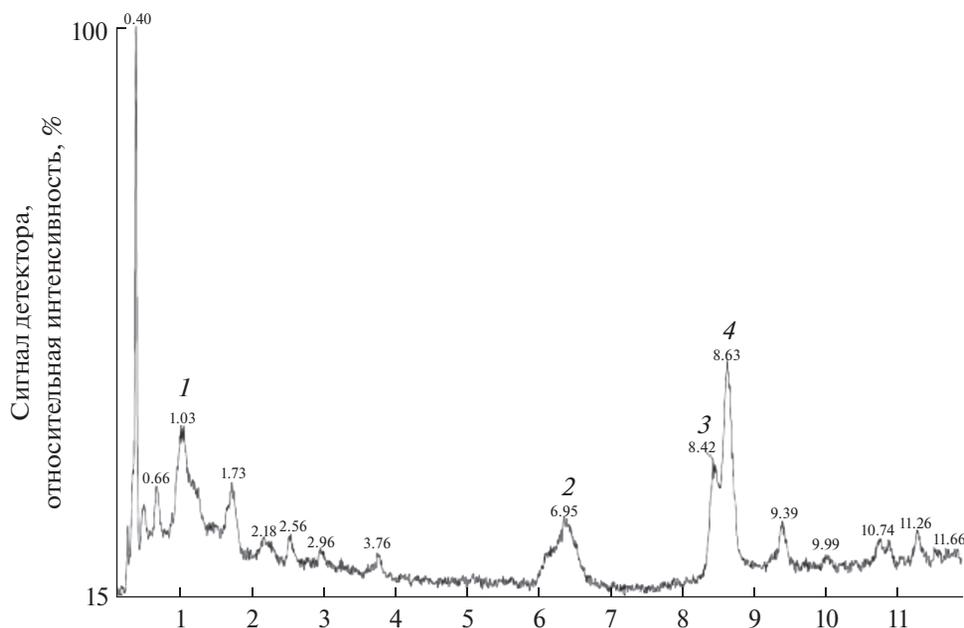


Рис. 4. UPLC-ESI-MS-хроматограмма (записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris* на среде с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина (68 цикл, 21 сутки выращивания). Номера 1–4 – пики идентифицированных гликозидов (табл. 2).

В качестве агликонов обнаруженных гликозидов выступают фураностаноловые формы производных следующих стероидов [8, 11, 12]: гидрокси-диосгенин (характеристический ион – m/z 431; гликозид 1) и тигогенин/неотигогенин (характеристический ион – m/z 417; гликозиды 2–4).

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных в ходе исследования результатов можно заключить, что оптимизация химических (изменение состава и соотношения синтетических регуляторов роста) условий культивирования суспензионной культуры *T. terrestris* способна оказывать значительное влияние на ее ростовые и биосинтетические характеристики.

Как уже было отмечено, в наших предыдущих работах было исследовано влияние регуляторов роста с ауксиновой активностью на рост культуры клеток якорцев и биосинтез стероидных гликозидов. Было показано, что при выращивании культуры клеток *T. terrestris* на средах, содержащих 2,4-Д наблюдается интенсивный рост культуры, но весьма низкая концентрация фураностаноловых гликозидов (не более 0.1–0.2% к сухой биомассе клеток). Замена в среде выращивания 2,4-Д на α -НУК приводила к повышению в культивируемых клетках как уровня содержания стероидных гликозидов (до 6 раз – 0.7% по сухой биомассе), так и к увеличению их структурного разнообразия (девять идентифицированных олигофураностанозидов на среде с α -НУК по сравне-

Таблица 2. Результаты UPLC-ESI-MS анализа (регистрация положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенной на среде с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина (68 цикл, 21 сутки выращивания) (номера хроматографических пиков соответствуют таковым на рис. 4)

Номер пика	t_R , мин*	Масс-спектры, m/z **			Результаты идентификации
		$[M-H_2O+H]^+$	$[M+Na]^+$	Осколочные ионы	
1	1.03	1241.6	–	1079.5, 917.5, 755.4, 593.4, 431.3	Пентагексозил-гидрокси-диосгенин (фураностаноловая форма)
2	6.35	1227.6	–	1065.6, 903.5, 741.4, 579.4, 417.3	Гексозил-25(R)-террестрозин Н
3	8.42	1049.5	1089.5	903.5, 887.5, 741.4, 725.4, 579.4, 417.3	25(S)-прототеррестрозин В
4	8.60	1049.5	–	903.5, 887.5, 741.4, 579.4, 417.3	25(R)-прототеррестрозин В

Примечание: * – время удерживания на хроматографической колонке, мин; ** – данные масс-спектров (указаны значения m/z для обнаруженных ионов).

нию с пятью на среде с 2,4-Д). Однако данные изменения сопровождались образованием крупных клеточных агрегатов и постепенным снижением (в течение 3–4 циклов выращивания) жизнеспособности культуры, вплоть до ее гибели. В то же время, совместное присутствие двух синтетических аналогов ауксинов (α -НУК и 2,4-Д) в среде выращивания также стимулировало увеличение содержания в клетках *T. terrestris* стероидных гликозидов – но в меньшей степени (примерно в 3 раза – до 0.3% по сухой биомассе), однако в этом случае культура имела относительно стабильный рост и высокую жизнеспособность [8]. Выявленные закономерности оказались практически идентичны обнаруженному ранее эффекту при аналогичной замене 2,4-Д на α -НУК для культуры клеток женьшеня *Panax ginseng* С.А.Меу. При этой замене также были отмечены изменения степени агрегированности клеток, снижение ростовых характеристик культуры, но расширился качественный состав и повышалось количественное содержание тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов) [13]. Подобные изменения, зафиксированы для культур клеток разных видов растений, указывают на противоположное влияние двух аналогов ауксинов на процессы пролиферации и дифференцировки клеток *in vitro*, что вполне подтверждается данными литературы [14, 15].

Столь существенное воздействие на физиолого-биохимические свойства культур клеток регуляторов роста ауксиновой природы сделало закономерным вопрос о влиянии на эти характеристики цитокининовых регуляторов роста.

Цитокинины участвуют в различных важнейших процессах жизнедеятельности растений, а также в регуляции многих ключевых генов. Они взаимодействуют сложным образом, контролируя множество аспектов, связанных с ростом, развитием и дифференцировкой, в том числе на клеточном уровне [16, 17]. Регуляторы роста цитокининовой природы имеют противоположные функции в меристемах корней и побегов. Известно, что разные цитокинины способны оказывать различное влияние на регенерацию побегов *in vitro*, к примеру, БАП был эффективен при увеличении числа побегов, тогда как кинетин активно стимулировал удлинение побегов [18, 19]. Стоит также отметить, что есть сведения о положительном влиянии кинетина на формирование мелкоагрегированной суспензионной культуры клеток масличной пальмы, которая впоследствии содержала хорошо делящиеся изодиаметрические клетки [20]. Несмотря на имеющиеся данные о влиянии цитокининов на ростовые процессы культур клеток, их роль в регуляции вторичного метаболизма в клетках *in vitro* исследована недостаточно.

Проведенное в настоящей работе исследование влияния синтетических аналогов ауксинов

(2,4-Д, α -НУК) и цитокининов (БАП, кинетин) на рост суспензионной культуры *T. terrestris* показало, что при определенной комбинации не поддерживающего ростовые процессы ауксинового регулятора роста α -НУК с кинетином (а именно 1 или 2 мг/л α -НУК + 1 мг/л кинетина) удается получить длительный (не менее 3 лет) и стабильный рост культуры клеток якорцев. При этом для поддержания роста культуры важна не только структура цитокинина (кинетин, но не БАП), но и его концентрация и/или соотношение ауксин/цитокинин. На основе результатов работы можно предположить, что получение длительно растущей культуры клеток на измененной среде происходит за счет формирования новой популяции клеток, адаптированной к новым условиям культивирования.

Важно, что при длительном культивировании клеток на среде с α -НУК и кинетином содержание стероидных гликозидов в клетках было достаточно высоким (не менее 0.2 – 0.3% к сухой биомассе), что практически совпадает с характеристиками длительно выращиваемой культуры на среде с двумя ауксинами – α -НУК и 2,4-Д. При этом качественный состав обнаруженных фураностаноловых гликозидов также достаточно близок – идентифицированы 4 и 5 соединений соответственно. При использовании среды, не поддерживающей длительный рост культуры (2 мг/л α -НУК и 1 мг/л БАП) спектр соединений существенно богаче – отмечено образование как минимум 9 фураностаноловых гликозидов [8].

В настоящее время трудно судить, определяются ли полученные совпадения и/или различия в ростовых характеристиках и в составе и содержании стероидных гликозидов только следствием различных комбинаций ауксиновых и цитокининовых регуляторов роста или это связано с более общими популяционными механизмами развития уникальной биологической системы – культуры клеток высших растений.

Полученные результаты позволяют предположить, что изменение состава и концентрации регуляторов роста цитокининовой природы, как и в случае с синтетическими аналогами ауксинов, имеет существенное значение для оптимизации ростовых и биосинтетических характеристик культур клеток высших растений, однако для выявления конкретных механизмов данного явления требуются дополнительные исследования.

Работы по выращиванию культур клеток проводили при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (договор № 19-14-00387); фитохимические анализы выполнены на базе «Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших

растений и микроводорослей” при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куркин В.А., Авдеева Е.В., Куркина А.В., Правдивцева О.Е., Браславский В.Б. Современная фитотерапия как наука и учебная дисциплина в медицинском и фармацевтическом образовании // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11. С. 149.
2. Хотим Е.Н., Жигальцов А.М., Кумара А. Некоторые аспекты современной фитотерапии // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2016. Т. 3. С. 136.
3. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Applied Biochemistry and Microbiology. 2012. V. 48. P. 609. <https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
4. Kostova I., Dinchev D. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity // Phytochemistry Reviews. 2005. V. 4. P. 111. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-2833-x>
5. Wu T.S., Shi L.S., Kuo S.C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris* // Phytochemistry. 1999. V. 50. P. 1411. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01086-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01086-8)
6. 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. <https://doi.org/10.1016/0234-2758-2016-32-4-21>
7. Томилова С.В., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Носов А.М. Влияние повышенных концентраций ионов меди на ростовые характеристики и синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris* L. // Биотехнология. 2019. Т. 35. С. 42. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-3-42-49>
8. 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 α -НУК – на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. // Физиология растений. 2020. Т. 67. С. 389. <https://doi.org/10.31857/S001533032004017X>
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
10. 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.
11. Zheng W., Wang F., Zhao Y., Sun X., Kang L., Fan Z., Qiao L., Yan R., Liu S., Ma B. Rapid characterization of Constituents in *Tribulus terrestris* from Different Habitats by UHPLC/Q-TOF MS // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2017. V. 28. P. 2302. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1761-5>
12. Mulinacci N., Vignolini P., la Marca G., Pieraccini G., Innocenti M., Vincieri F. Food supplements of *Tribulus terrestris* L.: An HPLC-ESI-MS method for an estimation of the saponin content // Chromatographia. 2003. V. 57. P. 581. <https://doi.org/10.1007/BF02491733>
13. Смоленская И.Н., Решетняк О.В., Смирнова Ю.Н., Черняк Н.Д., Глоба Е.Б., Носов А.М., Носов А.В. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 243.
14. Campanoni P., Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 939. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053843>
15. Rao S.R., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2002. V. 20. P. 101. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00007-1)
16. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Onckelen H.V., Schmulling T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // The Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2532. <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>
17. Mazid M., Khan T.A., Mohammad F. Cytokinins, a classical multifaceted hormone in plant system // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2011. V. 7. P. 347.
18. Ashraf M.F., Aziz M.A., Kemat N., Ismail I. Effect of cytokinin types, concentrations and their interactions on *in vitro* shoot regeneration of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernandez // Electronic Journal of Biotechnology. 2014. V. 17. P. 275. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.08.004>
19. Hagos R., Gebremdhin H. Effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* shoot induction and multiplication of korarima // Int. J. Genet. Mol. Biol. 2015. V. 7. P. 8. <https://doi.org/10.5897/IJGMB2015.0108>
20. Te-chato S., Hilae A., In-peuy K. Effects of cytokinin types and concentrations on growth and development of cell suspension culture of oil palm // Journal of Agricultural Technology. 2008. V. 4. P. 157.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ (ИНТЕГРАЦИОННЫЙ) ПОДХОД
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПАРАМЕТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ХЛОРОФИЛЛА ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ© 2022 г. Т. В. Нестеренко^а, А. А. Тихомиров^{а,б}, В. Н. Шихов^{а,*}^а Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр
“Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия^б Сибирский государственный университет, Красноярск, Россия

*e-mail: v_shikhov@ibp.ru

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 19.11.2021 г.

Принята к публикации 29.11.2021 г.

На примере листьев пшеницы *Triticum aestivum* L. и растений редиса *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers. сорта “Вировский белый” изучали возможность использования интегральных характеристик медленной стадии индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ) для мониторинга физиологического состояния растений в ценозах в условиях светокультуры. Исследовали поведение $T_{0.5}$ (время полуспада интенсивности флуоресценции хлорофилла от максимума к стационарному уровню), R_{fd} (индекс спада флуоресценции, известный также как “индекс жизнеспособности”), параметра \bar{V}_{max} (максимально возможная средняя скорость индукционного перехода) и $\bar{\alpha}$ (средняя эффективность ФСА в индукционный период) в онтогенезе листа. Объектом исследования служили высечки разновозрастных равномерно освещенных листьев верхнего (шестого) яруса растений пшеницы и высечки вторых (по мере появления) настоящих листьев редиса в возрасте от 3 до 24 дней. Растения выращивали в контролируемых условиях вегетационных камер методом гидропонии на керамзите при облученности 100 Вт/м² фотосинтетически активной радиации (ФАР). Регистрацию кривых ИФХ проводили на однолучевой установке. Величина параметра $T_{0.5}$ незначительно изменялась на протяжении онтогенеза листьев и до момента их старения (26-суточный возраст). Показатель относительных изменений величин параметров ИФХ (Δ отн., %) в возрастном периоде с 2 до 24 сут составлял для $\bar{\alpha}$ 28% и $T_{0.5}$ – 30%. Для \bar{V}_{max} и R_{fd} значения соответствовали 67 и 70%. При дальнейшем старении и сравнении параметров 24- и 26-суточных листьев наблюдали в наибольшей степени изменения значений для $T_{0.5}$ (на 37.6%) и \bar{V}_{max} (на 36.0%) и в меньшей степени для $\bar{\alpha}$ (на 23.0%) и R_{fd} (на 13.0%). Таким образом, наблюдаемые нами особенности в поведении параметра $T_{0.5}$ в онтогенезе листьев пшеницы в сравнении с изменениями значений других флуоресцентных параметров медленной стадии ИФХ (R_{fd} , $\bar{\alpha}$ и \bar{V}_{max}) подтверждают перспективность использования $T_{0.5}$ в качестве одного из наиболее простых интегральных показателей физиологического состояния и индикатора патофизиологических (необратимых) изменений листьев растений в широком возрастном диапазоне и при старении. Для однозначной интерпретации данных при использовании параметра $T_{0.5}$ в стрессовых условиях для оценки необратимости наблюдаемых изменений ФСА необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers., индукция флуоресценции хлорофилла, онтогенез листьев растений, интегральные показатели ИФХ

DOI: 10.31857/S0015330322030113

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в экологических исследованиях и в области физиологии фотосинтеза и стресса растений широкое применение получил биофи-

зический метод, основанный на явлении индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ) [1]. Как правило, параметры, используемые для характеристики состояния растений, в основном связаны с характеристикой фотосинтетического аппарата на разных уровнях его организации [1, 2]. К наиболее часто используемым параметрам ИФХ на уровне листа при изучении стрессов растений

Сокращения: ИРП – интенсивность радиации приспособления; ИФХ – индукция флуоресценции хлорофилла; ФАР – фотосинтетически активная радиация; ФСА – фотосинтетический аппарат.

относится так называемый “индекс жизнеспособности” (R_{fd}), основанный на амплитудных параметрах флуоресценции хлорофилла [2–4]. Несмотря на то, что уровень флуоресценции хлорофилла определяется редокс-состоянием первичного акцептора ФС2, основную роль в регуляции активности ФС2 играет редокс-состояние пластохинонового пула [5]. В свою очередь, редокс-состояние пластохинонового пула определяется соотношением скоростей реакций фотосинтеза, темнового и светового дыхания и других метаболических процессов в растительной клетке [6]. Несмотря на то, что все стрессовые факторы, действующие на какую либо часть растения, в конечном итоге прямо или косвенно влияют на фотосинтез, устойчивость растений и их урожайность зависят не только от состояния ФСА [7]. Так, установлено, что при увеличении интенсивности фотосинтеза, в зависимости от условий (температуры, освещения, влажности) разброс урожайности меняется в процентах в диапазоне от –1 до 12 [8]. Субклеточное регулирование фотосинтетического процесса связано со структурно-функциональным единством хлоропластов и митохондрий и внутренней интеграцией энергообмена в растительной клетке [6, 9].

Наиболее объективно физиологическое состояние листового аппарата растения может быть оценено через соотношения, отражающие взаимосвязь основных физиологических процессов, например, долю суммарного дыхания от истинного фотосинтеза (гроссфотосинтеза) и т.д. [7, 10]. Показано, что при выращивании растений в оптимальных условиях внешней среды имеет место согласование дыхания и фотосинтеза, и количественные соотношения этих процессов у растений за сутки стремятся к минимальным значениям (примерно 38–40%). Эти значения близки у разных видов растений [10]. В стрессовых условиях соотношение суммарного дыхания к гроссфотосинтезу, как правило, увеличивается, причем более значительно у неустойчивых и неадаптированных к данному типу стресса видов [11]. Физиологические классические методы, как правило, не являются оперативными, что затрудняет экологический мониторинг, анализ и прогноз состояния растений при их использовании.

При выборе параметров для контроля за состоянием растений высокая чувствительность параметров к внешним воздействиям еще не может служить однозначным доказательством пригодности их использования в системе экологического мониторинга. По мнению Н.Г. Булгакова, помимо таких необходимых качеств, как достоверность информации, ее воспроизводимость, методическая простота и технологичность данных, выбранные параметры контроля должны иметь возможность однозначной физиологической интерпретации данных для ответа на вопрос об

патофизиологических изменениях или обративших адаптивных реакций растений на внешние воздействия [12, стр. 119].

Поскольку в последнее время при оценке стрессоустойчивости растений уделяется большое внимание роли регуляторных систем, в работе [13] в качестве удобного интегрального показателя состояния ФСА листьев растений был предложен временной параметр ИФХ $T_{0.5}$ (время полуспада интенсивности флуоресценции хлорофилла в течение медленной фазы ИФХ). $T_{0.5}$ представляет собой интегральную характеристику скорости активации ряда фотоассимиляционных и фотозащитных процессов в листе [2, 3]. Наблюдаемые в экспериментах особенности в поведении $T_{0.5}$ и сравнение его с другими показателями ИФХ дали основания предположить перспективность применения $T_{0.5}$ в ситуациях, когда необходим оперативный интегральный контроль за состоянием ФСА [13, 14]. Однако возникает вопрос, является ли возможным более широкое применение этого параметра для оценки физиологического состояния ФСА не только на молекулярном и клеточном, но и на листовом уровнях, по крайней мере, с учетом работы энерготрансформирующей подсистемы растительных клеток (хлоропластов и митохондрий).

Известно, что некоторые авторы рассматривают старение растений как один из видов стресса (имеются ряд эндогенных изменений, ухудшающих внутреннюю среду) [15–17]. Поэтому представляет интерес изучение поведения параметра $T_{0.5}$ по сравнению с другими флуоресцентными показателями в онтогенезе листьев растений в контролируемых оптимальных условиях, для которых показана стабильность отношения дыхания к гроссфотосинтезу для C_3 растений на завершающем этапе вегетационной фазы роста [11].

Цель работы – сравнительное изучение интегральных характеристик медленной стадии ИФХ ($T_{0.5}$, R_{fd} и ранее введенных параметров – средней эффективности ФСА в индукционный период $\bar{\alpha}$ и максимально возможной средней скорости индукционного перехода \bar{V}_{max} [18]) листьев растений пшеницы и редиса в условиях светокультуры для оценки перспективности их использования как наиболее простых интегральных показателей физиологического состояния листьев растений в их онтогенезе и как индикаторов на патофизиологические изменения при старении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высечки разновозрастных равномерно освещенных флаг-листьев (верхнего шестого яруса) растений пшеницы *Triticum aestivum* L. линии 232 селекции Г.М. Лисовского [19] и высечки разновозрастных листьев

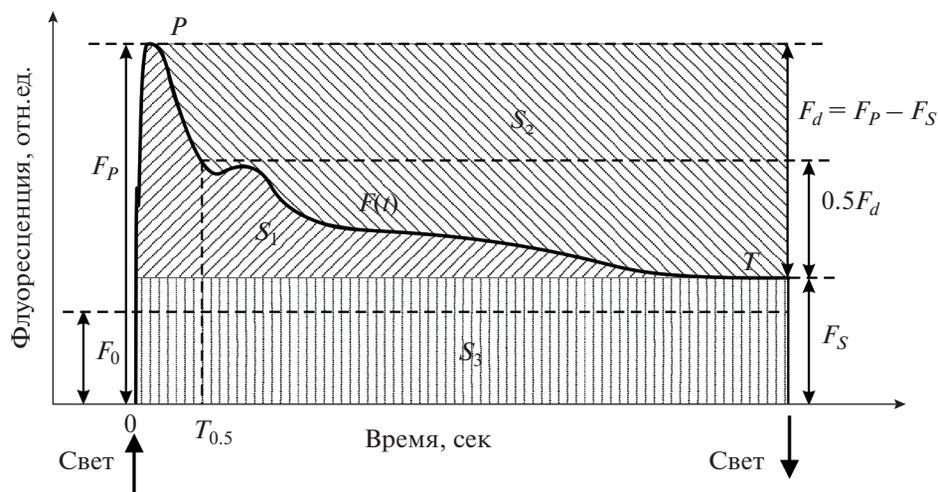


Рис. 1. Типичная кривая медленной стадии индукции флуоресценции хлорофилла листа. Используются следующие параметры: время полуспада $T_{0,5}$ интенсивности флуоресценции хлорофилла от максимума F_p к стационарному уровню F_s , где F_p — максимальная (в пределах фотоиндукционной кривой) флуоресценция хлорофилла в условиях ненасыщающего света, а F_s представляет интенсивность флуоресценции хлорофилла в условиях стационарного освещения. Энергетический интегральный показатель S_1 — площадь, ограниченная сверху кривой $F(t)$ и снизу прямой $F(t) = F_s$, $S_0 = S_1 + S_2 + S_3$, S_2 — площадь над индукционной кривой; S_0 — площадь прямоугольника со сторонами T и F_p ; S_3 — площадь прямоугольника со сторонами T и F_0 .

растений редиса *Raphanus sativus var. radicola Pers.* сорта “Вировский белый”. Для экспериментов по влиянию интенсивности возбуждающего флуоресценцию света на значения параметров ИФХ использовали высечки вторых (по мере появления) настоящих листьев редиса в возрасте от 3 до 24 дней, измерения были выполнены в 5–6 повторностях. Растения выращивали в вегетационных камерах методом гидропоники на керамзите при непрерывной облученности 100 Вт/м^2 ФАР [19, 20]. Источником излучения служила ксеноновая лампа ДКстВ-6000 (НПП “Разряд”, Россия). Эксперименты проведены в 3-кратной биологической повторности. Кривые ИФХ регистрировали на однолучевой установке, принципиальная схема которой описана в работе [21]. В качестве источника излучения использовалась лампа накаливания КГМ 250 Вт, 24 В (НИИС им. А. Н. Лодыгина, Россия). Для выделения спектральной области 400–500 нм (возбуждающий флуоресценцию свет) применяли зеленый светофильтр СЗС-22 (“ЛОМО”, Россия) с максимумом пропускания около 450 нм. Флуоресценцию регистрировали при 685 ± 2 нм. Постоянная времени установки составляла 0.3 с. Для получения интенсивности возбуждающего света в диапазоне $20\text{--}80 \text{ Вт/м}^2$ ФАР применяли комбинацию нейтральных светофильтров. Время регистрации одной кривой ИФХ составляло 1–3 мин. Темновая адаптация образцов длилась 15–20 мин. Определяли время полуспада ($T_{0,5}$) интенсивности флуоресценции хлорофилла от максимума F_p к стационарному уровню F_s [18] (рис. 1). Для сравнения в качестве

интегрального показателя состояния ФСА на уровне листа был использован индекс спада флуоресценции R_{fd} [2–4], известный также как индекс жизнеспособности, часто применяемый в физиологии растений в качестве наиболее чувствительного показателя к стрессам растений:

$$R_{fd} = (F_p - F_s) / F_s, \quad (1)$$

где F_p — максимальная (в пределах фотоиндукционной кривой) флуоресценция хлорофилла в условиях ненасыщающего света. Параметр F_s (иногда обозначается как F_T) представляет интенсивность флуоресценции хлорофилла, которая излучается фотосинтезирующими объектами в условиях стационарного освещения. Величина R_{fd} более чувствительна к внешним воздействиям, чем величина максимального квантового выхода фотосинтеза (F_v/F_m — отношение варибельной флуоресценции к максимальной, где $F_v = F_m - F_0$, причем F_m измеряется в момент мощной вспышки, насыщающей фотосинтез, и, как правило, с применением модулирующих флуориметров [1]). Параметр R_{fd} хорошо коррелирует с удельной скоростью фотосинтетической фиксации CO_2 в нормальных зеленых тканях [3, 22]. После темновой адаптации достижение стационарного состояния на индукционной кривой флуоресценции хлорофилла (уровень F_s) занимает около 3–5 мин.

Для оценки интенсивности фотосинтеза на уровне листа использовали параметр \bar{V}_{\max} (максимально возможная средняя скорость индукционного перехода), для которого была показана высокая степень корреляции с интенсивностью фотосинте-

за по сравнению с другими параметрами медленной индукции флуоресценции (0.86–0.95) [18]. Для оценки эффективности ФСА в онтогенезе листьев пшеницы применяли параметр $\bar{\alpha}$, характеризующий среднюю эффективность ФСА в индукционный период. Подробнее введение и определение выше перечисленных параметров описано в работе [18].

Наиболее общей характеристикой кривых ИФХ разного типа в онтогенезе листьев растений является энергетический интегральный показатель S_1 , представляющий собой площадь, ограниченную сверху кривой $F(t)$ и снизу прямой $F(t) = F_s$ (рис. 1):

$$S_1 = \int_0^T F_v(t)dt = \int_0^T F(t)dt - TF_s, \quad (2)$$

где $F_v(t) = F(t) - F_s$, $T \gg T_{0.5}$.

Если вся энергия, высвеченная в индукционный период, пропорциональна площади S , где $S = \int_0^T F(t)dt$, то интеграл S_1 пропорционален переменной части этой энергии.

Разделив выражение (2) на $F_d = (F_p - F_s)$ (максимальная переменная флуоресценция в индукционный период Р–S–М–Т, рис. 1), получим некоторое время t_{\min} , в течение которого высветилась бы вся переменная часть энергии квантов флуоресценции, если бы интенсивность $F(t) = F_d$. Очевидно, что реальное индукционное время T при меняющейся интенсивности процесса $F_v(t) < F_d$, но с той же суммарной энергией высвечивания, будет больше t_{\min} . Поэтому показатель t_{\min} , являясь минимальным временем индукции, отражает потенциальные возможности флуоресцирующей системы [18].

$$t_{\min} = \frac{S_1}{F_d}, \quad (3)$$

$$\bar{V}_{\max} = \frac{F_d}{F_p t_{\min}}. \quad (4)$$

Параметр $\bar{\alpha}$, характеризующий среднюю эффективность ФСА в индукционный период T , определяли по формуле:

$$\bar{\alpha} = \frac{\int_0^T [F_p - F(t)]dt}{F_p T} = \frac{S_2}{S_0}, \quad (5)$$

где $S_0 = S_1 + S_2 + S_3$, S_2 – площадь над индукционной кривой, S_0 – площадь прямоугольника со сторонами T и F_p (рис. 1) [18].

Оценка величины реакции показателей ИФХ (R_{fd} , $\bar{\alpha}$, \bar{V}_{\max} и $T_{0.5}$) листьев растений пшеницы в их онтогенезе проводилась с помощью интегрального логарифмического показателя I [23,

стр. 383], коэффициента вариации (к.в.) и индекса относительных изменений значений параметров при старении Δ отн. с помощью следующих формул:

$$I = \lg \frac{N_i}{N_{i0}}, \quad (6)$$

где N_i – значение соответствующего параметра ИФХ стареющих листьев (26-суточных); N_{i0} – значение параметра ИФХ зрелых листьев (7-суточных);

$$\text{к.в.} = \frac{\delta}{\bar{x}} \times 100, \quad (7)$$

где δ – среднее квадратичное отклонение, \bar{x} – среднее значение параметров листа после завершения роста и до резких изменений значений при старении (от 10- до 24-суточного возраста);

$$\Delta \text{отн.} = \frac{100(N_i - N_{i0})}{N_{i0}}, \quad (8)$$

где N_i – значение соответствующего параметра ИФХ стареющих листьев (26-суточных); N_{i0} – значение параметра ИФХ зрелых листьев до резкого старения (24-суточных).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работах [24, 25] была исследована зависимость значений параметров флуоресценции хлорофилла от интенсивности возбуждающего флуоресценцию света для разновозрастных листьев растений редиса и пшеницы. Результаты экспериментов подтвердили отсутствие видовой специфичности в поведении параметра F_p/F_s в широком диапазоне интенсивности света (до 220 Вт/м² ФАР) [25]. Достоверный рост значений F_p/F_s при увеличении интенсивности возбуждающего флуоресценцию света имел место для самых молодых и наиболее старых листьев пшеницы (2-, 12- и 16-суточных). Для 9-суточных листьев изменения показателя F_p/F_s для обоих случаев были недостоверны. Известно, что именно стадия зрелости характеризуется стабильностью многих показателей при внешних воздействиях в определенном диапазоне [4, 26].

Для выбора оптимальной интенсивности возбуждающего флуоресценцию света при дальнейших исследованиях было изучено поведение флуоресцентных параметров $T_{0.5}$, R_{fd} и \bar{V}_{\max} листьев редиса в четырех вариантах: 20, 40, 60 и 80 Вт/м² ФАР (табл. 1).

При рассмотрении влияния возраста на значения параметра $T_{0.5}$ при одной и той же интенсивности возбуждающего флуоресценцию света были отмечены колебания значений этого параметра в онтогенезе листа. При сравнении разновозраст-

Таблица 1. Влияние интенсивности возбуждающего флуоресценцию света на значения флуоресцентных параметров для разновозрастных листьев редиса

Варианты интенсивности света, Вт/м ²	Возраст листа, сут			
	3	12	18	24
	$T_{0.5}$, с			
20	40.1 ± 2.0	12.5 ± 1.5	23.3 ± 1.6	18.0 ± 1.2
40	20.2 ± 1.3	13.5 ± 1.2	21.2 ± 1.7	10.0 ± 1.3
60	11.5 ± 1.3	9.5 ± 1.3	17.3 ± 1.6	8.6 ± 1.2
80	10.0 ± 1.1	8.3 ± 1.3	18.7 ± 1.4	8.7 ± 1.2
	R_{fd} , отн. ед.			
20	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
40	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2
60	1.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.2
80	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.2
	$\bar{V}_{max} \times 10^{-2}$, с ⁻¹			
20	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2	2.2 ± 0.3	1.0 ± 0.3
40	2.8 ± 0.4	2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.4	3.8 ± 0.5
60	3.5 ± 0.4	4.2 ± 0.4	3.1 ± 0.4	4.8 ± 0.5
80	4.0 ± 0.5	4.3 ± 0.5	3.0 ± 0.3	5.5 ± 0.6

Примечание. Используются следующие параметры: время полуспада ($T_{0.5}$) интенсивности флуоресценции хлорофилла от максимума F_p к стационарному уровню F_s ; индекс жизнеспособности R_{fd} ; максимально возможная средняя скорость индукционного перехода \bar{V}_{max} . Приведены средние значения из 5–6 измерений ± доверительный интервал с уровнем достоверности 0.95.

ных листьев по параметру R_{fd} , характеризующего активность ФСА листа, видно, что значения этого параметра во всем диапазоне исследования выше для зрелого листа по сравнению со значениями этого параметра для молодых и стареющих листьев редиса. Результаты эксперимента, представленные в таблице 1, показывают, что параметр $T_{0.5}$ имеет наименьший диапазон изменений для разновозрастных листьев, начиная с интенсивности 40 Вт/м² и выше (табл. 1). Как для параметра $T_{0.5}$, так и для R_{fd} наименьшее влияние возраста листьев растений редиса имело место при интенсивности возбуждающего флуоресценцию света 60 Вт/м² ФАР, что близко к значению ИРП – интенсивности радиации приспособления растений (таких значений ФАР, при которых кпд газообмена листьев по СО₂ максимален, поскольку при этом оптимально соотношение процессов фотосинтеза к дыханию листа [28, 29]). Полученные данные согласуются с ранее высказанным нами мнением, что в случае стрессовых ситуаций для оценки устойчивости ФСА листьев растений имеет смысл использовать не насыщающий фотосинтез свет порядка 100 Вт/м² и более (в некоторых работах с применением приборов для регистрации импульсно-модулированной ИФХ [1, 22]), а свет с интенсивностью, близкой к значению ИРП – интенсивности радиации приспособления растений [30].

Для изучения поведения флуоресцентных параметров в онтогенезе листьев пшеницы в дальнейшем использовали для регистрации кривых ИФХ интенсивность света 60 Вт/м² ФАР (табл. 2). Значения параметра $T_{0.5}$ по мере роста и развития листа пшеницы постепенно уменьшались до достижения листом примерно 80% от максимальной площади и возраста 5–6 сут от 29.2 до 23.4 с (табл. 2). При дальнейшем онтогенезе листа наблюдали увеличение значений $T_{0.5}$ до 35.1 с в 12-суточном листовом возрасте с дальнейшим уменьшением значений параметра до примерно исходного уровня молодого листа – 31.6 с (при 24 сут). При старении листа (26 сут) величина $T_{0.5}$ резко возрастала, достигая 43.5 с (на 37.6%; табл. 2 и 3). Минимальные значения $T_{0.5}$ наблюдали в 5–6-суточном возрасте листа и второй небольшой минимум – в 16 сут. Первый минимум по возрастному времени совпадал с максимумами величин для параметров R_{fd} , \bar{V}_{max} . При этом в возрасте листьев 5–6 сут средняя эффективность ФСА $\bar{\alpha}$ также имела высокие значения (60×10^{-2} , отн. ед.). Второй небольшой минимум $T_{0.5}$ совпадал с незначительными увеличениями значений R_{fd} , \bar{V}_{max} и в меньшей степени связан с небольшими колебаниями величин $\bar{\alpha}$ на протяжении онтогенеза листа, начиная с 8- и вплоть до 24-суточного возраста

Таблица 2. Изменения флуоресцентных интегральных показателей листьев верхнего (шестого) яруса растений пшеницы в их онтогенезе

Возраст листа, сут	Площадь листа, %	$T_{0.5}$, с	R_{fd} , отн. ед.	$\bar{\alpha} \times 10^{-2}$, отн. ед.	$\bar{V}_{max} \times 10^{-2}$, с ⁻¹
2	20	29.2 ± 1.6	2.5 ± 0.3	60 ± 3	2.0 ± 0.3
3	44	28.1 ± 1.7	3.0 ± 0.2	60 ± 5	2.5 ± 0.4
4	66	27.3 ± 1.1	4.6 ± 0.1	60 ± 10	3.5 ± 0.9
5	76	26.2 ± 1.2	4.9 ± 0.2		4.0 ± 0.5
6	84	25.3 ± 1.8	5.1 ± 0.3	60 ± 10	3.3 ± 0.9
7	90	23.4 ± 1.3	4.9 ± 0.4	48 ± 8	1.5 ± 0.7
8	96	31.2 ± 1.2	4.7 ± 0.2	46 ± 9	1.3 ± 0.6
10	99	34.2 ± 1.6	3.0 ± 0.2	45 ± 8	1.3 ± 0.5
12	100	35.1 ± 1.8	2.1 ± 0.5	43 ± 7	1.3 ± 0.3
14	100	30.3 ± 2.5	1.6 ± 0.5	44 ± 9	1.5 ± 0.5
16	100	27.3 ± 1.5	1.7 ± 0.2	45 ± 9	2.0 ± 0.9
20	100	30.4 ± 1.3	2.2 ± 0.1	46 ± 10	1.7 ± 0.7
24	100	31.6 ± 1.5	1.5 ± 0.1	43 ± 10	1.4 ± 1.0
26	100	43.5 ± 2.0	1.3 ± 0.2	33 ± 9	0.9 ± 0.5

Примечание. Использованы следующие параметры: время полуспада ($T_{0.5}$) интенсивности флуоресценции хлорофилла от максимума F_p к стационарному уровню F_s ; индекс жизнеспособности R_{fd} ; максимально возможная средняя скорость индукционного перехода \bar{V}_{max} ; средняя эффективность ФСА в индукционный период $\bar{\alpha}$. Приведены средние значения из 5–6 измерений ± доверительный интервал с уровнем достоверности 0.95.

Таблица 3. Оценка реакции флуоресцентных характеристик листьев пшеницы на старение на основании коэффициента вариации (к.в.), интегрального логарифмического показателя (I) и индекса (Δ) относительных изменений значений параметров при старении

Параметры	к.в., %	I , отн. ед.	Δ отн., %
$T_{0.5}$	9.7	0.27 ± 0.02	-37.6
R_{fd}	28.0	-0.58 ± 0.04	13.0
\bar{V}_{max}	19.0	-0.16 ± 0.07	36.0
$\bar{\alpha}$	3.5	-0.14 ± 0.04	23.0

Примечание. Использованы следующие параметры: время полуспада ($T_{0.5}$) интенсивности флуоресценции хлорофилла от максимума F_p к стационарному уровню F_s ; индекс жизнеспособности R_{fd} ; максимально возможная средняя скорость индукционного перехода \bar{V}_{max} ; средняя эффективность ФСА в индукционный период $\bar{\alpha}$. Приведены средние значения из 5–6 измерений ± доверительный интервал с уровнем достоверности 0.95.

(среднее значение 44.7, табл. 2). Таким образом, анализ экспериментальных данных показал, что изменения значений $T_{0.5}$ и параметров R_{fd} , \bar{V}_{max} происходили в противофазе, т.е. максимумы для $T_{0.5}$ соответствовали приблизительно минимумам для других рассматриваемых характеристик. А.Т. Мокроносов характеризует этапы онтогенеза листа зрелости и старения соотношением синтеза и деструкции активных клеточных структур [7, стр. 31]. При этом отмечается, что этап зрелости характеризуется равновесием этих процессов и проявляется, как правило, в перегибе возрастных кривых физиологических показателей и не имеет длительного стационарного состояния.

При дальнейшем старении и сравнении значений параметров 24- и 26-суточных листьев наблюдали в наибольшей степени изменения параметров $T_{0.5}$ (на 37.6%) и \bar{V}_{max} (на 36.0%), в меньшей степени $\bar{\alpha}$ (на 23.0%) и R_{fd} (на 13.0%) (табл. 3, значения Δ %).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали эксперименты, значения параметра ИФХ $T_{0.5}$ незначительно изменялись на протяжении онтогенеза листьев растений после окончания их роста (с 10-суточного возраста листа) и до момента старения (примерно 26-суточ-

ный возраст) по сравнению со значениями параметра R_{fd} (табл. 1). Коэффициент вариации значений $T_{0.5}$ в этот относительно стабильный период составил 9.7%, и для средней эффективности ФСА $\bar{\alpha}$ 3.5%. В то же время для параметра R_{fd} – 28.0%. Если сравнить параметры по реакции их на постепенное старение листа в онтогенезе, то из таблицы 2 видно, что значение интегрального логарифмического показателя $I(T_{0.5})$ по абсолютному значению почти в 2 раза меньше по сравнению с $I(R_{fd})$ (0.27 и –0.58, соответственно) для пшеницы при данных условиях онтогенеза. При сравнении результатов с данными по другим видам растений [13] можно отметить близость значений $I(T_{0.5})$ для редиса и огурца (0.22 и 0.25, соответственно). В то же время значения $I(R_{fd})$ для тех же видов растений составляли –0.25 и –0.44.

При одной и той же интенсивности возбуждающего флуоресценцию хлорофилла света для разновозрастных листьев редиса и пшеницы для значений параметра $T_{0.5}$ можно отметить общую закономерность, которая проявляется в колебаниях значений этого параметра в онтогенезе листа (табл. 1 и 2). Этот факт согласуется с данными, полученными для листьев пшеницы и других видов высших растений, и связан с переключениями метаболизма углерода в процессе роста и старения листа, а также с регуляцией метаболизма на уровне целого растения [7, 27]. В работе [24] было показано, что для параметра $T_{0.5}$ наименьшее влияние возраста листьев растений редиса имело место при интенсивности возбуждающего флуоресценцию света 60 Вт/м^2 ФАР, что близко к значению ИРП – интенсивности радиации приспособления растений (таких значений ФАР, при которых кпд газообмена листьев по CO_2 максимален, поскольку при этом оптимально соотношение процессов фотосинтеза к дыханию листа [29]). В работе [29, стр. 164] сделан вывод, что при определенном режиме ФАР, соответствующем ИРП, существует определенная сопряженность между фотосинтезом, дыханием и газообменом, т. е. фотосинтетическая деятельность в растительном покрове происходит в соответствии с принципом максимальной продуктивности. При этом подчеркивается важное значение фотосинтеза и дыхания не только для высокого урожая ценоза, но и для формирования устойчивости отдельных растений в фитоценозах. Для получения высокого урожая, по мнению Х.Г. Тооминга [29, стр. 81], оптимальным является условие, при котором листья в посеве работают не с максимальной, а с оптимальной интенсивностью фотосинтеза, соответствующей зоне ИПР и максимальному кпд фотосинтеза. Известно, что для многих растений, применяемых в сельском хозяйстве, значение ИРП находится в диапазоне $28\text{--}84 \text{ Вт/м}^2$ ФАР [30]. Другими причинами, служащими обоснованием для примене-

ния средних интенсивностей возбуждающих флуоресценцию хлорофилла на уровне листьев, являются следующие:

1) использование интенсивности возбуждающего флуоресценцию света в области $30\text{--}60 \text{ Вт/м}^2$ позволяет получать кривые ИФХ, которые дают наиболее полную количественную и качественную информацию о возрастном состоянии листьев растений [20, 30], т.к. хорошо проявляются дополнительные максимумы на кривых ИФХ [18, 21, 26, 31];

2) при данном диапазоне интенсивности не происходит фотоингибирования фотосинтетического аппарата листа [30];

3) фотоиндуцированный спад переменной флуоресценции при освещении светом умеренной интенсивности обусловлен в основном реокислением восстановленного первичного акцептора ФС2 за счет световой активации ферментов углеродного цикла фотосинтеза. Была показана тесная взаимосвязь фотоиндуцированной переменной флуоресценции (ИФХ) с содержанием АТФ в листьях проростков ячменя [31].

Считается, что флуоресценция хлорофилла может быть удобным инструментом для определения индукции стресса и оценки степени разрушений, а также степени регенерации ФСА растений при удалении стресс-фактора [1, 13]. В работе [14] был поставлен вопрос, возможна ли интегральная экспресс-оценка состояния ФСА по минимальному набору флуоресцентных параметров и какими свойствами эти параметры или характеристики должны обладать? По-видимому, предлагаемые параметры должны быть чувствительными к изменению активности ФСА при стрессовых воздействиях и восстановлению состояния ФСА после прекращения воздействия [33, 34]. Однако величина их не должна слишком меняться в онтогенезе листа, по крайней мере, после формирования листа и до начала его старения.

В монографии А.Т. Мокроносова [7, стр. 118] состояние зрелости листа характеризуется как наиболее сбалансированное по соотношению анаболических и катаболических процессов, а в период старения отмечается преобладание процессов деструкции. При этом максимум фотосинтетической активности листа, как правило, наступает раньше завершения роста листовой пластинки. В нашем исследовании максимальные величины для параметров R_{fd} , \bar{V}_{max} наблюдали при достижении листом пшеницы примерно 80% максимальной площади в возрасте 5–6 сут (табл. 2).

В процессе онтогенеза растений происходит комплекс структурно-функциональных изменений в его фотосинтетическом аппарате, в результате чего фотосинтетическая функция растений

непрерывно перестраивается и корректируется: меняется соотношение фотосистем, развитие ФС1 опережает развитие ФС2 [7, стр. 53]. Содержание хлорофилла также изменяется в онтогенезе листа: в начале несколько увеличивается, затем идет постепенное снижение содержания хлорофилла по мере роста и старения листа [7, 20]. В онтогенезе происходит изменение соотношения основного восстановительного и альтернативных путей фотосинтетического метаболизма [7, стр. 117; 28].

В работе Н.Г. Бухова [26] показано, что значение быстро релаксирующего компонента нефотохимического тушения q_N , идентифицированного как “высокоэнергетическое” или “дельта рН-зависимое” тушение, в старых листьях выше, чем в молодых. Это связано с тем, что пропускная способность углеродного метаболизма при старении листа ингибируется более сильно, чем активность электронного транспорта. В результате возможности диссипации протонного градиента при превращении АДФ в АТФ в старых листьях оказывается ниже, чем в молодых [26].

Считается, что “скорость разворачивания защитных механизмов при умеренных интенсивностях света имеет решающее значение для устойчивости фотосинтетического аппарата растения в первую очередь на начальном этапе адаптации к свету, происходящем преимущественно в течение первой минуты освещения” [3]. Прогноз устойчивости строится на предположении, что ФСА тех листьев, у которых имеется определенная исходная (до начала воздействия) недостаточность регуляторных систем, будет менее устойчивым к экстремальному воздействию. При этом у наиболее устойчивых образцов в отсутствие существенных нарушений регуляторных систем и их оптимальной функциональной активности значения логарифмического показателя $I = \lg(N_i/N_{i0})$ будут приближаться к нулю [23, стр. 391]. В статье [24] при использовании тестового воздействия – света разной интенсивности (диапазон 20–80 Вт/м² ФАР) при регистрации кривых ИФХ листьев редиса показано, что наименьшие значения логарифмического показателя для параметра $T_{0,5}$ наблюдали для зрелого 18-суточного листа ($I = -0.11$). Это может свидетельствовать о большей устойчивости его регуляторных систем к воздействию света высокой интенсивности по сравнению с устойчивостью молодого листа, для которого значение интегрального логарифмического показателя для параметра $I(T_{0,5})$ было равно -0.55 , что связано, вероятно, с меньшей устойчивостью регуляторных систем его ФСА к световому воздействию или менее развитыми защитными механизмами от фотоингибирования.

Сбалансированность ассимиляции CO_2 и флуоресценции хлорофилла наблюдается при благо-

приятных физиологических условиях, а соотношение между этими процессами нарушается при стрессах (в том числе и при старении). При этом данные указывают на относительно меньшую изменчивость при стрессе энергообмена по сравнению с газообменом [32].

Соотношение дыхания к grossфотосинтезу для разных видов растений, выращенных в благоприятных условиях, находится в узком диапазоне значений 0.4–0.6 [11]. При выращивании растений сахарной свеклы, подсолнечника и кукурузы в герметических вегетационных камерах в стационарных оптимальных условиях было показано, что в стационарную фазу роста соотношение дыхания к grossфотосинтезу составляло 0.38–0.40 [25]. Данные значения соответствуют минимальным дыхательным затратам и не могут быть снижены без нарушения нормального роста и развития растений [10, 11].

Показано, что при выращивании растений в оптимальных условиях внешней среды имеет место согласование дыхания и фотосинтеза, и количественное соотношение этих процессов у растений за сутки стремится к минимальным значениям (примерно 38–40%). Эти значения близки у разных видов растений [10]. В то же время, данное отношение вариабельно при стрессе и зависит от силы стрессового воздействия и устойчивости растений. Так, снижение ФАР в 2 раза при выращивании кукурузы вызывало уменьшение соотношения дыхания к фотосинтезу до 0.32–0.35 [11]. При измерении фотосинтеза и дыхания растений пшеницы в течение 24 ч при разных температурах (от 15 до 30°C) величина отношения суммарного дыхания к grossфотосинтезу изменялась в узком диапазоне 0.40–0.45 [11].

Интересно отметить близкие значения параметра $T_{0,5}$ для листьев различных растений в одной фазе развития листа. Так, в работе [13] в онтогенезе листьев пшеницы, огурца и редиса при достижении 90% площади листа значения параметра $T_{0,5}$ составляли близкие значения: 12.3; 14.4 и 14.4, соответственно.

В обзоре Н.Г. Булгакова [12, стр. 118] отмечается, что при выборе параметров для мониторинга состояния экосистем, необходимо четко разделять их на две неравнозначные группы – основные и коррелятивные. Основные – те, которые отвечают некоторым критериям, например, характеризуют устойчивость экосистемы в целом. К коррелятивным относятся опережающие индикаторы изменения основных. По-видимому, параметры $T_{0,5}$ и в меньшей степени \bar{V}_{max} могут рассматриваться как основные, а параметр R_{fd} – как коррелятивный. В этом смысле параметр R_{fd} может быть и более чувствительным к старению ли-

стве, но не дает адекватную оценку степени патофизиологических изменений.

При применении теории автоматического регулирования в исследованиях фотосинтеза выделяют три основных типа регулирования: стабилизирующее, программное и следящее [7, стр. 169]. Если перейти на язык теории автоматического регулирования, то основные параметры, по-видимому, в большей степени связаны со стабилизирующим типом регулирования, при котором наблюдается постоянство регулируемой величины. Такое регулирование связано с поддержанием гомеостаза системы и стабилизацией скорости процессов. Как отмечено в монографии А.Т. Мокроносова, при фотосинтезе наблюдается гомеостаз метаболизма углерода, который нарушается только при значительных экстремальных воздействиях [7, стр. 169]. Коррелятивные параметры более связаны с двумя другими типами регулирования: следящим и программным по классификации Мокроносова. Следящее регулирование характеризуется изменением регулируемой величины в соответствии с изменением внешней среды на уровне быстрых, кратковременных изменений длительностью секунды — десятки минут. Для программного регулирования характерно изменение регулируемой величины по заданной программе. Этот тип управления составляет основу развития фотосинтетического аппарата в онтогенезе. На ранних этапах онтогенеза листа преобладает механизм положительной обратной связи. На поздних этапах онтогенеза фотосинтетической системы доминируют механизмы обратной отрицательной связи, характерные для стареющих систем [7, стр. 170].

Если рассмотреть показатель относительных изменений величин параметров ИФХ (Δ отн., %), то в наименьшей степени в возрастном периоде с двух до 24 сут изменялись $\bar{\alpha}$ (на 28%) и $T_{0.5}$ (на 30%). Для параметров \bar{V}_{\max} и R_{fd} соответствующие значения составили 67 и 70% (табл. 2). Поскольку в стационарную фазу роста соотношение дыхания и гроссфотосинтеза было 0.38–0.40 [35], а диапазон изменения этого соотношения для разных видов растений, выращенных в благоприятных условиях, находится в узком диапазоне значений 0.4–0.6 [10, 11], что составляет 33–37%, можно сделать предположение о достаточной степени стабильности параметра $T_{0.5}$ в онтогенезе листа в благоприятных условиях роста.

Сравнение параметров флуоресценции хлорофилла двух сортов сахарной свеклы с разной устойчивостью их ФСА к засухе показало разную чувствительность параметров (F_0 , F_v/F_m , qP , qN) на данный стресс [33]. Наиболее чувствительным к водному стрессу среди параметров и характеристик ФСА оказался коэффициент нефотохимического тушения qN (изменения значений почти в 3 раза) [33].

В ранее проведенной нами работе было показано, что изменения этой характеристики (qN) в онтогенезе листьев растений пшеницы находятся в пределах 30% [17], что сопоставимо с изменениями значений параметра $T_{0.5}$ (табл. 3). Клеточная популяция в листе дифференцирована по темпам старения, и разные клетки в мезофилле сильно отличаются по продолжительности жизни. В процессе старения листа в нем увеличивается фонд отмирающих, и, возможно, лизирующих клеток. Асинхронно стареют и хлоропласты. По данным Ю.В. Гамалея [36], вариация продолжительности жизни хлоропластов достигает 30% от средней величины этого показателя для данной клетки.

По характеру изменений значений в онтогенезе и чувствительности к стрессовым воздействиям показатели ИФХ qN и $T_{0.5}$ сопоставимы, однако преимущество $T_{0.5}$ заключается в более простых условиях измерения по сравнению с qN [13, 14].

Согласно выводам, сделанным в работе [37], при оценке степени необратимости изменений активности ФСА в стрессовых условиях, следует отдать предпочтение изучению закономерностей патофизиологических изменений во временной организации систем регуляции растительных клеток. Если нарушения носят обратимый характер и обусловлены прежде всего действием климатических факторов или возрастными особенностями растений, то, несмотря на изменения в абсолютных величинах физиологических характеристик, постоянные времени в системах физиологической регуляции останутся неизменными. В случае необратимых изменений будет затронута эффективность процессов регуляции, что отразится в изменении величин временных характеристик систем регуляции [37]. По нашему мнению, в случае патофизиологических эффектов, вызванных как внешними стрессовыми условиями, так и вследствие эндогенных причин (процесса старения), изменения значений параметра $T_{0.5}$ будут существенно превышать такие изменения в онтогенезе листа в нормальных условиях, которые составляют примерно 30% [14].

Суммируя литературные и экспериментальные данные по изменению значений параметра $T_{0.5}$ в онтогенезе листьев растений и при слабых стрессовых воздействиях, можно сделать следующие выводы.

1. Изменения значений параметра $T_{0.5}$ в онтогенезе листьев растений по отношению к изменениям для других флуоресцентных параметров незначительны, так же как для \bar{V}_{\max} и $\bar{\alpha}$. Коэффициент вариации значений параметра $T_{0.5}$ в онтогенезе листа (табл. 3, к.в. %) не превышает коэффициента вариации продолжительности жизни хлоропластов, которая достигает 30% от средней величины этого показателя для отдельной клетки [36].

Хотя изменения величин $T_{0,5}$ и \bar{V}_{\max} практически одинаковы, определить последний параметр сложнее. Во-вторых, значения параметра $T_{0,5}$ наименее вариабельны в онтогенезе листа до заключительной стадии старения.

2. Поскольку $T_{0,5}$ представляет собой интегральную характеристику скорости активации ряда фотоассимиляционных и фотозащитных процессов в листе [2, 3], т.е., фотоиндуцированный спад переменной флуоресценции при освещении светом умеренной интенсивности обусловлен в основном световой активацией ферментов углеродного цикла фотосинтеза, а также имеется тесная взаимосвязь фотоиндуцированной переменной флуоресценции с содержанием АТФ в листьях [31], можно говорить о связи параметра $T_{0,5}$ с работой энерготрансформирующей подсистемы растительных клеток (хлоропластов и митохондрий).

3. В течение первой минуты освещения скорость развертывания защитных механизмов при умеренных интенсивностях света имеет решающее значение для устойчивости фотосинтетического аппарата растения на начальном этапе адаптации к свету [3]. Поэтому, регистрируя кривые ИФХ и определяя $T_{0,5}$, можно, по-видимому, тестировать регуляторные системы, связанные с защитными механизмами листа.

4. Анализ литературных данных по влиянию слабой засухи на растения показал высокую чувствительность параметра $T_{0,5}$, сопоставимую с поведением наиболее чувствительного к стрессам флуоресцентного параметра нефотохимического тушения флуоресценции qN [33].

5. Относительная устойчивость значений параметра $T_{0,5}$, а также флуоресцентных параметров \bar{V}_{\max} и R_{fd} для зрелых листьев растений по сравнению с молодыми и стареющими листьями при вариации интенсивности возбуждающего флуоресценцию хлорофилла света в интервале 40–80 Вт/м² (табл. 1) может служить критерием зрелости листа и устойчивости регуляторных систем.

Таким образом, наблюдаемые нами в данной работе особенности в поведении параметра $T_{0,5}$ в онтогенезе листьев пшеницы и сравнение изменений значений других флуоресцентных параметров медленной стадии ИФХ (R_{fd} , \bar{V}_{\max} и $\bar{\alpha}$) подтверждают обоснованность выбора параметра $T_{0,5}$ для оценки не только реактивности регуляторных систем ФСА, но и перспективность его использования как одного из наиболее простых интегральных показателей физиологического состояния листьев высших растений в широком возрастном диапазоне и индикатора на патофизиологические изменения при старении. Для однозначной интерпретации данных при использо-

вании параметра $T_{0,5}$ и других флуоресцентных параметров с целью оценки наблюдаемых патофизиологических изменений в стрессовых для растений условиях необходимы дальнейшие исследования.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goltsev V.N., Kalaji H.M., Paunov M., Bqba W., Horaczek T., Mojski J., Kociel H., Allakhverdiev S.I. Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 869. <https://doi.org/10.1134/S1021443716050058>
2. Roháček K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships // Photosynthetica. 2002. V. 40. P. 13. <https://doi.org/10.1023/A:1020125719386>
3. Птушенко В.В., Солнцев В.А., Тихонов А.Н. Биофизические методы экологического мониторинга, фотосинтетические показатели листьев древесных растений в условиях города Москвы // Биофизика. 2013. Т. 58. С. 313.
4. Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А., Шихов В.Н. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям // Журн. общ. биол. 2007. Т. 68. С. 455.
5. Сааков В.С. Концепция энергетических основ устойчивости зеленой клетки к действию экстремальных факторов внешней среды // ДАН. 2000. Т. 375. С. 278.
6. Семихатова О.А. Энергетические аспекты интеграции физиологических процессов в растении // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 1105.
7. Мокроносов А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. Москва: Наука, 1981. 196 с.
8. Wu A., Hammer G.L., Doherty A., von Cammerer S., Farquhar G.D. Quantifying impacts of enhancing photosynthesis on crop yield // Nature Plants. 2019. V. 5. P. 380. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0398-8>
9. Иванченко В.М., Маршак М.И., Урбанович Т.А., Микельская С.А., Обуховская Л.В. Влияние хлоропластов и митохондрий на энерготрансформирующие функции друг друга // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. С. 505.
10. Рахманкулова З.Ф. Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания целого растения в норме и при неблагоприятных внешних условиях // Журн. общ. биол. 2002. Т. 63. С. 44.
11. Rakhmankulova Z.F. Physiological Aspects of Photosynthesis–Respiration Interrelations // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 365. <https://doi.org/10.1134/S1021443719030117>
12. Булгаков Н.Г. Индикация состояния природных экосистем и нормирование факторов окружающей

- среды: обзор существующих подходов // Успехи соврем. биол. 2002. Т. 122. С. 115.
13. *Nesterenko T.V., Shikhov V.N., Tikhomirov A.A.* Estimation of changes in the activity of photosynthetic apparatus of plant leaves based on half-time of fluorescence intensity decrease // *Photosynthetica*. 2019. V. 57. P. 132.
<https://doi.org/10.32615/ps.2019.005>
 14. *Нестеренко Т.В., Шихов В.Н., Тихомиров А.А.* Флуоресцентный метод определения реактивности фотосинтетического аппарата растений // *Журн. общ. биол.* 2019. Т. 80. С. 187.
<https://doi.org/10.1134/S0044459619030060>
 15. *Thomas H., Stoddart J.L.* Leaf senescence // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1980. V. 31. P. 83.
 16. *Romanova A.K., Semenova G.A., Novichkova N.S., Ignat'ev A.R., Mudrik V.A., Ivanov B.N.* Physiological, biochemical, and fluorescence parameters of senescing sugar beet leaves in the vegetative phase of growth // *Russ. J. Plant Physiol.* 2011. V 58. С. 271.
<https://doi.org/10.1134/S1021443711020178>
 17. *Nesterenko T.V., Shikhov V.N., Tikhomirov A.A.* Chlorophyll fluorescence as an indicator of age-dependent changes in photosynthetic apparatus of wheat leaves // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. С. 307.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715020144>
 18. *Нестеренко Т.В., Сидько Ф.Я.* О количественном описании медленной индукции флуоресценции хлорофилла в онтогенезе листьев высших растений // *Физиология растений*. 1993. Т. 40. С. 10.
 19. *Tikhomirov A.A., Sid'ko F.Ya.* Photosynthesis and structure of radish and wheat canopies as affected by radiation of different energy and spectral composition // *Photosynthetica*. 1982. V. 16. P. 191.
 20. *Тихомиров А.А.* Внутренний радиационный режим в фитоценозах и фотобиологическая эффективность излучения в условиях светокультуры // *Светотехника*. 2021. №1. С. 13.
 21. *Полякова И.Б., Караваев В.А., Солнцев М.К., Чечулина А.А.* Люминесцентные показатели в разных участках листа пшеницы в онтогенезе // *Биофизика*. 2003. Т. 48. С. 1108.
 22. *Lichtenthaler H., Buschmann C., Knapp M.* Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (Kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (R_{Fd} -values) with the PAM-fluorometer // *Analytical methods in plant stress biology* / Eds. Filek M., Biesaga-Kocielniak J., Marciska I. Krakow, Poland: The Franciszek Gorski Inst. Plant Physiol., Polish Academy of Sciences, 2004. P. 93.
 23. *Ушаков И.Б., Штемберг А.С., Шафуркин А.В.* Реактивность и резистентность организма млекопитающих. Москва: Наука, 2007. 493 с.
 24. *Nesterenko T.V., Tikhomirov A.A., Shikhov V.N.* Influence of excitation light intensity and leaf age on the slow chlorophyll fluorescence transient in radish // *Biophysics*. 2012. V. 57. P. 464.
<https://doi.org/10.1134/S0006350912040136>
 25. *Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А., Шихов В.Н.* Световая зависимость медленной индукции флуоресценции хлорофилла в онтогенезе листьев растений пшеницы // *ДАН*. 2014. Т. 454. С. 729.
<https://doi.org/10.7868/S0869565214060267>
 26. *Бухов Н.Г.* Старение листа. Выявление участков, лимитирующих фотосинтез, с помощью коэффициентов тушения флуоресценции хлорофилла и редокс-измерений P700 в листьях // *Физиология растений*. 1997. Т. 44. С. 352.
 27. *Нестеренко Т.В., Сидько Ф.Я.* Индукция флуоресценции хлорофилла А в онтогенезе флаг листа пшеницы // *Биофизические методы исследования экосистем* / Под ред. И.А. Терсков, Новосибирск: Наука. СО АН СССР. 1984. С. 83.
 28. *Tooming H.* Mathematical model of plant photosynthesis considering adaptation // *Photosynthetica*. 1967. V. 1. P. 233.
 29. *Тооминг Х.Г.* Экологические принципы максимальной продуктивности посевов. Ленинград: Гидрометеоиздат. 1984. 264 с.
 30. *Nesterenko T.V., Tikhomirov A.A., Shikhov V.N.* Ontogenetic approach to the assessment of plant resistance to prolonged stress using chlorophyll fluorescence induction method // *Photosynthetica*. 2006. V. 44 P. 321.
<https://doi.org/10.1007/s11099-006-0031-8>
 31. *Дроздова И.С., Бондар В.В., Бухов Н.Г.* Влияние старения листьев на индукционные переходы переменной флуоресценции хлорофилла. Содержание АТФ и метаболитов цикла Кальвина // *Физиология растений*. 1992. Т. 39. С.635.
 32. *Климов С.В.* Корреляция между ассимиляцией CO₂ и замедленной флуоресценцией при их одновременной регистрации с поверхности листа // *Физиология растений*. 1988. Т. 35. С. 31.
 33. *Li G.L., Wu H.X., Sun Y.Q., Zhang S.Y.* Response of chlorophyll fluorescence parameters to drought stress in sugar beet seedlings // *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. V. 60. P. 337.
<https://doi.org/10.1134/S1021443713020155>
 34. *Shikhov V.N., Nesterenko T.V., Tikhomirov A.A.* Effect of light intensity on chlorophyll fluorescence in wheat leaves: application of PAM-fluorometry // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. С. 417.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716030134>
 35. *Мурей И.А., Рахманкулова З.Ф.* Соотношение фотосинтеза и составляющих дыхания у сахарной свеклы в вегетационную фазу роста // *Физиология растений*. 1990. Т. 37. С. 462.
 36. *Гамалей Ю.В.* Продолжительность жизни хлоропластов в клетках мезофилла // *Цитология*. 1975. Т. 17. С. 1243.
 37. *Шабала С.Н., Войнов О.А.* Динамика физиологических характеристик растений как элемент системы экологического мониторинга // *Успехи совр. биол.* 1994. Т. 114. С. 144.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУРОСТАНОЛОВЫХ
ГЛИКОЗИДОВ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ЛЮЦЕРНЫ
В УСЛОВИЯХ ГИПОТЕРМИИ И ГИПЕРОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

© 2022 г. Л. А. Волкова^а, В. В. Урманцева^а, А. Б. Бургутин^а, А. М. Носов^{а, б,*}

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

^бФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

*e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2021 г.

После доработки 23.11.2021 г.

Принята к публикации 24.11.2021 г.

Проведено изучение механизмов адаптогенного действия фурустаноловых гликозидов (ФГ) на клетки растений *in vitro* и осуществлено сопоставление воздействия гипотермии и гиперосмотического стресса на суспензионную культуру клеток люцерны (*Medicago sativa* L.). Показано, что популяция клеток люцерны *in vitro* обладает функциональными особенностями, определяющими разную чувствительность к действию указанных абиотических стрессоров, что выражалось в разном уровне жизнеспособности клеток: высокой (85%) в условиях гипотермии и низкой (25%) при гиперосмотическом воздействии. Гипотермия стимулировала скорость генерации супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$), ей сопутствовала высокая конститутивная активность антиоксидантных ферментов (гваякол-зависимой пероксидазы, аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы), уровень которых отражает компенсаторный потенциал клеток. Сохранение высокого уровня жизнеспособности клеток при действии гипотермии, несмотря на 40% повышение скорости генерации $O_2^{\cdot-}$, свидетельствует о том, что образовавшиеся активные формы кислорода не вызывали повреждения липидных структур и макромолекул в клетках. Экзогенная обработка ФГ при этом виде стрессового воздействия способствовала повышению активности антиоксидантных ферментов, однако не оказывала заметного влияния на изначально высокий уровень жизнеспособности клеток. В условиях гиперосмотического стресса предварительное воздействие ФГ приводило к 3-кратному увеличению выживаемости клеток (с 25 до 73%) и повышению на 30% активности растворимой пероксидазы по сравнению с ее уровнем при влиянии только стрессора. Воздействие ФГ также вызывало повышение активности антиоксидантных ферментов, снижение уровня перекисного окисления липидов и повышение активности ферментов малатдегидрогеназного (МДГ) комплекса. Однако, в отличие от гипотермии, наблюдаемые изменения вызывали существенное повышение жизнеспособности клеток люцерны *in vitro*. На увеличение образования осмолитов в реакциях НАД/НАД⁺-МДГ указывала повышенная в сравнении с контролем концентрация осмотика (маннита), вызывающего начальную степень плазмолиза клеток. Обсуждаются особенности культуры клеток люцерны, влияющие на специфику ее стресс-устойчивости, возможные механизмы защиты клеток *in vitro* при гипотермии и гиперосмотическом стрессе и роль ФГ в этих процессах.

Ключевые слова: *Medicago sativa*, суспензионная культура клеток, фурустаноловые гликозиды, гипотермия, гиперосмотический стресс, антиоксидантные ферменты

DOI: 10.31857/S0015330322030174

ВВЕДЕНИЕ

Фурустаноловые гликозиды (ФГ) являются высокоактивными соединениями, способными усиливать адаптивные реакции растительных кле-

ток при воздействии абиотических стрессовых факторов. В предыдущих работах нами было показано, что предварительная обработка клеток *in vitro* ФГ, выделенными из культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall., приводила к изменению ряда их физиолого-биохимических характеристик, имеющих адаптогенную направленность в условиях абиотического стресса [1–5]. В частности, экзогенное действие ФГ способствовало образованию

Сокращения: АПО – аскорбатпероксидаза, ГПО – глутатионпероксидаза, ПО – пероксидаза, СОД – супероксиддисмутаза, ТБК-АП – активные продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, ФГ – фурустаноловые гликозиды.

АФК, генератором которых являлась НАДФ·Н-оксидаза плазмалеммы, и индукции ферментов антиоксидантной защиты. Активация НАДФ·Н-оксидазы приводила к изменению соотношения НАДФ⁺/НАДФ·Н, что может выполнять роль редокс-сигнала, который регулирует активность ключевых ферментов пентозофосфатного пути и ферментов метаболизма глутатиона.

Механизмы, лежащие в основе защиты клеток при действии разных видов стрессоров, могут иметь специфичные особенности. Известно, что при действии гипотермии основными негативными последствиями являются снижение текучести мембран и окислительный стресс, связанный в первую очередь с нарушением транспорта электронов в электрон-транспортных цепях. Воздействии низкой температуры может приводить к быстрому повышению содержания Са²⁺ в цитозоле, связанном с активацией НАДФ·Н-оксидазы [6]. В результате происходит формирование внутриклеточных АФК, при этом их продукция и активация антиоксидантных ферментов является результатом быстрых сигнальных реакций [7]. Активация антиоксидантной системы, наряду с повышением ненасыщенности ЖК в составе липидов мембран играет ключевую роль в формировании устойчивости к гипотермии [8]. В защиту от токсичного действия АФК вовлечены такие ключевые ферменты, как аскорбатпероксидазы (АПО) и супероксиддисмутазы (СОД), а также глутатионпероксидазы (ГПО) и фенол-зависимые пероксидазы. Поскольку пероксидаза (ПО) имеет различные функции (оксидазную и пероксидазную), она может выступать как фактор, участвующий в элиминировании Н₂О₂, а в других ситуациях – как источник кислородных радикалов. Учитывая такую двойственность, пероксидазная ферментная система представляется одним из наиболее вероятных участников клеточного сигналинга. Уровень активности фенол-зависимой ПО в клетках растений часто используют для характеристики их функционального состояния в ответ на действие экстремальных факторов среды [9]. Эффективность антиоксидантных ферментов, которые защищают разные компартменты клетки в условиях абиотического стресса, может зависеть не только от их индуцированной, но и конститутивной активности.

При другом виде стресса – гиперосмотическом, при котором существенную роль играют механические свойства мембран [10], компенсаторные изменения, противостоящие повреждающим эффектам, включают в себя осмопротекторные механизмы, связанные с повышением уровня осмолитов, предупреждающих пороговое обезвоживание. Кроме того, регуляция активности антиоксидантных ферментов, замедляющих интенсивность липопероксидации, а также активация альдегидути-

лизирующих ферментов, защитное действие которых проявляется как за счет метаболизма токсичных альдегидов, так и в результате образования осмолитов [5], способствуют сопротивлению клеток гиперосмотическому стрессу.

Для выяснения механизмов адаптогенного действия ФГ на растительные клетки *in vitro* эффективным подходом является использование объектов со специфичными свойствами. Суспензионная культура клеток люцерны (*Medicago sativa* L.), восстановленная после 27 лет криогенного хранения в жидком азоте, обладает рядом функциональных особенностей – в частности, активность гваякол-ПО в ней на несколько порядков выше, чем в других исследуемых растительных объектах *in vitro* [4]. После длительного криогенного хранения популяция клеток люцерны возобновила рост, несмотря на низкий уровень выживаемости, что свидетельствует о высоком адаптивном потенциале клеток возобновленной культуры. Основным повреждающим фактором в результате процедуры замораживания-оттаивания является гиперосмотический стресс, к которому клетки люцерны были довольно чувствительны (погибало около 80% преимущественно полиплоидных клеток) [11]. Наряду с действием гиперосмотического стресса в процессе замораживания-оттаивания клетки подвергались также действию низкой положительной температуры.

В связи с этим целью настоящей работы заключалась в изучении механизмов, лежащих в основе защитного действия ФГ на клетки возобновленной после криогенного хранения суспензионной культуры *Medicago sativa*, при действии гипотермии и гиперосмотического стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на восстановленной после 27 лет хранения в жидком азоте суспензионной культуре клеток люцерны (*Medicago sativa* L.) в условиях выращивания, описанных в работе Волковой с соавт. [11]. Для определения оптимальной интенсивности стрессовых факторов была также использована хорошо охарактеризованная нами ранее суспензионная культура клеток *Dioscorea deltoidea* Wall, штамм ИФР ДМ-0.5 [3].

Для изучения влияния ФГ на клетки люцерны использовали препарат фураностаноловых гликозидов, выделенный из водного экстракта лиофильно высушенной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall, штамм ИФР ДМ-0.5 [3]. Препарат представляет собой смесь двух гликозидов – дельтозида и протодиосцина, в соотношении 2 : 3 с чистотой 85%. Для изучения действия ФГ клетки отбирали в течение цикла роста в определенные сутки культивирования (на 2, 7, 14 сут; либо на 7 и 14 сут), которые соответствовали разным

фазам ростового цикла (2 сут – лаг фаза, 7 сут – фаза экспоненциального роста, 14 сут – фаза замедления роста) и проводили 60-минутную экспозицию с ФГ в концентрации 10^{-5} М. Контролем служили клетки без воздействия. Подробная методика изложена ранее [5].

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

Условия гиперосмотического стресса создавали, воздействуя на клетки через каждые 5 мин раствором маннита с постепенно повышающейся концентрацией (0.3; 0.6; 0.8 и 1.1 М). При концентрации 1.1 М клетки выдерживали в течение 1 ч. Затем клетки в течение 20 мин ступенчато деплазмоллизировали, после чего определяли их жизнеспособность (выживаемость).

Гипотермическое воздействие состояло в том, что колбы с культурами клеток люцерны и диоскореи помещали в холодильную камеру на 60 мин при периодическом помешивании. При этом экспозицию клеток люцерны осуществляли при 4°C, а диоскореи – при 7°C.

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

Активность гваякол-зависимой формы пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по изменению оптической плотности реакционной смеси в 0.1 М калий-фосфатном буфере (рН 5.5) при 470 нм [12]. Снижение активности гваякол-зависимой ПО, вызванное присутствием в реакционной среде второго субстрата – НАД·Н, определяли по методу, описанному в работе [4]. Определение пероксидазной активности производили, как описано выше [12]. Для сравнения разных вариантов величину снижения активности гваякол-зависимой ПО (А, %) вычисляли по формуле: $A (\%) = 100 \times (1 - A1/A2)$, где А1 – активность фермента (ммоль/(мг белка мин)) после внесения НАД·Н, А2 – исходная активность фермента, без НАД·Н.

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.11) определяли с использованием нитросинего тетразолия, конкурирующего с СОД за супероксид-анионы, образующиеся в результате взаимодействия метионина и рибофлавина при освещении в течение 30 мин, по методу Beauchamp и Fridovich [13]. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли при 560 нм. Полученные данные по активности фермента выражали в

относительных единицах на мг белка. За единицу активности СОД принимали 50% ингибирование образования формазана, образуемого при восстановлении нитросинего тетразолия.

Активность глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) определяли по скорости уменьшения оптической плотности реакционной смеси при 340 нм в результате окисления НАДФ·Н с помощью двух сопряженных ферментативных реакций: генерации окисленного глутатиона (GSSG) под действием глутатионредуктазы и его последующего восстановления ГПО с использованием НАДФ·Н в качестве кофермента [14]. Снятие показаний осуществляли ежеминутно в течение 5 мин. Реакционная среда имела следующий состав: 50 мМ Трис-НСI буфер (рН 7.4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0.12 мМ НАДФ·Н, 0.85 мМ восстановленного глутатиона (GSH), 0.37 мМ H_2O_2 , 1 ед/мл глутатионредуктазы. В контрольной пробе отсутствовал GSH. Активность ГПО рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции ($\epsilon = 6.22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и выражали в мкмоль/(мг белка мин).

Активность аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) определяли по уменьшению оптической плотности при 298 нм в результате окисления аскорбиновой кислоты перекисью водорода ($\epsilon = 0.80 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [15]. Для каждого определения проводили также контрольное измерение неспецифического окисления аскорбата. Активность АПО выражали в ммоль окисленного аскорбата/(мг белка мин).

Активность НАД-малатдегидрогеназы (НАД-МДГ, КФ 1.1.1.37) определяли по скорости восстановления НАД в среде следующего состава: 80 мМ Трис-НСI буфер (рН 8.0), 2 мМ малат, 5 мМ $MgSO_4$, 0.2 мМ НАД. Активность НАД-МДГ рассчитывали, используя среднюю скорость светопоглощения при 340 нм за первые 3 мин после начала реакции.

Активность НАД·Н-малатдегидрогеназы (НАД·Н-МДГ, КФ 1.1.1.37) определяли по скорости расходования НАД·Н в среде следующего состава: 80 мМ Трис-НСI буфер (рН 8.0), 2 мМ оксалоацетат, 5 мМ $MgSO_4$, 0.2 мМ НАД·Н. Активность НАД·Н-МДГ рассчитывали, используя среднюю скорость светопоглощения при 340 нм за первые 3 мин после начала реакции.

Скорость генерации супероксид-аниона ($O_2^{\cdot -}$) регистрировали по методу, основанному на способности $O_2^{\cdot -}$ восстанавливать нитросиний тетразолий до нерастворимого формазана [16]. Качественное определение формазана проводили по методу, описанному нами ранее [3]. Контрольные и обработанные ФГ клетки инкубировали 60 мин в 0.3% растворе нитросинего тетразолия в фосфатном буфере (рН 7.0), при этом восстанов-

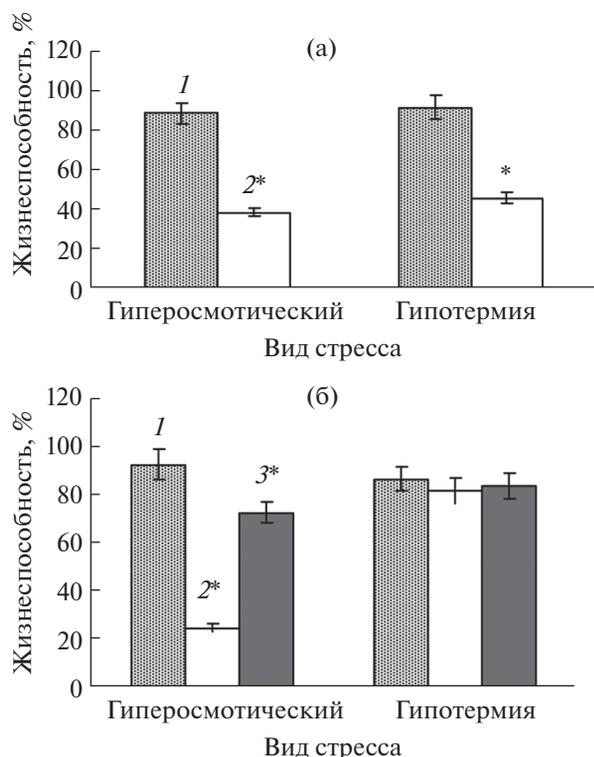


Рис. 1. Жизнеспособность клеток диоскореи (а) и люцерны (б) в условиях гипотермии и гиперосмотического стресса: 1 – контроль; 2 – стресс; 3 – ФГ. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

ление нитросинего тетразолия в клетках было спонтанным, без использования источника O_2^- . После центрифугирования при 10000 g в течение 10 мин клетки дважды экстрагировали 96% этанолом для извлечения формазана. В объединенном экстракте определяли количество формазана при длине волны 510 нм ($\epsilon = 3.0\text{ мМ}^{-1}\text{ см}^{-1}$) и выражали в мкмоль/мг белка.

Содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по ТБК-тесту [17], основанному на взаимодействии этих продуктов (преимущественно МДА) с тиобарбитуровой кислотой и образовании окрашенных комплексов, при наличии высокой температуры и кислой среды. Содержание ТБК-АП рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции МДА, равного $155\text{ мМ}^{-1}\text{ см}^{-1}$ и выражали в нмоль/мг белка.

Определение общего количества белка проводили по методу Lowry с соавт. [18].

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам с использованием программы Microsoft Excel 2007. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Бары на диаграммах означают стандартную ошибку. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Жизнеспособность клеток люцерны при действии ФГ в условиях гипотермии и гиперосмотического стресса

Для определения оптимальной интенсивности стрессовых факторов была использована хорошо охарактеризованная суспензионная культура клеток *D. deltoidea* Wall. Гиперосмотический стресс (выдерживание клеток в 1.1 М растворе маннита в течение 1 ч, см. Материалы и методы) и гипотермический стресс (1 ч при 4°C) вызывали практически одинаковое снижение жизнеспособности клеток – с 90% в контроле до 41% при гиперосмотическом стрессе и до 46% при гипотермии (рис. 1а), что может свидетельствовать об оптимальном уровне выбранных режимов воздействий и их “эквивалентности” для клеток диоскореи *in vitro*.

В отличие от клеток диоскореи, воздействие на суспензионные культуры клеток люцерны абиотических стрессоров разной природы привело к различному эффекту (рис. 1б). Гипотермия практически не оказала влияние на жизнеспособность клеток люцерны *in vitro*, тогда как гиперосмотический стресс вызвал более существенное по сравнению с клетками диоскореи (почти 4-кратное) снижение жизнеспособности – с 93% (контроль) до 25%.

В условиях гиперосмотического стресса предобработка клеток люцерны ФГ повышала выживаемость с 25% (в варианте без ФГ) до 73%. В условиях действия низкой температуры жизнеспособность клеток люцерны *in vitro* во всех вариантах (контроль, гипотермия, гипотермия + ФГ) практически не изменялась и находилась на уровне $85 \pm 3\%$.

Скорость генерации супероксид-аниона при действии ФГ в условиях гипотермии

Гипотермия и обработка клеток люцерны ФГ на 7 или 14 сут культивирования стимулировали образование O_2^- (рис. 2). Превышение контроля при действии только гипотермии составило 39% на 7 сут выращивания и 36% – на 14 сут, а воздействие ФГ в контрольных условиях (при нормальной температуре) – 20 и 24%, соответственно. Воздействие на клетки ФГ в условиях холодного стресса также приводило к повышению уровня образования в них O_2^- , но в меньшей степени, чем воздействие только стрессового фактора. По сравнению с контролем степень превышения скорости образования O_2^- при воздействии ФГ на 7 сут составляла 17%, на 14 сут – 19%, что в среднем на 20% ниже уровня его генерации при действии только гипотермии.

Пероксидазно-оксидазная активность пероксидазы (ПО) при действии ФГ в условиях гипотермии

Активность ПО в клетках люцерны измеряли как в окислительном цикле (с использованием НАД·Н в качестве субстрата), так и пероксидазном (с использованием фенолов в качестве субстрата). Присутствие в реакционной среде наряду с гваяколом сильного восстановителя НАДФ·Н приводило к снижению пероксидазной активности в контрольном варианте (в результате переключения на оксидазную активность) на 7 сут цикла выращивания на 37%, а на 14 сут – на 29% (рис. 3). При действии гипотермии пероксидазная активность увеличивалась на 24 и 29% (на 7 и 14 сут, соответственно), а оксидазная активность ПО либо не изменялась (7 сут), либо незначительно (недостаточно) снижалась (14 сут). Предкультивирование клеток люцерны с ФГ способствовало увеличению пероксидазной активности (на 7 сут на 17%, на 14 сут – на 19%), однако в условиях гипотермии эффект ФГ не наблюдался.

Активность антиоксидантных ферментов при действии ФГ

Исследование функционирования антиоксидантных ферментов в клетках люцерны показало высокий уровень их конститутивной активности, имеющий циклический характер. При этом в начале цикла выращивания (2 сут) их активность была максимальной, в период интенсивного роста клеток (7 сут) она снижалась, но к завершению цикла (14 сут) опять возрастала. Активность СОД на 2 сут культивирования составляла 7.0, на 7 сут – 0.9 и на 14 сут – 2.9 отн. ед./мг белка. Активность аскорбат ПО – соответственно 2.0, 0.65 и 1.9 ммоль окисленного аскорбата/мг белка в мин; активность глутатион ПО – 800, 280 и 470 мкмоль GSSG/мг белка в мин. Зафиксированное повышение активности антиоксидантных ферментов в лаг-фазе цикла (2 сут) выращивания культур клеток фиксируется достаточно часто и может быть обусловлено активацией митохондриального дыхания после пересадки клеток на свежую питательную среду.

Изучение динамики активности антиоксидантных ферментов при воздействии ФГ показало (рис. 4), что предварительная инкубация клеток люцерны с ФГ приводила к повышению активности СОД на 21–36% по сравнению с контролем в зависимости от фазы ростового цикла культуры, что свидетельствует об увеличении образования O_2^- . Аналогичное повышение активности было зафиксировано и для АПО: на 21–43% от уровня активности в контроле, тогда как изменений активности ГПО при действии ФГ в цикле выращивания клеток обнаружено не было –

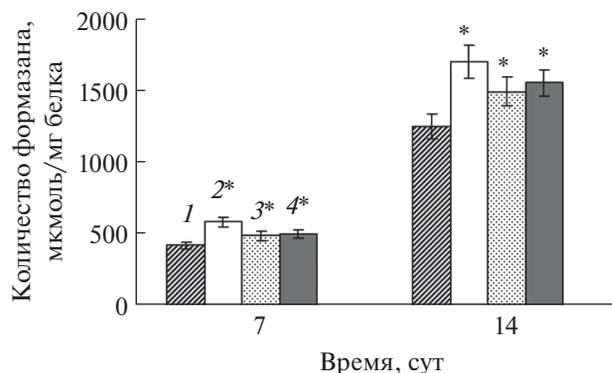


Рис. 2. Скорость генерации супероксид-аниона при экспозиции фураностаноловых гликозидов (ФГ) с клетками люцерны в условиях гипотермии: 1 – контроль; 2 – гипотермия; 3 – ФГ + гипотермия; 4 – ФГ. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

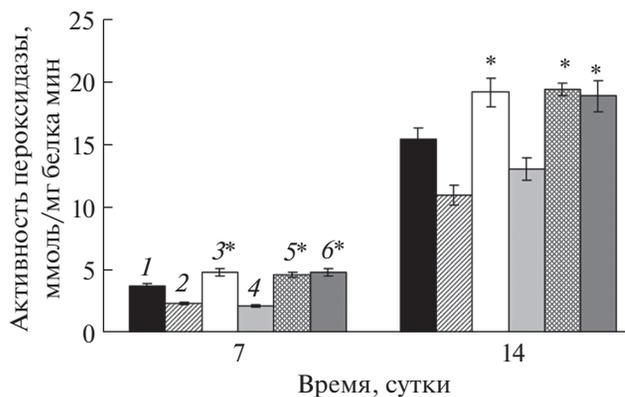


Рис. 3. Peroксидазно-оксидазная активность пероксидазы в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) в условиях гипотермии: 1 – контроль; 2 – НАД·Н; 3 – гипотермия; 4 – НАД·Н + гипотермия; 5 – ФГ; 6 – ФГ + гипотермия. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

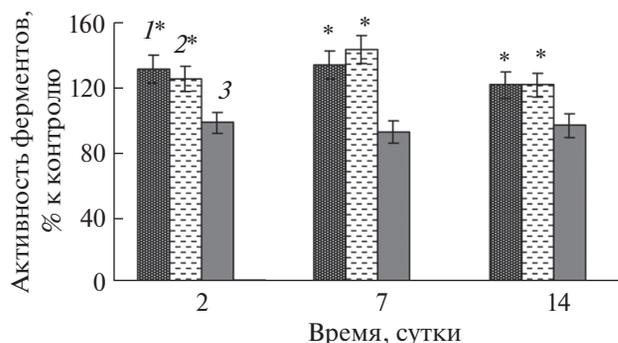


Рис. 4. Активность антиоксидантных ферментов в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов: 1 – СОД; 2 – АПО; 3 – ГПО. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

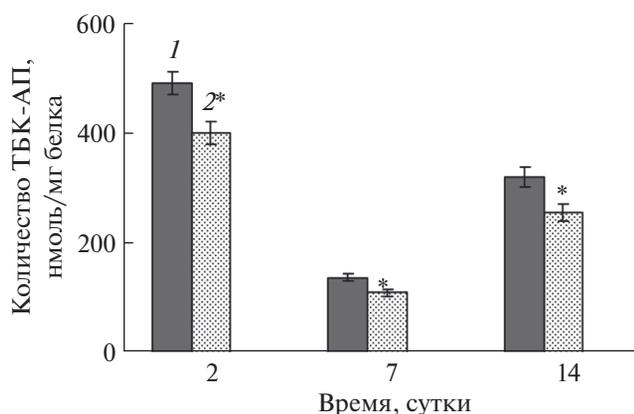


Рис. 5. Количество ТБК-АП в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ): 1 – контроль; 2 – ФГ. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

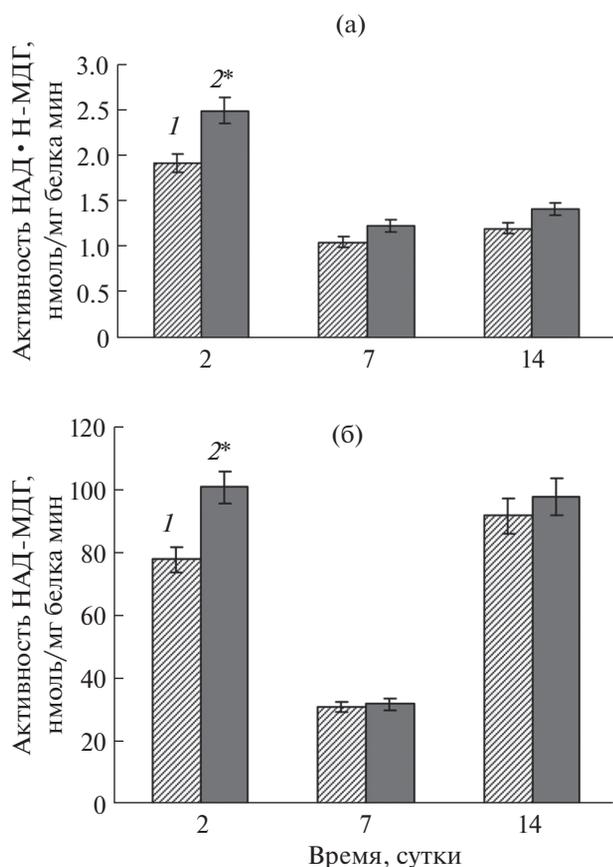


Рис. 6. Активность ферментов маламдегидрогеназного (МДГ) комплекса (а – НАД·Н-МДГ, б – НАД-МДГ) в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ): 1 – контроль; 2 – ФГ. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

ее активность оставалась на уровне конститутивных значений контрольного варианта.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) при действии ФГ

Динамика интенсивности ПОЛ в цикле выращивания клеток люцерны оказалась схожей с динамикой активности антиоксидантных ферментов – более высокие значения были отмечены в начале и конце цикла культивирования (рис. 5). Воздействие ФГ на клетки приводило к уменьшению количества в них ТБК-АП на 19–22% по сравнению с контрольным вариантом независимо от фазы ростового цикла, в котором происходила обработка ФГ.

Активность ферментов маламдегидрогеназного комплекса

Анализ динамики активности НАД·Н-МДГ (рис. 6а), катализирующей восстановление оксалоацетата в малат, показал, что действие ФГ способствовало увеличению ее активности по сравнению с контролем на 18–30% в зависимости от фазы ростового цикла. В отличие от НАД·Н-МДГ, обработка клеток люцерны ФГ приводила к существенному (на 23%) повышению активности НАД-МДГ, катализирующей окисление малата в оксалоацетат лишь в начале выращивания (на 2 сут) (рис. 6б). Влияние ФГ на активность этого фермента в остальные фазы ростового цикла либо отсутствовало (обработка на 7 сут), либо было незначительным (обработка на 14 сут).

Уровень пероксидазной активности при действии ФГ в условиях гиперосмотического стресса

Обработка ФГ клеток люцерны в нормальных условиях культивирования приводила к достоверному (на 20–25%) повышению уровня пероксидазной активности по сравнению с контролем (рис. 7). Условия гиперосмотического стресса вызвали существенное (в зависимости от фазы ростового цикла – в 3–4 раза по сравнению с контролем) снижение уровня этой активности. Воздействие ФГ в условиях гиперосмотического стресса приводило к “нормализации” пероксидазной активности в клетках: она оказывалась в 1.7–1.8 раза ниже по сравнению с контрольным уровнем, но в 1.8–2.4 раза выше, чем в стрессовых условиях без воздействия ФГ.

Образование начального плазмолиза при действии ФГ в условиях гиперосмотического стресса

При использовании маннита в концентрации 0.3 М начальный плазмолиз в контрольном варианте наблюдался во всех клетках люцерны. При

воздействии ФГ начальный плазмолиз в паренхимоподобных клетках с крупной вакуолью был зафиксирован при концентрации 0.4 М осмотика, а в более мелких изодиаметрических меристемоподобных клетках (их доля в популяции клеток составляла около 30%) – при 0.6 М маннита. При концентрации маннита 1.1 М сильный плазмолиз клеток (уменьшение объема цитоплазмы на 50% и более) был зафиксирован для всех клеток во всех вариантах эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы противостоять гипотермии и гиперосмотическому воздействию в растительных клетках имеются механизмы, позволяющие посредством сложного пути передачи сигнала включать соответствующие адаптивные физиологические реакции. Известно, что холодовой стресс характеризуется активацией окислительных процессов в клетке [19]. Ограничение процессов ПОЛ и поддержание структурно-функционального состояния мембранных липидов осуществляется за счет работы антиоксидантной системы защиты, ключевую роль в которой играют специализированные ферменты [19], среди которых ПО одной из первых реагирует на любые внешние воздействия [20]. В нашем исследовании, в отличие от культивируемых клеток диоскори (рис. 1а), холодовое воздействие (4°C, 60 мин) не влияло на жизнеспособность клеток люцерны (рис. 1б), оставаясь на уровне контроля (86%), но наблюдались изменения на биохимическом уровне. Так, определение активности ПО при действии гипотермии показало ее увеличение в цикле роста на 24–29%, при этом, не было зарегистрировано достоверного влияния на уровень оксидазной (прооксидантной) активности (рис. 3). Увеличение активности ПО при совместном действии гипотермии и ФГ может быть связано с повышением уровня H_2O_2 вследствие усиления образования O_2^- (рис. 2) и активности СОД (рис. 4), которая дисмутирует O_2^- в H_2O_2 и молекулярный кислород. Известно, что СОД (в частности, Cu/Zn-СОД) может быть основным источником H_2O_2 в апопластном компартменте [21]. Стоит заметить, что при гипотермии уровень O_2^- в контрольном варианте был выше на 12–19%, по сравнению с действием ФГ в обычных условиях, что свидетельствует о нестрессовом характере проявления эффекта ФГ (рис. 2). Высокий уровень жизнеспособности клеток люцерны при действии гипотермии (рис. 1б) свидетельствует о том, что образовавшиеся АФК не вызывали повреждений липидных структур и макромолекул (ДНК, РНК, белки) в клетках, поэтому не приводили к развитию окислительного стресса, следствием которого могло быть образование существенных повреждений, нарушающих

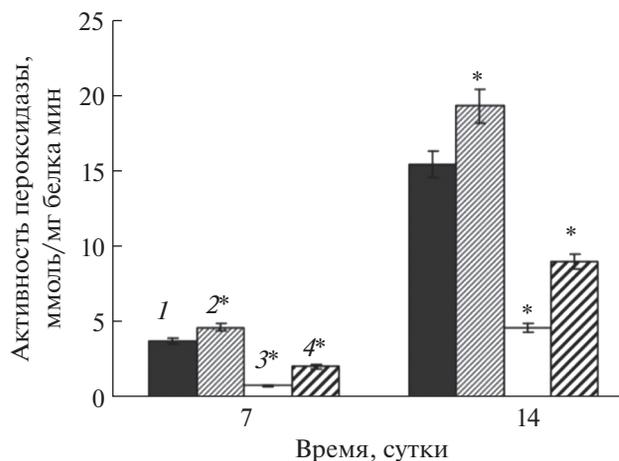


Рис. 7. Активность пероксидазы (ПО) в клетках люцерны при действии фураностаноловых гликозидов (ФГ) в условиях гиперосмотического стресса: 1 – контроль; 2 – ФГ; 3 – стресс; 4 – ФГ + стресс. Звездочками (*) обозначены статистически достоверные различия относительно контроля при $P \leq 0.05$.

барьерные свойства мембран. Наряду с СОД предкультивирование клеток люцерны с ФГ вызывало также увеличение активности АПО (рис. 4), являющейся составной частью аскорбат-глутатионового цикла, механизм которого заключается в восстановлении H_2O_2 до воды с участием аскорбата и АПО. Участвуя в аскорбат-глутатионовом цикле, АПО снижает содержание H_2O_2 , поддерживает окислительно-восстановительный баланс клетки, а также уровень глутатиона и аскорбиновой кислоты [22]. В отношении ГПО заметного изменения активности фермента при действии ФГ (рис. 4) не выявлено, что может быть связано с более низкой чувствительностью ГПО к увеличению концентрации H_2O_2 . Следует обратить внимание на высокие конститутивные значения активностей исследуемых ферментов, особенно ПО – более 15 ммоль/(мг белка мин) на 14 сут культивирования (рис. 3), которая выявляется как доминирующий фермент в цикле роста. Пероксидазная (антиоксидантная) активность ПО, наряду с другими антиоксидантными ферментами, контролирует уровень АФК, тем самым осуществляя редокс-регуляцию в растительной клетке.

При действии низких температур выявляется множество зависимых эффектов, среди которых значительно выделяются видовые особенности, соответствующие генотипу растений. Например, культура клеток диоскори, полученная из корневища *D. deltoidea* Wall., была чувствительна к гипотермии уже при 7°C (рис. 1б), их жизнеспособность снижалась на 50%. Виды рода *Dioscorea* L. произрастают преимущественно в тропиках, реже в субтропиках и в умеренном климате и являются теплолюбивыми растениями, в отличие от лю-

церы, которая относится к холодостойким видам. В связи с этим устойчивость к гипотермии культуры клеток люцерны может быть генетически детерминирована и связана, в том числе, с высокой конститутивной активностью антиоксидантных ферментов, по уровню активности которых можно судить о компенсаторном потенциале клеток [23]. На этом фоне, несмотря на повышение исходного уровня активности антиоксидантных ферментов при действии ФГ, эффект последних в условиях гипотермии не наблюдался (рис. 4).

Исследуемые антиоксидантные ферменты различались чувствительностью к концентрации H_2O_2 . Известно, что АПО обладает высоким сродством к H_2O_2 и нейтрализует ее даже в очень низких концентрациях [24], тогда как ГПО не обладает высоким сродством к H_2O_2 [25], а гваяколпероксидаза, вероятно, занимает промежуточное положение. Опосредованная способность ФГ повышать активность антиоксидантных ферментов, обладающих высоким сродством к H_2O_2 (в частности АПО), может свидетельствовать об участии ФГ в сигнальных механизмах АФК-индуцируемых защитных реакций в качестве фактора, обеспечивающего необходимый уровень АФК [5, 26].

Изменение проницаемости плазмалеммы тесно связано с состоянием барьера ионной проницаемости, что является важнейшим показателем, от которого зависит нормальное функционирование клетки. Полярные липиды являются структурными компонентами клеточных мембран, участвующими в формировании барьера ионной проницаемости клеток, который может нарушаться при активации ПОЛ [27]. В результате формируются сквозные полярные каналы, вследствие чего увеличивается пассивная проницаемость мембран для ионов и снижается их электрическая стабильность. Уровень ПОЛ является одним из важных повреждающих факторов, вызывающих пробой в липидной части мембраны, приводящий к ее разрыву и, в конечном итоге, к гибели клетки [28]. Нами показано, что воздействие ФГ приводило к уменьшению количества ТБК-АП в течение цикла роста на 19–22% (рис. 5), что в условиях гиперосмотического стресса отразилось на жизнеспособности клеток люцерны, которая возросла с 25% (в контроле) до 73%.

При гиперосмотическом воздействии протопласт теряет воду, уменьшается в размерах и отделяется от клеточной стенки. Сохранению водного гомеостаза при стрессе могут способствовать органические кислоты, образуемые в реакциях ферментов МДГ комплекса. Органические кислоты имеют свойства осмолитов, благодаря чему увеличивают количество связанной воды, тем самым предотвращают критическое обезвоживание клетки. Образующиеся в реакциях НАД/НАД·Н-МДГ малат и оксалоацетат могут запасаться в вакуолях,

выполняющих важную буферную роль [29]. Кроме того, эти молекулы участвуют в реакциях переаминирования с образованием аспарагина и аланина. Аминокислоты, образуемые в результате этих реакций, также играют значительную роль в осморегуляции клеток. Анализ динамики активности оксидоредуктазных НАД·Н-МДГ (рис. 6а) и НАД-МДГ (рис. 6б) показал, что ФГ способствовали увеличению активности ферментов МДГ комплекса. Ранее в клетках люцерны нами было показано усиление активности альдегидутилизующих ферментов при действии ФГ [5]. Продуктами реакций этих ферментов являются карбоновые кислоты, которые могут выступать в качестве осмолитов.

На увеличение образования осмолитов при воздействии ФГ может указывать разная концентрация маннита, вызывающая начальную степень плазмолиза. Следует заметить, что клетки диоскорей по сравнению с люцерной были более устойчивые к действию осмотика — только у 50% клеток был отмечен начальный плазмолиз при концентрации маннита 0.3 М [30].

При действии гиперосмотического стресса происходит повреждение белков мембран клетки как в липидной фазе, так и проявляющих свою активность в водных растворах [27]. Уровень ПОЛ влияет на степень нарушения липидного бислоя мембран, ослабляя липид-белковые взаимодействия интегральных белков. Последние выходят из мембраны во внеклеточное пространство, тем самым усиливая неселективную проницаемость мембран [29, 31]. При гиперосмотическом стрессе уменьшается растворимость гидрофильных белков, изменяются форма и размеры их молекул, теряется ферментативная активность. Изменения происходят вследствие разрыва водородных и ионных связей, стабилизирующих пространственные структуры [32]. На примере ПО нами показано, что в результате действия гиперосмотического стресса активность фермента была ингибирована почти на 80% (рис. 7). Предварительная экспозиция клеток с ФГ способствовала большему сохранению (на 30%) функциональной активности ПО по сравнению с вариантом без ФГ. Видимо, это связано с повышением активности ферментов МДГ комплекса, продукты которых имеют свойства осмолитов, а также вследствие снижения уровня ПОЛ. Таким образом, наблюдаемый эффект ФГ в условиях гиперосмотического стресса свидетельствует о запуске цитопрокторных механизмов и связанных с ними регуляторных путей, показанных нами ранее [5, 26].

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00387.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в каче-

стве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Volkova L.A., Maevskaya S.N., Burgutin A.B., Nosov A.M. Effect of exogenous steroid glycosides on cultured cells of potato under oxidative stress // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 639. <https://doi.org/10.1134/S1021443707050111>
2. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Maevskaya S.N., Nosov A.M. Stimulation of defense responses of *in vitro* potato plants by treatment with steroid glycosides under abiotic stresses // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. P. 928. <https://doi.org/10.1134/S1021443711040236>
3. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Nosov A.M. Characteristics of eliciting effects of furostanol glycosides on cultured yam cells // Russ. J. Plant Physiol. 2018. V. 65. P. 427. <https://doi.org/10.1134/S1021443718020085>
4. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Nosov A.M. Sensitivity of antioxidant status of plant cells to furostanol glycosides // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 784. <https://doi.org/10.7868/S0015330316060154>
5. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Burgutin A.B., Nosov A.M. Effect of furostanol glycosides from *Dioscorea deltoidea* on redox state of alfalfa cells *in vitro* // Russ. J. Plant Physiol. 2021. V. 68. P. 1098. <https://doi.org/10.1134/S102144372105023X>
6. Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 8885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708106200>
7. Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. V. 38. P. 995. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003>
8. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // Planta. 2012. V. 235. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
9. Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // Plant Cell Rep. 2005. V. 24. P. 255. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
10. Ackermann F., Stanislas T. The plasma membrane – an integrating compartment for mechano-signaling // Plants. 2020. V. 9. P. 505. <https://doi.org/10.3390/plants9040505>
11. 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(4). P. 252.
12. Lin C.C., Kao C.H. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings // Plant Soil. 1999. V. 216. P. 147. <https://doi.org/10.1023/A:1004714506156>
13. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. P. 276.
14. Шульгин К.К., Попов С.С., Рахманова Т.И., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Вережкин А.Н., Семенихина А.В., Гончарова Е.И. Активность глутатионпероксидазы при нарушении функции печени и выделение фермента с использованием хроматографических методов для исследования регуляторных свойств // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 6. С. 916.
15. Gerbling K.-P., Kelly G.J., Fischer K.-H., Latzko E. Partial purification and properties of soluble ascorbate peroxidases from Pea leaves // J. Plant Physiol. 1984. V. 115. P. 59.
16. Liszkay A., van der Zalm E., Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and $\cdot OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 3114. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044784>
17. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
19. Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 444. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.07.002>
20. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. 2003. V. 21. P. 829. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0591-z>
21. Tanaka K., Takio S., Yamamoto I., Satoh T. Purification of the cytosolic CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) of *Marchantia paleacea* var. diptera and its resemblance to CuZn-SOD from chloroplasts // Plant Cell Physiol. 1996. V. 37(4). P. 523.
22. Foyer C.H., Noctor G. Defining robust redox signalling within the context of the plant cell // Plant Cell Environ. 2015. V. 38. P. 239. <https://doi.org/10.1111/pce.13659>
23. Mehla N., Sindhi V., Josula D., Bisht P., Wani S.H. An introduction to antioxidants and their roles in plant stress tolerance // Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress / Eds. M.I.R. Khan, N.A. Khan. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017. P. 1. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5>
24. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. Москва: КДУ, 2007. 140 с.
25. Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, их роль в АФК-сигналинге и устойчивости растений // Успехи современной биологии. 2016. Т. 136. С. 181.
26. Volkova L.A., Urmantseva V.V., Klyushin A.G., Burgutin A.B., Nosov A.M. Activity of respiratory pathways in cultured yam cells under the influence of furostanol glycosides // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 344. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040172>

27. *Volinsky R., Kinnunen P.K.J.* Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 2806. <https://doi.org/10.1111/febs.12247>
28. *Евстигнеев М.П., Завьялова О.С., Савченко Е.В.* Биофизика мембран: учеб. пособие // Севастополь: СевГУ. 2019. 59 с.
29. *Lokhande V.H., Suprasanna P.* Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance // *Environmental adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* / Eds. P. Ahmad, M.N.V. Prasad. Springer Science + Business Media, LLC. 2012. P. 29. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_2
30. *Урманцева В.В., Волкова Л.А., Ульянова К.А., Куличенко И.Е., Носов А.М.* Использование перекиси водорода и дикарбоновых кислот для повышения осмоустойчивости культуры клеток *Dioscorea deltoidea* W. // *Биотехнология.* 2009. С. 14.
31. *Fruhwrth G.O., Loidl A., Hermetter A.* Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2007. V. 1772. № 7. P. 718. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.04.009>
32. *Степовая Е.А., Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Якушина В.Д., Носова А.И., Гулая В.С., Степанова Е.А., Чильчигашев Р.И., Новицкий В.В.* Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы // *Биомедицинская химия.* 2016. Т.62. С. 64. <https://doi.org/10.18097/PBMC20166201064>

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ *TaNAC69*, *TaDREB1*, *TabZIP60* У РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВОДНОМ ДЕФИЦИТЕ И ГИПОТЕРМИИ¹

© 2022 г. Е. А. Заикина^а, *, Х. Г. Мусин^а, А. Р. Кулуев^а,
В. И. Никонов^б, А. М. Дмитриев^с, Б. Р. Кулуев^а

^а Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^б Башкирский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация

^с Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования
“Башкирский государственный аграрный университет”, Уфа, Россия

*e-mail: evisheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.09.2021 г.

После доработки 25.11.2021 г.

Принята к публикации 25.11.2021 г.

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является важнейшей продовольственной культурой в мире. Отрицательное влияние на урожайность пшеницы оказывают стрессовые факторы, прежде всего, засуха и гипотермия. Транскрипционные факторы (ТФ) являются перспективной мишенью для повышения устойчивости растений к стрессу из-за их способности контролировать экспрессию большого числа защитных генов. Наиболее значимыми регуляторами реакций стрессоустойчивости являются следующие семейства ТФ: NAC, DREB и bZIP. Нами проведен анализ изменений относительного содержания транскриптов генов *TaNAC69*, *TaDREB1*, *TabZIP60* у семи сортов и двух перспективных селекционных линий мягкой пшеницы при засухе и гипотермии. Изменения уровней экспрессии этих генов коррелировали с такими параметрами стрессоустойчивости, как относительное содержание воды, пролина и малонового диальдегида. Для гена *TaNAC69* было характерно повышение относительного содержания транскриптов при засухе во всех изучаемых сортаобразцах, гипотермия вызывала гораздо меньшие изменения в профиле экспрессии этого гена. При действии гипотермии и засухи наибольшее содержание транскриптов гена *TaDREB1* было выявлено у линии Л43466, у гена *TabZIP60* при засухе максимальные значения транскрипционной активности показала также линия Л43466. Наибольшее относительное содержание транскриптов при действии стрессовых факторов среди всех изучаемых генов показала линия Л43466, что может говорить о ее наибольшей перспективности для дальнейшей селекции.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, гипотермия, засуха, стрессоустойчивость, транскрипционные факторы

DOI: 10.31857/S0015330322030186

ВВЕДЕНИЕ

Абиотические стрессовые факторы, такие как засуха и гипотермия, отрицательно влияют на рост, продуктивность и географическое распространение культурных растений. В связи с этим является актуальным увеличение стрессоустойчивости растений, что позволит повысить количество и качество урожая и будет способствовать

более широкому распространению культурных растений, в том числе, на огромных территориях России с преимущественно неблагоприятными условиями среды. При воздействии засухи в растениях наблюдаются множественные негативные изменения, включая повреждение клеток в результате образования активных форм кислорода (АФК) [1]. В результате действия низких положительных температур в растениях происходит повышение жесткости мембран, нарушение активного транспорта ионов, водного обмена и впоследствии также развивается окислительный стресс [2]. Ами-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322030186 для авторизованных пользователей.

нокислота пролин при стрессе действует как антиоксидант – защищает клетки от АФК, соответственно накопление пролина может коррелировать с устойчивостью растений к стрессу. Большое накопление молекул АФК, с которыми не справляются системы защиты, запускают процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), что выражается накоплением малонового диальдегида, что, в конечном счете, может привести к гибели клеток. Эти и ряд других биохимических параметров могут быть использованы в качестве маркеров стрессоустойчивости, однако более перспективным видится анализ генетических детерминант. В этой связи особый интерес представляет выяснение роли защитных генов в развитии устойчивости к стрессам [3]. Ввиду многочисленности таких генов перспективным может оказаться изучение транскрипционных факторов (ТФ), так как один ТФ контролирует экспрессию широкого спектра генов-мишеней путем связывания со специфическими цис-регуляторными элементами в промоторах [4]. Из всего разнообразия групп ТФ только несколько семейств признаны в качестве ключевых регуляторов устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам – NAC, DREB, bZIP [5].

Многочисленные сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) характеризуются различной устойчивостью к засухе и гипотермии. В качестве одного из подходов отбора стрессоустойчивых линий могут быть использованы методы молекулярной генетики [6], однако полигенный контроль стрессоустойчивости сильно затрудняет разработку и внедрение технологий маркер-ориентированной селекции по данному признаку. Одними из таких универсальных ДНК-маркеров могли бы быть гены ТФ, однако ввиду их большой важности для развития растения, их нуклеотидные последовательности отличаются высокой консервативностью [7], что уменьшает их ценность для SNP-генотипирования. В то же время можно предположить, что стрессоустойчивые сорта будут характеризоваться естественным и своевременным изменением уровня экспрессии ряда генов ТФ, задействованных в ответе на стресс [5], что можно зафиксировать при помощи количественной ОТ-ПЦР. Поэтому целью работы было изучение влияния засухи и гипотермии на сорта и перспективные линии мягкой пшеницы районированных для Предуральской степной зоны на относительное содержание транскриптов генов *TaNAC69*, *TaDREB1* и *TabZIP60*. Для оценки степени стрессовой нагрузки и стрессочувствительности изучаемых сортов образцов к засухе и гипотермии, была поставлена также задача провести анализ содержания пролина и малонового диальдегида, а также измерить относительное содержание воды в побегах (relative water content, RWC).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования послужили сорта и перспективные линии яровой мягкой пшеницы *T. aestivum* из коллекций Чишминского селекционного центра Башкирского научно-исследовательского института (БНИИСХ) УФИЦ РАН и Башкирского государственного аграрного университета. Для экспериментов взяты следующие сорта мягкой пшеницы: Зауральская жемчужина, Архат, Тулайковская 108, Башкирская 28, Омская 35, Омская 36, Экада 113, а также две перспективные линии – Л43706 и Л43466.

Растения для всех опытов выращивали в вегетационных сосудах объемом 500 мл в теплице при +18°C при естественном освещении. Полив осуществлялся три раза в неделю, по 100 мл, водопроводной отстоянной водой. Через 30 сут выращивания опытные образцы подвергались стресс-обработке. Контрольные растения продолжали поливать трижды в неделю. В эксперименте с засухой опытные образцы фиксировали на 5 и 10 сут отсутствия полива (засуха). В эксперименте по гипотермии, опытные образцы с нормальным режимом полива помещали в климатостат с температурой +5°C на 20 ч, а другую группу растений на 4 ч при 0°C.

Относительное содержание воды (RWC) определяли у растений, растущих в норме (контроль) и подвергнутых засухе (опыт): побег растения отделяли от корня и взвешивали (сырая масса, FW), затем образцы побегов гидратировали в деионизированной воде 4 ч при 25°C. После гидратации образцы побегов вынимали из воды и после быстрого и легкого высушивания поверхностной влаги фильтровальной бумагой, взвешивали для получения полной массы (TW). Затем образцы сушили в сушильном шкафу (СКТБ СПУ, Россия) до сухого веса (DW) при 80°C в течение 24 ч. RWC вычисляли по формуле:

$$RWC(\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100\%.$$

В экспериментах использовали метод определения пролина, основанный на работе Bates [8] с модификациями от Khedr с соавт. [9]. Экстрагировали пролин с помощью 3% сульфосалициловой кислоты (Химреактивснаб, Россия), центрифугировали при 8000 g 10 мин. Реакционная смесь состояла из супернатанта, ледяной уксусной кислоты (Химреактивснаб, Россия), нингидринового реактива (140 мМ нингидрин (Sigma-Aldrich, США), 5 М CH₃COOH, 2.4 М H₃PO₄ (Химреактивснаб, Россия)), которые смешивали в объемном соотношении 1:1:1 и держали в твердотельном термостате ТТ-2 “Термит” (ДНК-Технология, Россия) при 95°C 1 ч. После охлаждения реакционную смесь анализировали с помощью спектрофотометра Enspire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, США) при длине волны 520 нм.

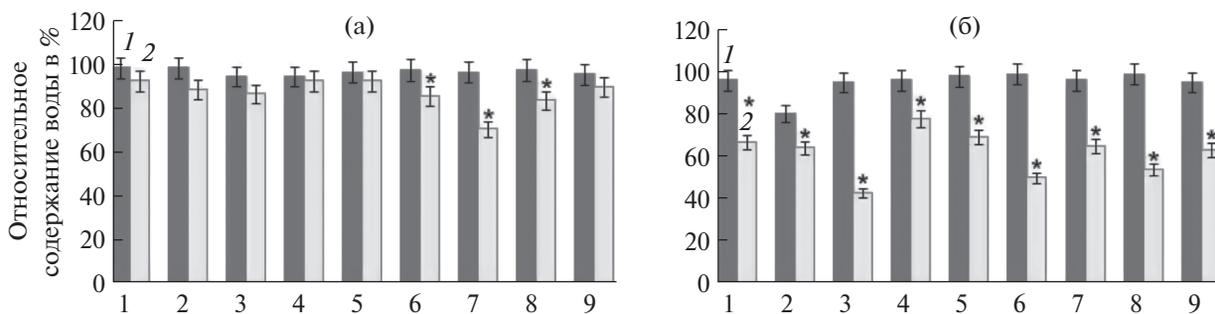


Рис. 1. Относительное содержание воды (RWC) при действии засухи: (а) 5 сут, (б) 10 сут. 1. Л43706, 2. Л43466, 3. Зауральская жемчужина, 4. Архат, 5. Тулайковская 108, 6. Омская 36, 7. Экада 113, 8. Башкирская 28, 9. Омская 35. 1 – контроль (нормальные условия), 2 – опыт (стрессовые условия). $n = 5$. * – $P < 0.05$.

Концентрацию пролина в пробе рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по стандартной навеске пролина (Sigma-Aldrich, США).

Определение малонового диальдегида (МДА) производили в навеске листьев с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК) (Sigma-Aldrich, США). Экстракцию МДА из листьев проводили в 80% этаноле, центрифугировали при 12000 g 10 мин. После чего супернатант делили на 2 равные части, в одну часть добавляли равный объем 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (PanReac Appli-Chem, Испания) с 0.5% ТБК, в другую – 20% ТХУ. Смеси держали в твердотельном термостате при 95°C 20 мин. Оптическую плотность измеряли при 440, 532 и 600 нм [10] и вводили поправки на сахара и другие неспецифические вещества.

Тотальную РНК из листьев пшеницы выделяли с помощью реагента Лира (Биолабмикс, Россия). Для получения кДНК на основе мРНК исследуемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы М-MuLV (Евроген, Россия) согласно протоколу поставщика. Анализ накопления транскриптов генов *TaNAC69*, *TaDREB1*, *TabZIP60* проводили методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР были подобраны впервые в рамках данной работы, их последовательности и размеры ампликонов приведены в Дополнительных материалах (таблица S1). Для подбора праймеров использовали программу PrimerSelect пакета Lasergene (DNASar, США), специфичность проверяли с помощью BLAST (ncbi.nlm.nih.gov). В качестве стандарта использовали мРНК гена *RLI* (RNase L Inhibitor-like protein), уровень экспрессии которого принимали за 100%. Выбор этого референсного гена объясняется тем, что он показывает наибольшую стабильность уровня экспрессии

в различных тканях мягкой пшеницы при разных условиях произрастания [11].

Результаты всех исследований представлены в виде гистограмм со средними значениями выборки. Выборка во всех экспериментах составила 5 растений ($n = 5$). Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Относительное содержание воды (RWC) является индикатором засухоустойчивости растений [12]. Так при измерении RWC на 5 сут засухи наибольшие изменения относительного содержания воды между контрольными и опытными растениями наблюдались у сортообразцов Экада 113, Башкирская 28 и Омская 36, а наименьшие – у Архат, Тулайковская 108 и Л43706 (рис. 1а). При более сильном стрессе на 10 сут разница в RWC между контрольными и опытными образцами была более ярко выражена, особенно в образцах Зауральская жемчужина, Омская 36, Башкирская 28, Омская 35. Наилучшей способностью сохранять воду обладали образцы Л43706, Тулайковская 108, Архат и Л43466 (рис. 1б).

Наиболее активными в накоплении пролина в период засухи продолжительностью в 5 сут оказались растения сортов Омская 36 и Экада 113 (рис. 2а), количество пролина в которых возросло в 12 и 22 раза, соответственно. При действии более длительной засухи, во всех образцах наблюдалось увеличение количества пролина, причем наиболее существенно у сортов Экада 113, Зауральская жемчужина и Башкирская 28 (рис. 2б).

При гипотермии количество пролина так же повышалось. Исключением были сорта Тулайковская 108 и Башкирская 28 (рис. 2в), где его содержание достоверно не отличалось от контрольных линий. Наибольшее увеличение содержания

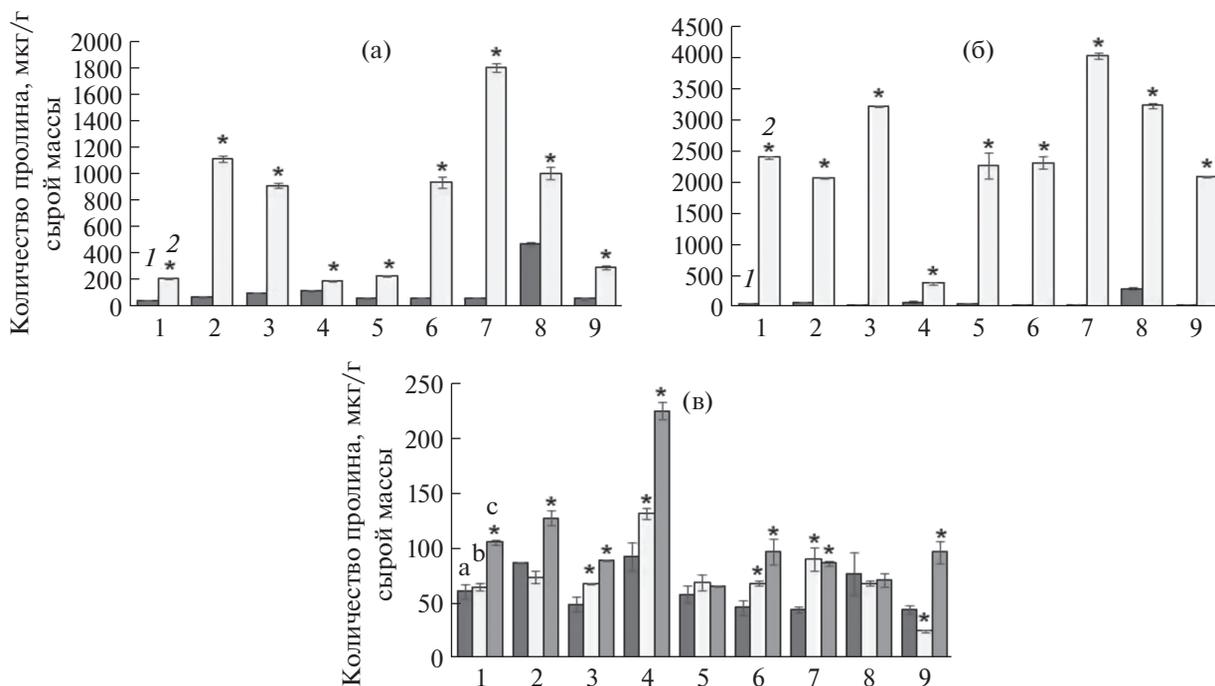


Рис. 2. Содержание пролина в листьях пшеницы при действии абиотических стрессовых факторов: (а) засуха 5 сут, (б) засуха 10 сут, (в) гипотермия. 1. Л43706, 2. Л43466, 3. Зауральская жемчужина, 4. Архат, 5. Тулайковская 108, 6. Омская 36, 7. Экада 113, 8. Башкирская 28, 9. Омская 35. 1 – контроль (нормальные условия), 2 – опыт (стрессовые условия). В опыте по гипотермии: а – контроль (нормальные условия), б – гипотермия +5°C, с – гипотермия 0°C. $n = 5$. * – $P < 0.05$.

пролина при гипотермии было характерно для сортов Архат и Омская 35 (рис. 2в).

При засухе количество МДА в исследованных образцах почти всегда возрастало, исключением являлись лишь сорта Тулайковская 108 при засухе 5 сут (рис. 3а) и Архат при стрессе 10 сут (рис. 3б). Наибольшие увеличения содержания МДА по отношению к контролю были найдены для образцов Экада 113, Зауральская жемчужина и Л43706 на 5 сут отсутствия полива (рис. 3а), и в образцах Л43706, Экада 113 на 10 сут (рис. 3б). Максимальная степень роста содержания МДА при засухе 10 сут была показана для линии Л43706. Если при стрессовом фоне 5 сут содержание МДА у этой линии увеличилось на 57%, то при засухе 10 сут уже на 246%.

На фоне гипотермии накопление продуктов перекисного окисления практически во всех линиях возрастало. Причем, количество МДА при 0°C было выше, чем при +5°C. Так, например, в образце Л43706, количество МДА при +5°C повысилось на 15%, а при 0°C на 160%, по сравнению с контролем (рис. 3в). Самый заметный прирост концентрации МДА при гипотермии +5 и 0°C был отмечен в образце Л43466 (на 80% и 460%, соответственно), а наименьший в образце Тулайковская 108 (на 19% и 190%, соответственно).

Для дальнейшей работы нами был произведен поиск генов-мишеней, участвующих в абиотическом стрессе [4]. Были подобраны праймеры для ОТ-ПЦР генов транскрипционных факторов (табл. S1). Гены ТФ NAC регулируют развитие растений и реакции на биотический и абиотический стресс. Из множества генов NAC, нами был выбран ген *TaNAC69*, который позитивно влияет на устойчивость, как к засухе, так и к холоду [13]. Относительное содержание транскриптов гена *TaNAC69* под воздействием засухи, больше всего повышалось у образца Л43466 (рис. 4а), уже на 5 сут действия стресса экспрессия данного гена возрастала и сохранялась на высоком уровне в течение всего опыта. Также при засухе наблюдалось значительное увеличение относительного содержания транскрипта гена *TaNAC69* у сортов Архат, Экада 113 и Башкирская 28 (рис. 4а) при действии стрессового фактора 5 ч, и значительный рост активности гена наблюдался у всех сортов при более затяжной засухе (рис. 4б). Таким образом, при засухе уровень экспрессии гена *TaNAC69* увеличился у всех анализируемых сортообразцов.

В ответ на гипотермию +5°C относительное содержание транскриптов гена *TaNAC69* повышалось у сортообразцов Л43466, Зауральская жемчужина, Архат, Тулайковская 108, Башкирская 28, Омская 35 (рис. 4в). В образцах Л43706,

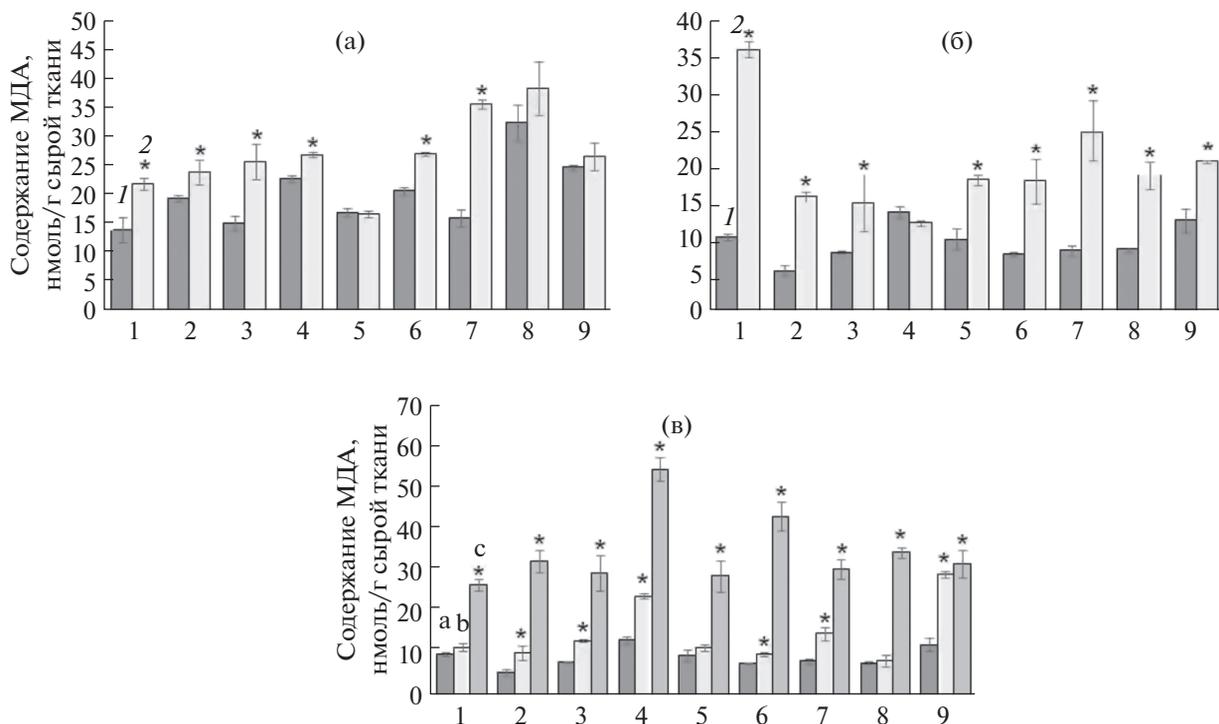


Рис. 3. Содержание малонового диальдегида в листьях пшеницы при действии абиотических стрессовых факторов: (а) засуха 5 сут, (б) засуха 10 сут, (в) гипотермия. 1. Л43706, 2. Л43466, 3. Зауральская жемчужина, 4. Архат, 5. Тулайковская 108, 6. Омская 36, 7. Экада 113, 8. Башкирская 28, 9. Омская 35. 1 – контроль (нормальные условия), 2 – опыт (стрессовые условия). В опыте по гипотермии: а – контроль (нормальные условия), б – гипотермия +5°C, с – гипотермия 0°C. n = 5. * – P < 0.05.

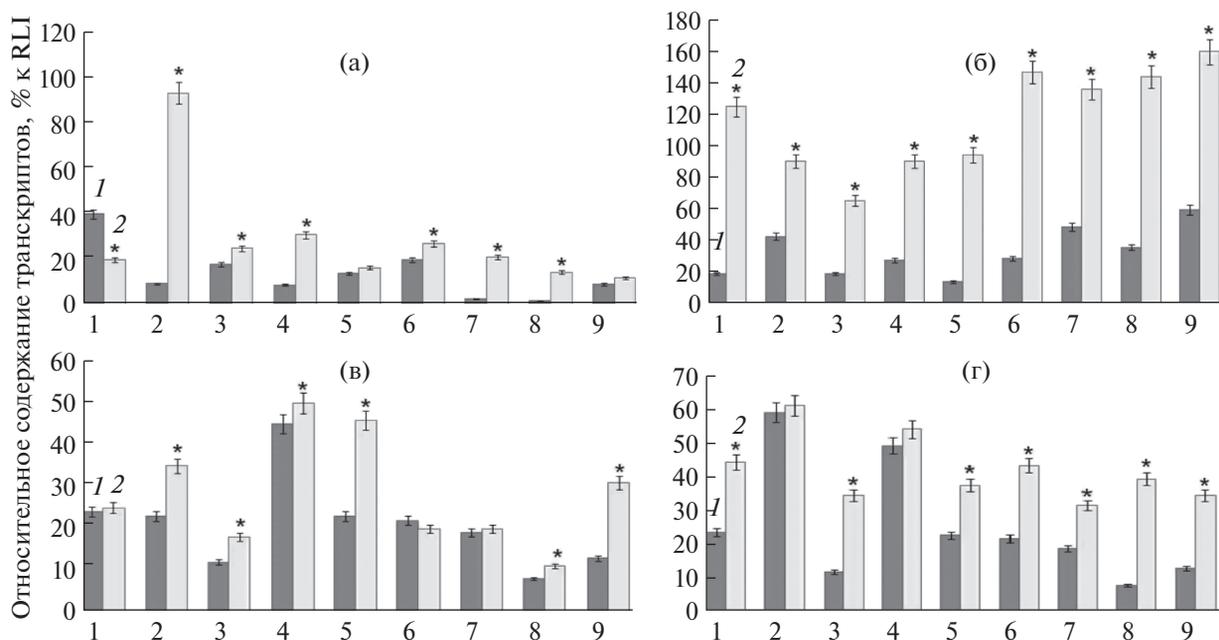


Рис. 4. Относительное содержание транскриптов гена *TaNAC69* при действии абиотических стрессовых факторов: (а) засуха 5 сут, (б) засуха 10 сут, (в) гипотермия +5°C, (г) гипотермия 0°C. 1. Л43706, 2. Л43466, 3. Зауральская жемчужина, 4. Архат, 5. Тулайковская 108, 6. Омская 36, 7. Экада 113, 8. Башкирская 28, 9. Омская 35. 1 – контроль (нормальные условия), 2 – опыт (стрессовые условия). n = 5. * – P < 0.05.

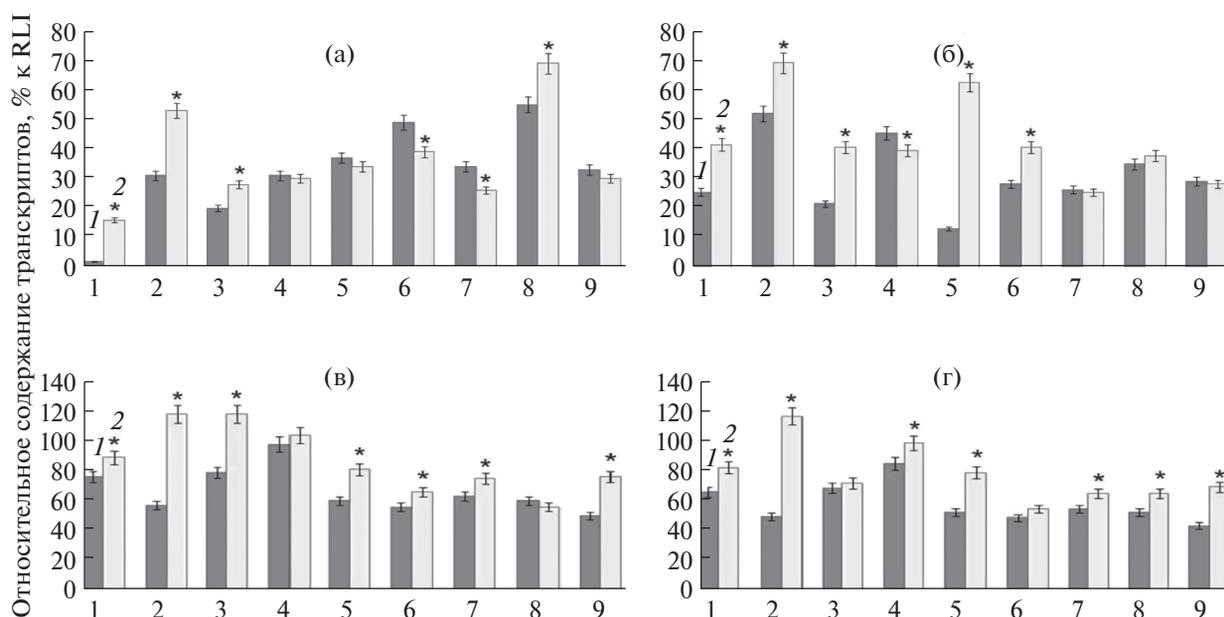


Рис. 5. Относительное содержание транскриптов гена *TaDREB1* при действии абиотических стрессовых факторов: (а) засуха 5 сут, (б) засуха 10 сут, (в) гипотермия +5°C, (г) гипотермия 0°C. 1. Л43706, 2. Л43466, 3. Зауральская жемчужина, 4. Архат, 5. Тулайковская 108, 6. Омская 36, 7. Экада 113, 8. Башкирская 28, 9. Омская 35. 1 – контроль (нормальные условия), 2 – опыт (стрессовые условия). n = 5. * – P < 0.05.

Омская 36, Экада 113 (рис. 4в) достоверных отличий от контроля по содержанию транскриптов исследуемого гена не выявлялось. Сорт пшеницы Тулайковская 108 (рис. 4в) давал наибольший позитивный ответ при воздействии +5°C возрастанием относительного содержания транскриптов гена *TaNAC69*. При понижении температуры до 0°C наблюдалось еще более существенное увеличение уровня экспрессии этого гена по сравнению с действием температуры +5°C. При 0°C в образцах Л43706, Зауральская жемчужина, Омская 36, Башкирская 28, Омская 35 (рис. 4г) относительное содержание транскриптов гена *TaNAC69* увеличивалось более чем в 2 раза по сравнению с контролем.

Для дальнейших исследований был выбран ген *TaDREB1*, который индуцируется абиотическим стрессом [14]. В результате проведенных экспериментов во многих опытных образцах обнаружено увеличение относительного содержания транскриптов гена *TaDREB1* при действии стрессовых факторов и сохранение его на высоком уровне в течение всего эксперимента. При засухе 5 сут наибольший рост относительного содержания транскриптов гена *TaDREB1* наблюдался у сортообразцов Л43706, Л43466 и Башкирская 28 (рис. 5а). В сортообразцах Архат, Тулайковская 108 и Омская 35 достоверных отличий при засухе между контролем и опытом не выявлялось (рис. 5а). В образцах Омская 36 и Экада 113 (рис. 5а) наблюдалось снижение активности гена *TaDREB1* в условиях засухи. Под воздействием длительной засухи

повышение уровня экспрессии гена *TaDREB1* показывали образцы Л43706, Л43466, Зауральская жемчужина, Омская 36 и наибольшее повышение было характерно для Тулайковской 108 (рис. 5б). При этом у сортов Экада 113, Башкирская 28 и Омская 35 (рис. 5б) достоверных отличий от контроля в относительном содержании транскриптов этого гена не выявлено.

В опыте по гипотермии происходило большее увеличение относительного содержания транскрипта гена *TaDREB1* по сравнению с экспериментами по засухе, причем различия в уровне экспрессии становились более существенными при действии 0°C. При действии +5°C наибольшее увеличение активности наблюдалось в образцах Л43466, Зауральская жемчужина, а при 0°C у Л43466 (рис. 5в, г).

Следующим был изучен ген *TabZIP60*. При выборе этого гена мы полагались на результаты исследования Zhang с соавт. [15], которые показали, что трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* со сверхэкспрессией гена *TabZIP60* характеризуются значительно улучшенной устойчивостью, как к засухе, так и к низким температурам. Линия Л43466 (рис. 6а, б, в, г) показала высокий уровень относительного содержания транскрипта гена *TabZIP60* при воздействии засухи, но при низких положительных температурах его экспрессия у этой линии, наоборот, снижалась по отношению к контролю. В сортообразцах Л43706, Тулайковская 108, Экада 113 и Башкирская 28 (рис. 6) в

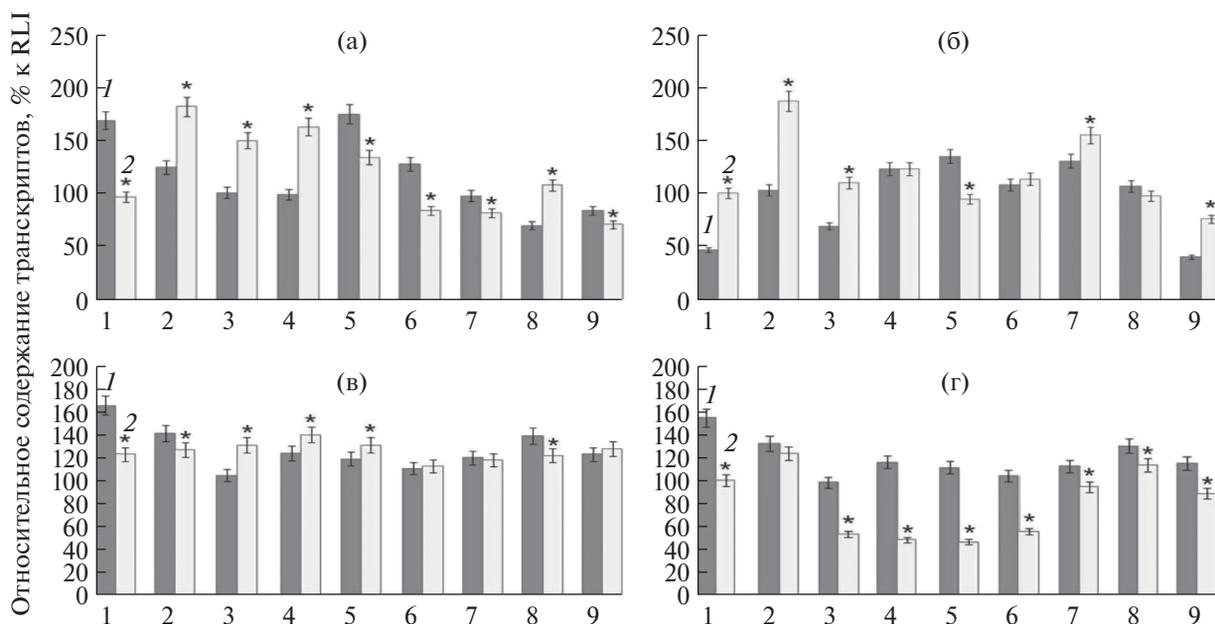


Рис. 6. Относительное содержание транскриптов гена *TabZIP60* при действии абиотических стрессовых факторов: (а) засуха 5 сут, (б) засуха 10 сут, (в) гипотермия +5°C, (г) гипотермия 0°C. 1. Л43706, 2. Л43466, 3. Зауральская жемчужина, 4. Архат, 5. Тулайковская 108, 6. Омская 36, 7. Экада 113, 8. Башкирская 28, 9. Омская 35. 1 – контроль (нормальные условия), 2 – опыт (стрессовые условия). $n = 5$. * – $P < 0.05$.

опытах с засухой и гипотермией +5°C наблюдалось снижение относительного содержания транскриптов гена *TabZIP60* в стрессовых условиях по сравнению с контролем. При снижении температуры до 0°C уровень экспрессии гена *TabZIP60* в опытных образцах вопреки ожиданиям, не повышался, а наоборот снижался во всех изучаемых образцах (рис. 6г).

ОБСУЖДЕНИЕ

При действии засухи снижение относительно содержания воды (RWC) наблюдалось у всех опытных образцов. Сортообразцы Л43466, Архат, Л43706, Тулайковская 108, поддерживающие более высокий RWC при засухе, вероятнее всего, являются наиболее устойчивыми к низкому водному потенциалу и, таким образом, способны сохранять свой рост и продуктивность в стрессовых условиях [17].

Пролин является важной молекулой, накапливающейся при стрессах, таких как засуха, гипотермия и другие. При стрессе пролин защищает от денатурации макромолекулы в клетках и регулирует осмотическое давление клеточного сока при снижении водного потенциала. Во время засухи пролин наиболее активно накапливался в образцах Экада 113, Омская 36, Зауральская жемчужина, а при гипотермии – у образцов Архат, Л43466 и Л43706. Накопление пролина в растениях может коррелировать с устойчивостью к стрес-

су. К тому же показано, что сверхэкспрессия пролинсинтазы в трансгенных растениях увеличивала стрессоустойчивость пшеницы [18], картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [19] и табака (*Nicotiana tabacum*) [20]. В наших опытах чаще всего наблюдался подъем содержания пролина в стрессированных растениях, причем засуха оказывала больший эффект по сравнению с гипотермией.

МДА является основным продуктом перекисного окисления липидов, а значит, может указывать на степень повреждения мембран в клетке [21]. Однако стоит учесть тот факт, что МДА накапливается и при идеальных условиях роста организма, и количество его сильно различается не только от вида к виду, но и от сорта к сорту. При засухе наименьшее количество МДА накапливалось у сортов Тулайковская 108 и Архат, что может говорить о большей засухоустойчивости последних.

Предполагалось на основе RWC и содержания МДА и пролина сделать выводы о стрессоустойчивости исследуемых сортообразцов *T. aestivum*. Например, исходя из данных RWC и содержания МДА можно предположить, что самыми засухоустойчивыми сортами из нашего списка являются Тулайковская 108 и Архат. Судя по всему, обе линии Л43706 и Л43466 также являются весьма засухоустойчивыми, по крайней мере, для них было характерно существенное повышение уровня экспрессии всех трех генов ТФ под влиянием засухи. Повышение уровня экспрессии генов

TaNAC69, *TaDREB1*, *TabZIP60* в ответ на засуху это ожидаемая реакция растений, что должно способствовать увеличению устойчивости к этому стресс-фактору. Необходимо отметить, что сорта Тулайковская 108, Архат, Зауральская жемчужина, Экада 113, Омская 36 чаще всего реагировали на засуху существенным увеличением уровня экспрессии всех исследуемых генов ТФ. Причем Л43706, Л43466, Тулайковская 108 и Архат поддерживали, по всей видимости, устойчивость к засухе за счет более эффективной задержки воды в побегах (рис. 1), тогда как сорта Зауральская жемчужина, Экада 113 и Омская 36, в основном, за счет увеличения концентрации пролина (рис. 2). Хорошо известно, что в засухоустойчивости мягкой пшеницы, как и у других растений кроме пролина задействованы множество механизмов, поэтому у наиболее устойчивых сортов при засухе содержание пролина может и не повышаться [22]. Полученные нами данные показывают, что разные сорта мягкой пшеницы приспосабливаются к одним и тем же стрессовым условиям, подключая разные молекулярные системы, имеющиеся на вооружении у растений.

Увеличение содержания пролина при гипотермии может свидетельствовать о большей холодоустойчивости обеих перспективных линий и сортов Архат и Омская 35. Наименьшее содержание МДА при действии холода демонстрировали линии Л43706 и Л43466, а также сорта Зауральская жемчужина и Тулайковская 108 (рис. 3в). Наиболее существенное увеличение уровня экспрессии генов исследуемых ТФ при действии гипотермии было характерно для сортов Зауральская жемчужина, Тулайковская 108, Омская 35 и Архат. Для линий Л43706 и Л43466 также было показано увеличение уровня экспрессии генов ТФ при действии холода. Таким образом, можно сделать вывод, что по физиолого-биохимическим параметрам перспективные линии мягкой пшеницы Л43706 и Л43466 характеризуются относительно высоким уровнем устойчивости к засухе и гипотермии. Наиболее холодоустойчивыми сортами, вероятнее всего, являются Зауральская жемчужина, Тулайковская 108, Омская 35 и Архат. К засухе наиболее устойчивы сорта Тулайковская 108, Архат, Зауральская жемчужина, Экада 113 и Омская 36. Однако как покажут себя эти сорта и линии в полевых условиях при изменяющемся климате на территории нашей страны, является предметом дальнейших исследований селекционеров.

Исследования относительного содержания транскриптов гена *TaNAC69* по мере развития засухи показали, что в нестрессированных образцах пшеницы уровень экспрессии этого гена низок, в то же время, при действии засухи происходит повышение содержания его транскриптов во всех изучаемых образцах. При более затяжной засухе наблюдается еще более значительное повышение

относительного содержания транскрипта гена *TaNAC69*. Полученные данные по экспрессии гена *TaNAC69*, показали, что происходит увеличение его уровня экспрессии, как при засухе, так и при гипотермии у большинства изученных сортов-образцов мягкой пшеницы. Из литературных данных известно об увеличении устойчивости к дегидратации у трансгенных линий *A. thaliana* и риса, сверхэкспрессирующих ген *TaNAC69* [23]. Необходимо отметить, что гипотермия вызывала меньшие изменения экспрессии гена *TaNAC69* у изучаемых образцов, чем засуха, что может быть связано с тем, что ген *TaNAC69* больше задействован как регулятор засухоустойчивости [13].

Гены *DREB1* индуцируются низкой температурой и, могут сами активировать экспрессию многих чувствительных к низкой температуре генов [24]. Так в нашем опыте уровень экспрессии гена *TaDREB1* при гипотермии повышался больше всего в образце Л43466 (рис. 5в, г). Наши данные соотносятся с результатами Dubouzet с соавт. [25], которые показали, что гены *DREB1* регулируют устойчивость к низкотемпературному стрессу.

В наших исследованиях ген *TabZIP60* показал более существенные увеличения уровня экспрессии, как при засухе, так и при гипотермии по сравнению с генами *TaNAC69* и *TaDREB1*. Интересно отметить, что, экспрессия гомологичного гена *OsZIP60* в рисе также активируется под воздействием засухи [26]. Так и в нашем опыте под воздействием засухи 5 и 10 сут наблюдались увеличения уровня экспрессии гена *TabZIP60*, особенно в опытных образцах Л43466 и Зауральская жемчужина. А при действии низких температур относительное содержание транскриптов этого гена в опытных образцах было меньше, чем в контроле. Можно предположить, что экспрессия гена *TabZIP60* падает из-за того, что в нашем эксперименте взяты только яровые сорта и линии мягкой пшеницы, для которых снижение температуры в период вегетации до 0°C не является нормой.

Засуха и гипотермия являются одними из наиболее актуальных стрессовых факторов при выращивании яровых сортов мягкой пшеницы, как на юге России, так и в более северных территориях России, к примеру, в Предуральской степной зоне. Нами проведены исследования особенностей изменения уровня относительного содержания транскриптов генов *TaNAC69*, *TaDREB1* и *TabZIP60* у ряда российских сортов и перспективных линий мягкой пшеницы башкирской селекции.

Наибольшее количество позитивных изменений транскрипционной активности в стрессовых условиях по всем изучаемым генам ТФ показал сортообразец Л43466. Также эта линия демонстрировала более высокую засухоустойчивость по таким физиологическим параметрам, как RWC и содержание МДА. Полученные результаты могут

свидетельствовать о большей перспективности использования линии Л43466 мягкой пшеницы в дальнейшей селекционной работе, по сравнению с линией Л43706. Из всех изученных генов транскрипционных факторов – ген *TaNAC69* наиболее существенно реагировал на засуху, показав самое большое изменение относительного содержания транскриптов. При воздействии низких положительных температур наиболее активно экспрессировался ген *TaDREB1*.

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А19-119021190011-0 при поддержке грантов Президента Российской Федерации МД-2304.2020.4 и Минобрнауки Российской Федерации (соглашения № 075-15-2021-549 от 31 мая 2021 г. и №075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fathi A., Tari D.B.* Effect of drought stress and its mechanisms in plants // *Int J Life Sci.* 2016. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.3126/ijls.v10i1.14509>
2. *Нарайкина Н.В., Попов В.Н., Миронов К.С., Пчёлкин В.П., Трунова Т.И., Мошков И.Е.* Транскрипция генов десатураж жирных кислот хлоропластов при низкотемпературном закаливании *Solanum tuberosum* L. // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология.* 2019. № 47. С. 174. <https://doi.org/10.17223/19988591/47/9>
3. *Hussain H.A., Hussain S., Khaliq A., Ashraf U., Anjum S.A., Men S., Wang L.* Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities // *Front. in plant sci.* 2018. V. 9. P. 393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00393>
4. *Zaikina E.A., Romyantsev S.D., Sarvarova E.R., Kuluev B.R.* Transcription factor genes involved in plant response to abiotic stress factors. *Ecological genetics.* 2019. V. 17. P. 47. <https://doi.org/10.17816/ecogen17347-58>
5. *Baillo E.H., Kimotho R.N., Zhang Z., Xu P.* Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. P. 771. <https://doi.org/10.3390/genes10100771>
6. *Khan S., Anwar S., Yu S., Sun M., Yang Z., Gao Z.Q.* Development of drought-tolerant transgenic wheat: achievements and limitations // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 3350. <https://doi.org/10.3390/ijms20133350>
7. *Gahlaut V., Jaiswal V., Kumar A., Gupta P.K.* Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129. P. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2794-z>
8. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
9. *Khedr A.H.A., Abbas M.A., Abdel W.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M.* Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
10. *Taylor N.L., Millar A.H.* Oxidative stress and plant mitochondria // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 372. P. 389. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28
11. *Веселова С.В., Бурханова Г.Ф., Нужная Т.В., Максимов И.В.* Роль этилена и цитокининов в развитии защитных реакций в растениях *Triticum aestivum*, инфицированных *Septoria nodorum* // *Физиология растений.* 2016. Т 63. С. 649. <https://doi.org/10.7868/S0015330316050158>
12. *Aref I.M., Khan P.R., Khan S., El-Atta H., Ahmed A.I., Iqbal M.* Modulation of antioxidant enzymes in Juniperus procera needles in relation to habitat environment and dieback incidence. *Trees.* 2016. V. 30. P. 1669. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1399-0>
13. *Xue G.P., Way H.M., Richardson T., Drenth J., Joyce P.A., McIntyre C.L.* Overexpression of *TaNAC69* leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat // *Mol. Plant.* 2011. V. 4. P. 697. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr013>
14. *Liu M., Wang Z., Xiao H.M., Yang Y.* Characterization of *TaDREB1* in wheat genotypes with different seed germination under osmotic stress // *Hereditas.* 2018. V. 155. P. 26. <https://doi.org/10.1186/s41065-018-0064-6>
15. *Zhang L., Zhang L., Xia C., Zhao G., Liu J., Jia J.* A novel wheat bZIP transcription factor, *TabZIP60*, confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic *Arabidopsis* // *Physiol. Plant.* 2015. V. 153. P. 538. <https://doi.org/10.1111/ppl.12261>
16. *Niu C., Wei W., Zhou Q., Tian A.G., Hao Y.J., Zhang W.K., Ma B., Lin Q., Zhang Z.B., Zhang J.S., Chen S.Y.* Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 1156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02480.x>
17. *Joshi R., Karan R.* Physiological, biochemical and molecular mechanisms of drought tolerance in plants. In *molecular approaches in plant abiotic stress*, Eds. *Gaur R.K., Sharma P.* (Boca Raton, FL: CRC Press). 2013. P. 209.
18. *Sawahel W.W., Hassan A.H.* Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline // *Biotechnol. Lett.* 2002. V. 24. P. 721. <https://doi.org/10.1023/A:1015294319114>
19. *Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouzdid R., Bidani A., Jaoua L., Savouré A., Jaoua S.* Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants //

- Plant Sci. 2005. V. 169. P. 746.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.025>
20. Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.G., Hu C.A.A., Verma D.P.S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 1387.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1387>
21. Gaweł S., Wardas M., Niedworok E., Wardas P. Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek.* 2004. V. 57. P. 453.
22. Marček T., Hamow K.Á., Végh B., Janda T., Darko E. Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes // *PloS ONE.* 2019. V. 14 P. 2.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212411>
23. Yokotani N., Ichikawa T., Kondou Y., Matsui M., Hirochika H., Iwabuchi M., Oda K. Tolerance to various environmental stresses conferred by the salt-responsive rice gene *ONAC063* in transgenic *Arabidopsis* // *Planta.* 2009. V. 229. P. 1065.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0895-5>
24. Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray // *Plant Cell.* 2001. V. 13. P. 61.
<https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.61>
25. Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. *Os-DREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression // *Plant J.* 2003. V. 33. P. 751.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01661.x>
26. Agarwal P., Baranwal V.K., Khurana P. Genome-wide analysis of bZIP transcription factors in wheat and functional characterization of a *TabZIP* under abiotic stress // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 4608.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40659-7>